



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y PROAPOPTÓTICO DE LAS CASIOPEÍNAS III-Ea Y III-La EN DOS LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

CYNTHIA MAGALY SÁNCHEZ VACA

TUTORA: DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

ASESORES: DRA. MARÍA CRISTINA TREJO SOLÍS
DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO
MTRO. CLAUDIO VIVEROS AMADOR

MÉXICO, Cd. Mx.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo a mis padres, gracias por cuidar, amar y siempre estar allí.

*Gracias por ser mis confidentes y mejores amigos, por haberme dirigido en la dirección correcta y
sobre todo por haberme enseñado a caminar de forma independiente.*

Los amo más de lo que estas palabras serán capaces de decir.

Agradecimientos

Agradezco al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Odontología de la UNAM, en especial a la Dra. María Dolores Jiménez Farfán, al Dr. Juan Carlos Cuauhtémoc Hernández Guerrero y al Mtro. Claudio Viveros Amador, por su total apoyo, comprensión y amistad en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. María Cristina Trejo Solís por su apoyo en la elaboración de la técnica de TUNEL y uso de geles de agarosa.

Al Laboratorio de Desarrollo Gonadal de la Facultad de Medicina de la UNAM, en especial a la Dra. María José Gómora y a la Dra. María del Carmen Méndez Herrera, por su apoyo en la técnica de inmunofluorescencia.

Índice

1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Cáncer de cabeza y cuello.....	6
2.2 Proliferación y muerte celular en el cáncer.....	8
2.3 Quimioterapia en neoplasias de cabeza y cuello.....	12
2.4 Compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas®).....	13
3. Planteamiento del problema.....	15
4. Justificación.....	16
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivos.....	19
6.1. Objetivo general.....	19
6.2. Objetivos específicos.....	19
7. Material y métodos.....	20
7.1. Cultivos celulares.....	20
7.2. Ensayo de viabilidad celular.....	20
7.3. Determinación de muerte celular, técnica de TUNEL.....	21
7.4. Fragmentación de DNA en geles de agarosa.....	22
7.5. Inmunofluorescencia.....	23
8. Financiamiento.....	24
9. Equipo, material y reactivos.....	25
10. Resultados.....	26
10.1. Inhibición de la proliferación celular en el ensayo de MTT.....	26

10.2. Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).....	28
10.3. Fragmentación de DNA con técnica de TUNEL.....	31
10.4. Fragmentación de DNA en geles de agarosa.....	32
10.5. Expresión de las proteínas asociadas a apoptosis: Bcl-2, Bax y Citocromo C.....	32
11. Discusión.....	40
12. Conclusión.....	44
13. Referencias.....	45

Índice de figuras

Figura 1.	Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	11
Figura 2.	Expresión de PCNA en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea.....	29
Figura 3.	Expresión de PCNA en la línea FaDu tratada con Cas III-La.....	29
Figura 4.	Expresión de PCNA en la línea A253 tratada con Cas III-Ea.....	30
Figura 5.	Expresión de PCNA en la línea A253 tratada con Cas III-La.....	30
Figura 6.	Células FaDu TUNEL positivas.....	31
Figura 7.	Células A253 TUNEL positivas.....	31
Figura 8.	Patrón de fragmentación de DNA inducido por Casiopeínas®.....	32
Figura 9.	Expresión de Bcl-2 en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea.....	34
Figura 10.	Expresión de Bcl-2 en la línea FaDu tratada con Cas III-La.....	34
Figura 11.	Expresión de Bcl-2 en la línea A253 tratada con Cas III-Ea.....	35
Figura 12.	Expresión de Bcl-2 en la línea A253 tratada con Cas III-La.....	35
Figura 13.	Expresión de Bax en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea.....	36
Figura 14.	Expresión de Bax en la línea FaDu tratada con Cas III-La.....	36
Figura 15.	Expresión de Bax en la línea A253 tratada con Cas III-Ea.....	37
Figura 16.	Expresión de Bax en la línea A253 tratada con Cas III-La.....	37
Figura 17.	Expresión de Citocromo C en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea.....	38
Figura 18.	Expresión de Citocromo C en la línea FaDu tratada con Cas III-La.....	38
Figura 19.	Expresión de Citocromo C en la línea A253 tratada con Cas III-Ea.....	39
Figura 20.	Expresión de Citocromo C en la línea A253 tratada con Cas III-La.....	39

Índice de gráficas

Gráfica 1. Inhibición de la viabilidad celular con Cas III-Ea y III-La en la línea FaDu.....	27
Gráfica 2. Inhibición de la viabilidad celular con Cas III-Ea y III-La en la línea A253.....	27

1. Introducción

Cáncer, es el término que se designa a un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, es generada por cambios en los genes que controlan el crecimiento y sobrevivencia celular, primordialmente. Su principal característica es un proceso descontrolado de rápida y aberrante multiplicación celular que se extienden más allá de los límites normales invadiendo tejidos adyacentes e incluso diseminándose hacia órganos distantes, proceso denominado metástasis (1-3).

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en el mundo; solamente en el año 2015 se registraron alrededor de 14 millones de casos nuevos y aproximadamente 8 millones de defunciones a nivel mundial. Más del 60% de los casos nuevos se presentaron en las regiones de África, Asia, Sudamérica y Centroamérica. Debido a los datos anteriores, se estima que para el año 2030 los casos nuevos de cáncer aumenten en un 50% y las defunciones en un 60% (1, 2).

En la región de cabeza y cuello se desarrollan neoplasias malignas principalmente en la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe. De estas neoplasias, aproximadamente el 95% corresponden a carcinomas de células escamosas. México se encuentra entre los primeros 5 lugares de mayor frecuencia de América Latina con un riesgo relativo de 7.5/100,000 habitantes (4-6).

La alta incidencia del cáncer en la población mexicana ha incentivado la búsqueda y estudio de nuevas posibilidades de tratamiento con los menores efectos secundarios. Así, el reciente uso de blancos intracelulares en las células cancerosas dirigidas hacia moléculas de las vías de transducción que controlan el ciclo celular, apoptosis, angiogénesis e invasión representa un área de gran interés. El grupo de fármacos denominados Casiopeínas® son quelatos formados por un centro metálico de cobre, un ligante aromático y un ligante no aromático. Se ha presentado evidencia de que las Casiopeínas® poseen actividad citotóxica, citostática y

genotóxica (9, 38-42). A nivel celular los blancos de acción de las Casiopeínas® podrían ser la membrana plasmática, las mitocondrias o el DNA, lo que sugiere que el principal mecanismo de acción es la disminución de la respiración mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno previa reducción del átomo de cobre cuya consecuencia sería la inducción de muerte celular por apoptosis, principalmente (7-10).

2. Antecedentes

2.1. Cáncer de cabeza y cuello

GLOBOCAN en México reportó en el año 2012, 147 985 casos nuevos de cáncer, y se estima que para el año 2030, estas cifras incrementen a 255 789 casos nuevos. Específicamente hablando del cáncer de cabeza y cuello, GLOBOCAN, estimó que en el año 2012 medio millón de personas a nivel mundial presentaban cáncer en cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe principalmente, incluyendo también, los que surgieron de glándulas salivales, piel, vasos sanguíneos, músculos y membranas mucosas; donde 320,000 pacientes fallecieron por la misma causa (5, 6, 11).

El carcinoma de células escamosas, que se define según la OMS como el cáncer que comienza en las células escamosas, que son células delgadas y planas que se encuentran en el tejido que forma la superficie de la piel, el revestimiento de los órganos huecos del cuerpo y el revestimiento de los aparatos respiratorio y digestivo; también conocido como carcinoma epidermoide, representa alrededor del 95% de los tumores malignos en la región de cabeza y cuello, con mayor incidencia en hombres (2:1), los sitios de localización más frecuentes son: la lengua 20% a 25% y el piso de boca 15% (1, 2, 12).

El carcinoma de células escamosas es una de las patologías más comunes de la cavidad oral y faringe, se estima que en el mundo aparecen 650,000 nuevos casos al año de carcinoma de

células escamosas en cabeza y cuello (13), dos tercios de estos casos se originan en países en vías de desarrollo. En un estudio retrospectivo realizado en el Hospital General de México en el período 1998-2008 se diagnosticaron más de cinco mil neoplasias, de las cuales 5.7% fueron carcinoma oral de células escamosas (14).

El consumo de alcohol y tabaco son los factores de riesgo más importantes y se les atribuye aproximadamente el 75% de los casos diagnosticados en cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. La infección por Virus Papiloma Humano (VPH) es otro factor de riesgo principalmente en orofaringe. Otros factores asociados son los alimentos salados, ahumados o preservados, la higiene bucal deficiente, un bajo consumo de vitaminas, la exposición ocupacional a componentes químicos generados en las industrias de la construcción, metalurgia, textil, cerámica y maderera, así como la exposición a productos industriales como el níquel y el formaldehído. La exposición a la radiación y los antecedentes de infección por el Virus de Epstein-Barr (VEB), sífilis, VPH y Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), pueden afectar principalmente a las glándulas salivales (2, 15).

El cáncer de glándulas salivales constituye el 3% de las neoplasias presentes en cabeza y cuello. La incidencia aproximada de los tumores de glándulas salivales es de 2.5 a 4 casos por cada 100,000 habitantes, con una proporción similar hombre/mujer y una edad promedio de 45 años, afectando a niños en solo el 5% del total de los casos, lo que la convierte en una enfermedad propia del adulto. En general, cuanto más pequeña es la glándula, más probable es que el tumor sea maligno; así, el 20% de las neoplasias parotídeas son malignas, 50% submandibulares y 60% de glándulas salivales menores (16). Su comportamiento es agresivo, presentan tendencia a recidiva y metástasis en un 50% a 65% de los casos, siendo sus principales sitios de diseminación los ganglios linfáticos, cervicales y pulmonares (17, 18). Los factores etiológicos asociados son alteraciones genéticas como la trisomía y monosomía, tabaquismo, factores dietéticos, virus de

Epstein-Barr, virus de Hepatitis B, antecedentes familiares y el tratamiento previo con radioterapia (19, 20).

2.2. Proliferación y muerte celular en el cáncer

La carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La proliferación e inhibición de la apoptosis son dos procesos importantes en el inicio y promoción del cáncer. La última de estas etapas, progresión, es exclusiva de la transformación maligna e implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia. Para que se lleve a cabo la metástasis se requiere de una serie de mecanismos: angiogénesis, degradación de matrices, migración celular, evasión de la respuesta inmune del hospedero y colonización metastásica (21).

La proliferación celular está formada por diferentes etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente, constituyendo el llamado ciclo de la célula, mismo que es característico de cada tipo celular y está controlado de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Así mismo, cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento específicos que también regulan la proliferación celular. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación ilimitada e incontrolada debido a mutaciones oncogénicas. Para que las mutaciones oncogénicas induzcan cáncer se deben producir en las células en proceso de división, con lo que las mutaciones se transmiten a muchas células de la progenie (22-24).

Por otra parte, la muerte celular corresponde a un mecanismo normal asociado a las células de todo el organismo. Esta muerte ocurre en diferentes formas y momentos durante la vida prenatal y posnatal, por lo que está altamente regulado. Un desbalance molecular puede generar

muerte incrementada asociada a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, o inmunodeficiencias (25) o evasión de la muerte celular, llevando a crecimientos descontrolados asociados a neoplasias (22, 26). Existen diferentes mecanismos asociados a muerte celular, sin embargo, dos de los procesos más estudiados son la apoptosis y la necrosis.

La apoptosis también conocida como muerte celular programada es un proceso biológico fundamental genéticamente regulado. Durante este proceso, las células seleccionadas para morir, disminuyen de tamaño, se condensan para luego fragmentarse y liberar pequeños cuerpos apoptóticos limitados por una membrana, los cuales suelen ser fagocitados por otras células (26-29).

Existen tres tipos principales de cambios bioquímicos que pueden verse en la apoptosis: 1) activación de las caspasas, 2) ruptura del DNA y otras proteínas y 3) cambios de la membrana y reconocimiento por parte de las células fagocíticas (22, 26). La apoptosis para su mayor entendimiento se divide en tres fases, a través de las cuales se van presentando diferentes procesos hasta culminar con la muerte de la célula:

- Fase efectora: se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular, que activa las endonucleasas y proteasas, junto con cambios en el citoesqueleto celular que se traducen a cambios en el tamaño y forma de la célula (25).
- Fase degradativa: durante esta fase, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y con ello se previene un proceso inflamatorio. En esta fase las endonucleasas fragmentan el DNA en 180 a 200 pares de bases, las caspasas degradan las proteínas, y se condensa la cromatina (25).

- Fase de eliminación: los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos a la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas (25).

La apoptosis se puede presentar por dos vías: la vía intrínseca o mitocondrial y vía extrínseca también conocida como vía de caspasas. En la vía extrínseca como consecuencia de la acción secuencial de las proteínas BH3 y de Bax/Bak se produce la liberación hacia el citosol de citocromo C desde el espacio intermembranal de la mitocondria. El citocromo C se une entonces a la proteína adaptadora Apaf-1 que se oligomeriza formando un gran complejo heptamérico (1,4 MDa) llamado apoptosoma 11 que recluta, a través de sus dominios CARD, a una cisteín-proteasa llamada caspasa 9. Su unión al apoptosoma causa un cambio conformacional en la caspasa 9 lo que provoca su activación y el inicio una serie de reacciones proteolíticas conocidas como la "cascada de las caspasas". Las caspasas activas ocasionan la rotura controlada de proteínas y estructuras celulares, desmontando ordenadamente la célula y dando lugar al fenotipo apoptótico (25, 29) (Figura 1).

En la vía intrínseca también llamada vía mitocondrial, las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal, entre ellas, el citocromo C. Éste una vez en el citosol, activa un complejo protéico llamado apoptosoma, que activa directamente a la caspasa 9. Una vez que la caspasa 9 se ha activado, activa a la caspasa efectora cas 3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis. De dicho poro, también se libera SMAC/Diablo que bloquea la acción de las Proteínas Inactivadoras de la Apoptosis (PIA) y el Factor Inductor de Apoptosis (FIA) que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas (29-31) (Figura 1).

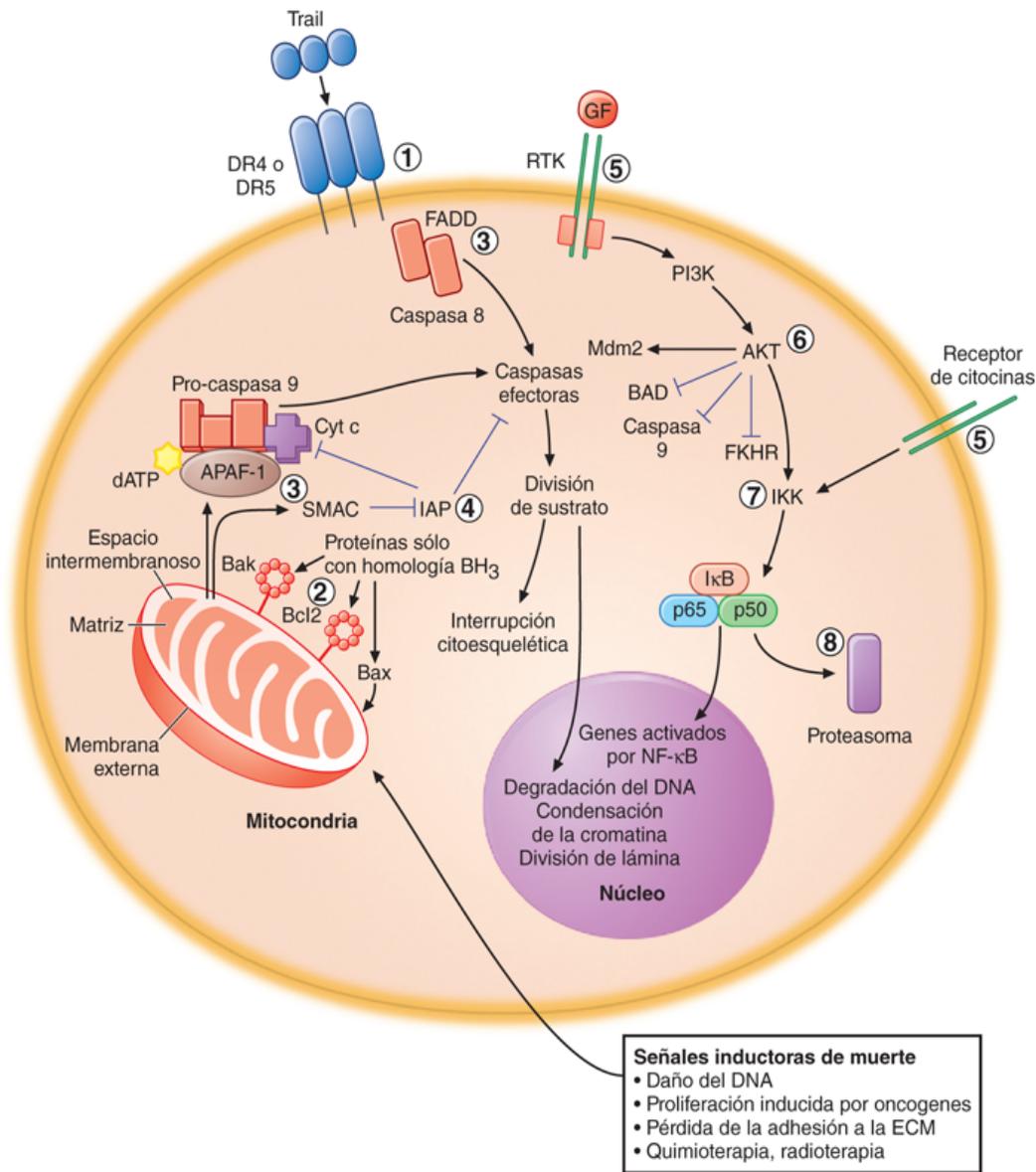


Fig. 1. Vías extrínseca e intrínseca

Jeffrey W. Clark; Dan L. Longo. Harrison. Principios de Medicina Interna. 19e: Biología de la célula cancerosa.

La necrosis es el resultado de un daño celular masivo, definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular. Es un proceso que no requiere de energía, las células necróticas muestran

tumefacción mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico y vacuolización del citoplasma, sin vesiculación de la membrana celular generando lisis. Se observa pérdida de la regulación de la homeostasis iónica por lo que la célula se hincha. A medida que la célula muere, el citoplasma pierde definición. Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inespecífica del DNA: picnosis nuclear o pérdida de volumen, ligera condensación del DNA y aumento de la basofilia nuclear. El contenido celular es liberado al espacio intercelular, dañando a las células vecinas y generando un proceso inflamatorio (29, 32, 33).

2.3. Quimioterapia en neoplasias de cabeza y cuello

La quimioterapia es un tipo de tratamiento utilizado para el cáncer, que ayuda a destruir las células cancerosas, deteniendo o haciendo más lento su crecimiento. La quimioterapia se utiliza con el propósito de curar el cáncer, reducir las posibilidades de una recidiva, lentificar su crecimiento y disminuir el tamaño de los tumores. La quimioterapia se puede usar como tratamiento independiente o en conjunto con otros más. Cuando se utiliza para disminuir la lesión antes de la cirugía o radioterapia, se conoce como quimioterapia neoadyuvante. Cuando se usa para destruir las células cancerosas que puedan haber quedado después de cirugía o quimioterapia, se le conoce como quimioterapia adyuvante (2). La quimioterapia a menudo se administra como una combinación de medicamentos. Generalmente, las combinaciones funcionan mejor que los medicamentos únicos porque eliminan por diferentes vías a la mayoría de las células cancerosas.

En la quimioterapia para tumores de cabeza y cuello principalmente carcinoma de células escamosas, se emplea la combinación de Docetaxel+Cisplatino+Fluorouracilo (2). La FDA reconoce también el uso metotrexato, bleomicina, cetuximab, hidroxiurea, nivolumab, doxetacel, pembrolizumab en tumores para la región de cabeza y cuello. Solo el cisplatino incorpora metal en

su fórmula, sin embargo, es un compuesto metal precioso y muy escaso, de costo muy alto y efectos secundarios muy agresivos (2, 34).

En general los fármacos utilizados generan una amplia gama de efectos tales como anemia, pérdida de apetito, sangrado y hematomas, estreñimiento, delirio, diarrea, edema, fatiga, infertilidad e niños y hombres, infertilidad en niñas y mujeres, alopecia, linfedema, pérdida de memoria o concentración, infecciones en boca y garganta, náuseas y vómito, neuropatía periférica, dolor, cambios en el aspecto de piel y uñas, insomnio, problema para orinar y en la vejiga (2, 35).

2.4. Compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas®)

Las Casiopeínas® contienen como centro a metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn) y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoácidos o donadores (OO) con fórmula general $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$. Algunas de estas Casiopeínas® han probado su efecto sobre células tumorales resistentes a cisplatino (36, 37). Se han sintetizado aproximadamente 100 de estos compuestos, y algunos han mostrado actividad citotóxica y antineoplásica *in vitro* e *in vivo*. La Cas III-Ea $[Cu(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]NO_3$ se ha desarrollado específicamente como un fármaco antineoplásico y citotóxico que actúa contra las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino humano (HeLa y CaLo) y, glioma C6 de rata (9, 38-42)

La Cas III-La $[(Cu(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]NO_3$ presentan actividad antineoplásica en las líneas murinas de melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis LW1, así como en ratones desnudos xenotrasplantados con MCF7 de carcinoma humano de mama y, HCT15 (carcinoma de colon), ambos altamente metastásicos (38).

Poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares por los cuales las Casiopeínas® ejercen sus efectos antineoplásicos y citotóxicos, particularmente en neoplasias de cabeza y cuello. Sin embargo, se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos son tóxicos en

diferentes organismos. Esta toxicidad se ha adjudicado a los iones metálicos, en especial a los iones de Cu y Fe por su potencial para generar especies reactivas de oxígeno (ERO) (39). Las Casiopeínas® pueden inducir apoptosis mediante la generación de ERO (43), a través del factor transcripcional AP-1, regulador de genes que codifican citocinas, receptores de citocinas, y moléculas de adhesión, que inducen respuestas inflamatorias e inmunológicas. (7, 9, 40, 41).

Las Casiopeínas® han presentado actividad antineoplásica en glioblastoma multiforme, que es una de las neoplasias más frecuentes y agresivas para el sistema nervioso central. En condiciones *in vivo* e *in vitro* se observó que la Cas III-La, ejerce un efecto antiproliferativo al disminuir la viabilidad celular y los niveles de expresión de PCNA, promueve la muerte celular mediante inducción de apoptosis determinada por el aumento de la proteína pro-apoptótica Bax y la activación de la caspasas ejecutora 3, lo que sugiere que la Cas III-La es un potente agente terapéutico para el glioblastoma multiforme (44). En un segundo estudio realizado *in vitro* con el objetivo de determinar el efecto de la Cas III-Ea en la eliminación de células primitivas de leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC), se observó que la Cas III-Ea es capaz de disminuir la población mononuclear de ambas leucemias mediante la reducción de viabilidad, inhibición de proliferación, así como inducción de apoptosis y especies reactivas de oxígeno, efecto que se detectó en células primitivas de LMC pero no de LMA, por lo que se concluyó que la Cas III-Ea tiene un efecto anti-leucémico preferencial en líneas celulares de leucemias mieloides y poblaciones primitivas de LMC, favoreciendo con ello la eliminación de las CTL responsables de la permanencia de la enfermedad (45).

3. Planteamiento del problema

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de defunciones a nivel mundial con 8 millones de casos registrados por la OMS en 2015. En México, en el año 2014 se registró un total de 605,000 muertes. En cáncer en cabeza y cuello las estadísticas revelan que la incidencia va en aumento debido principalmente al consumo de alcohol y tabaco, así como a las infecciones por el VPH. Diversas investigaciones han enfocado sus esfuerzos a erradicar las células neoplásicas mediante fármacos, lo que frecuentemente ha resultado en efectos adversos sistémicos y citotóxicos y, resistencia a la terapia. El descubrimiento de blancos específicos en las células cancerosas ha llevado a innovar en el desarrollo racional de terapias específicas que pueden afectar diversos componentes clave de las vías de transducción de señales, mismas que controlan el ciclo celular, apoptosis, angiogénesis e invasión (1).

En nuestro país, el interés por encontrar terapias alternativas más efectivas y menos agresivas para los pacientes ha estimulado la evaluación de compuestos como las Casiopeínas®. Aunque estos fármacos han probado sus efectos antineoplásicos en diferentes tipos de tumores *in vivo* e *in vitro*, han sido escasamente estudiados en cabeza y cuello por lo que su evaluación representa un campo de investigación altamente prometedor.

4. Justificación

Los esfuerzos por erradicar las células cancerosas con diversos fármacos, generan efectos secundarios adversos para el paciente así como el desarrollo de resistencia a la terapia. Desafortunadamente, el daño generado por el fármaco no necesariamente se expresa con la muerte de las células cancerosas, efecto principalmente relacionado con la evasión de la muerte celular y a una continua proliferación desregulada que lleva al desarrollo y progresión del cáncer.

Recientemente, el descubrimiento de blancos específicos en las células cancerosas ha llevado al desarrollo racional de la "terapia dirigida". Las Casiopeínas® son fármacos diseñados, y dirigidos específicamente a diversos componentes de las vías de transducción de señales intracelulares que controlan el ciclo celular, apoptosis y angiogénesis. Estos fármacos han probado su eficacia en neoplasias de mama, cérvix, colon y glioblastoma. Sin embargo, y a pesar de su gran efectividad, aún no han sido ampliamente estudiados en la región de cabeza y cuello.

El precio de estos fármacos es más económico que el de otros antineoplásicos, ya que el gasto actual por quimioterapias de platino alcanzaría para tratar a diez pacientes con compuestos de cobre, además de los menores efectos secundarios. Así mismo, dado que el cobre es un metal esencial y se encuentra presente de manera natural en el cuerpo, el organismo lo puede metabolizar más fácilmente en comparación con el platino (40).

Con base en los diversos estudios que se han realizado acerca de las Casiopeínas®, el presente estudio busca establecer el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de dos compuestos de coordinación de cobre: Casiopeína III-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ y Casiopeína III-La [(Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ para explorar por primera vez dicho potencial *in vitro* en dos neoplasias de cabeza y cuello: carcinoma de células escamosas de hipofaringe y adenocarcinoma

de glándulas salivales. Dicho conocimiento abundará en la comprensión de los mecanismos antineoplásicos de dichos fármacos y su uso futuro en el tratamiento de este tipo de neoplasias.

6. Hipótesis

Si las Casiopeínas® Cas III-Ea y Cas III-La muestran un efecto antineoplásico sobre las líneas celulares FaDu y A253 *in vitro*, se observará disminución de la viabilidad celular e inducción de apoptosis a distintas dosis de los fármacos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de las Casiopeínas® III-Ea y III-La en las líneas celulares de carcinoma de células escamosas de hipofaringe (FaDu) y adenocarcinoma de glándulas salivales (A253) *in vitro*.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de los fármacos Casiopeínas® III-Ea y III-La sobre las líneas celulares FaDu y A253 *in vitro*, mediante la determinación de la viabilidad celular usando el ensayo de MTT y determinación de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por inmunofluorescencia.
2. Determinar la inducción de muerte celular mediante el análisis del ADN cromosomal en geles de agarosa al 2% y TUNEL.
3. Determinar la inducción de apoptosis mediante el análisis de la inmunoexpresión de las proteínas asociadas a apoptosis Bcl-2, Bax y citocromo C.

7. Material y métodos

7.1. Cultivos celulares

Se utilizaron las líneas celulares FaDu (carcinoma de células escamosas de hipofaringe) y A253 (adenocarcinoma de glándula salival submaxilar). Las células se mantuvieron en medio DMEM y se suplementaron con suero fetal bovino al 10%, penicilina G (60 mg/L) y estreptomicina (100 mg/L), en un gabinete de bioseguridad (37°C, 5% CO₂ y 95% de O₂).

7.2. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular por MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliorrealizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (46, 47). El procedimiento se realizó por triplicado.

1. En cajas de 96 pozos fueron sembradas 10,000 células por pozo y se incubaron en condiciones óptimas para el manejo del cultivo de ambas líneas celulares.
2. Posteriormente se trataron con las Cas III-Ea y Cas III-La a las dosis 1, 3 y 5 µg/ml y se incubaron por 24 h, junto con su respectivo control (grupo de células sin tratamiento). Se trataron con MTT 10 µL por pozo y se incubaron por 4 h a 37°C en atmósfera húmeda.
3. Pasadas las 4 h, se agregaron 100 µL de solución solubilizadora (reactivo no.2) .
4. Después de 24 h se cuantificó con lector de placas de Elisa con un rango de 550 a 600 nm para evaluar la correlación de las células no tratadas con las tratadas a dosis de 1, 3 y 5 µg/ml de las Cas III-Ea y Cas III-La, respectivamente.
5. Se determinó el porcentaje de muerte celular a través del prueba de Tukey y ANOVA.

7.3. Determinación de muerte celular, técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferasa)

Se evaluaron los rompimientos de DNA sugestivos de muerte celular por apoptosis, mediante la técnica de TUNEL. Esta técnica se implementa para determinar los fragmentos de DNA cortados por la acción de endonucleasas marcándolos colorimétrica y fluorescentemente mediante la enzima desoxinucleótido transferasa terminal (TdT) que detecta el rompimiento del extremo libre de 3'-OH del DNA, para posteriormente observarse en un microscopio de fluorescencia (24). Se procedió como sigue:

1. Se sembraron 500,000 células en cajas de 8 pozos y se incubaron a 37° en atmósfera húmeda.
2. Las células fueron tratadas con Cas III-Ea y Cas III-La a las dosis 1, 3, y 5 µg/ml durante 24 h. El grupo control continuó con medio DMEM.
3. Se eliminó el tratamiento y se lavó pozo por pozo 2 veces cada uno con 500 µl de PBS 0.1 M pH 7.4 estéril.
4. Para fijar las células, se agregaron 500 µl de paraformaldehído al 4% y se dejó actuar durante 1 h a 4°C.
5. Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citrato (pH 6).
6. Se colocó albúmina bovina en cada pozo para bloquear la inespecificidad de nuestro marcador.
7. Se colocaron 50 µl TUNEL en los pozos durante 1 h.
8. Se cubrieron las laminillas con Vectashield.
9. Se visualizaron las laminillas mediante microscopio de fluorescencia para tomar las microfotografías.

7.4. Fragmentación de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de DNA que no pueden separarse por otros procedimientos. El DNA puede localizarse en el gel tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, (agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante).

Uno de los procesos que se asocian con la apoptosis es la degradación de DNA de forma específica entre nucleosomas. Durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el DNA a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de DNA de células apoptóticas es posible observar la aparición de un patrón característico de DNA en escalera (*ladder DNA*), el cual contiene fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera.

1. Las células fueron tratadas en las condiciones previamente descritas con Cas III-La y Cas III-Ea. A las 24 horas se obtuvieron 2×10^6 células por cada línea celular y por tratamiento y se usó el Apoptotic DNA ladder kit (Roche®) para obtener muestras de DNA.
2. Se prepararon geles de agarosa al 2% añadiendo 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y se cargaron por carril 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por cada muestra para realizar un corrimiento electroforético de 5 - 10 V/cm durante 45 minutos.
3. Los geles fueron llevados a un transiluminador UV (UVP ®) y se fotografiaron para analizar sus resultados.

7.5. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de alta especificidad y afinidad donde se emplean anticuerpos, los cuales reconocen moléculas y se unen a ellas. Además, la combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido (24, 48, 49). Se realizó la técnica de inmunofluorescencia para determinar la muerte celular vía mitocondrial con las proteínas PCNA, Bcl-2, Bax y citocromo C como anticuerpo primario y fluorocromo FITC como secundario.

1. Se sembraron 500,000 células en cajas de 8 pozos y se incubaron en condiciones óptimas para el manejo del cultivo celular, previamente descrito.
2. Las células fueron tratadas con Cas III-Ea y Cas III-La a las dosis 1, 3, y 5 µg/ml durante 24 horas y un grupo control solo con DMEM.
3. Se eliminó el tratamiento y se lavó pozo por pozo 2 veces con 500 µl de PBS 0.1 M pH 7.4 estéril. Estos lavados se repitieron entre cada uno de los pasos siguientes.
4. Para fijar las células se agregaron 500 µl de paraformaldehído al 4% y se dejó actuar durante 1 h.
5. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos (pH 6).
7. Se sumergieron las laminillas en Tritón X100 al 0.2% durante 10 minutos.
8. Se incubó durante 20 min con 150 µl de albúmina bovina al 0.04% en cada pozo.
9. Los anticuerpos primarios con una dilución de 1:100 fueron incubados y se dejaron actuar por 2 h en cámara húmeda.
10. Se incubaron los anticuerpos secundarios con una dilución de 1:100 durante 1 h en cámara húmeda.
11. Se colocó Vectashield con DAPI para el montaje.
12. Visualización en microscopio LAS X WidefieldSystems.

8. Financiamiento

El presente estudio se realizó con apoyo del proyecto UNAM DGAPA-PAPIIT IN221616. La alumna Cynthia Magaly Sánchez Vaca es becaria del citado proyecto.

9. Equipo, material y reactivos

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
-Campana de flujo laminar, ThermoScientific 1300 series A2.	-Placas de cultivo de 25 y 75 cm Corning ^R .	-Líneas celulares: A253 y FaDu.
-Centrífuga clínica Z 100 A Labnet	-Microplacas de 96 pozos BIOSELEC S.A. DE C.V.	-Medio DMEM Sigma Aldrich.
-Microcentrífuga refrigerada SelectBioproductosSelect spin	-Tubos para centrífuga estériles de 15 ml.	-Suero fetal bovino (BY productos).
-Microscopio Invertido Optika 500 biph	- Microtubos de 1.5µlestériles.	-Anfotericinab/ estreptomycin (Sigma Aldrich).
-Microscopio de luz Zeiss.	-Pipetas de poliestireno estériles de 5 y 10 ml Corning ^{MR} .	-Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma Aldrich).
-Microscopio LAS X WidefieldSistems		-Bicarbonato de sodio J.T. (Baker).
-In Situ Cell Death Detection kit (Roche [®] Diagnostic Inc., USA)		-Cloruro de sodio J.T. (Baker).
		-Buffer de lisis (Sigma Aldrich).
		-MTT assay (Bioselec).
		-Anticuerpos primarios: anti-PCNA, anti-citocromo C, anti-Bcl2, anti-Bax (Santa CruzBiothecnology).
		-Anticuerpos secundarios: anti-mouse y anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology).
		-Albumina bovina(J.T. Baker).
		-PBS 0.1 M pH 7.4
		-Paraformaldehído 4% (J.T. Baker).
		-Buffer de citratos.
		- Bromuro de etidio(Sigma Aldrich).
		- UltraPure Agarosa (Invitrogen).
		- Apoptotic DNA ladder kit (Roche [®] Diagnostic Inc., USA)

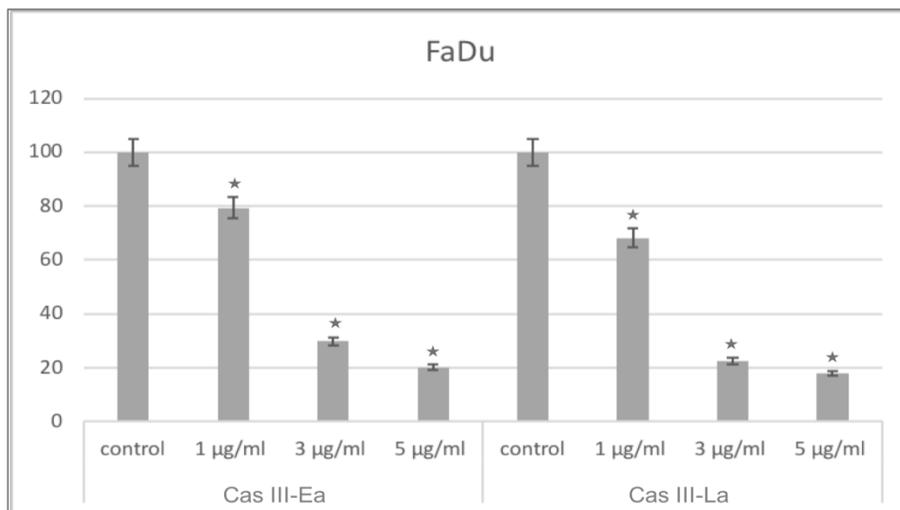
10. Resultados

10.1. Inhibición de la proliferación celular en el ensayo de MTT

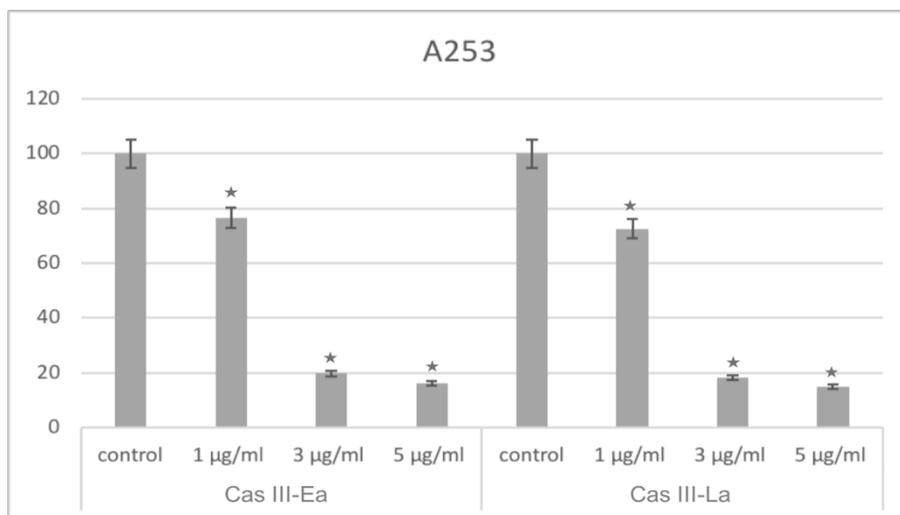
Para analizar la viabilidad celular en presencia de Cas III-Ea y Cas III-La, cultivos de la línea celular FaDu y A253 fueron tratados con las dosis 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ e incubados por 24 hr. El grupo control se mantuvo con DMEM y se determinó la viabilidad celular por MTT. En las dosis utilizadas de ambas Casiopeínas® se observó una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa (*, $P \leq 0.0001$)(Gráficas 1 y 2).

La Cas III-La mostró resultados más significativos en FaDu y en A253, reduciendo la viabilidad celular en más del 30% a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ en la línea celular FaDu y, más del 20% en la línea celular A253. En la concentración más alta de 5 $\mu\text{g/ml}$ se redujo la viabilidad celular hasta un 83% en FaDu y, 86% en A253.

La Cas III-Ea redujo la viabilidad celular en su concentración más baja de 1 $\mu\text{g/ml}$ en FaDu(20%) y A253 (14%). En la línea celular FaDu, a la concentración más alta de 5 $\mu\text{g/ml}$ se redujo la viabilidad celular hasta un 80%. Por su parte, A253 redujo la viabilidad celular hasta un 84% a la misma dosis. Se muestra así el efecto anti-proliferativo dosis dependiente de ambas Casiopeínas® en las líneas celulares estudiadas.



Gráfica 1. Inhibición de la viabilidad celular con Cas III-Ea y III-La en la línea FaDu. La viabilidad medida por MTT mostró que el efecto es dosis dependiente y que la mayor actividad se observó a la dosis de 3µg/ml. Los datos representan la media ± DE (*, P≤0.0001).



Gráfica 2. Inhibición de la viabilidad celular con Cas III-Ea y Cas III-La en la línea A253. La viabilidad medida por MTT mostró que el efecto es dosis dependiente y que la mayor actividad se observó a la dosis de 3 µg/ml. Los datos representan la media ± DE (*, P≤0.0001).

10.2. Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Mediante la determinación de la expresión de PCNA se evaluó cualitativamente el efecto de las Casiopeínas® III-Ea y III-La en las líneas celulares FaDu y A253. En ambas líneas celulares, se observó disminución significativa de las células adheridas a la matriz del pozo a partir de la dosis de 3 µg/ml debido a que a mayor dosis mayor número de células desprendidas por muerte, por lo que en la dosis 5 µg/ml se encontraron muy pocas o ninguna célula. (Fig.2 a Fig.5)

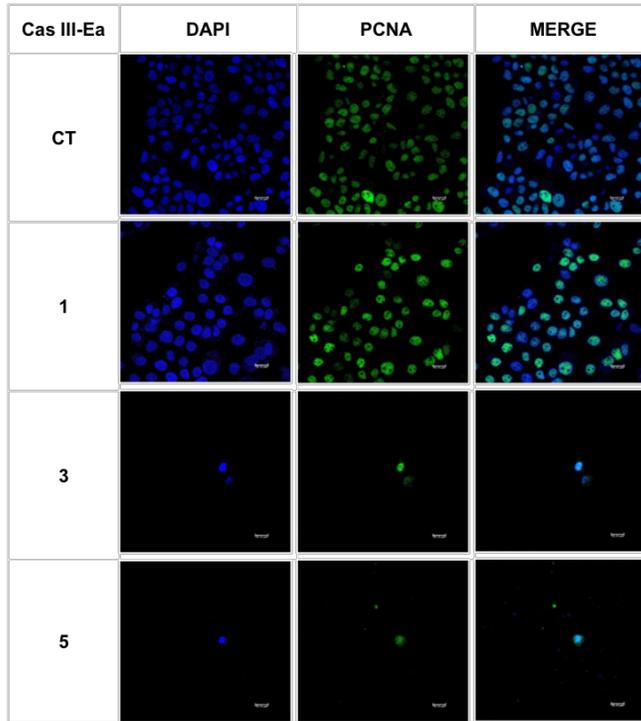


Fig. 2. Expresión de PCNA en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea. En los grupos experimentales 3 y 5 µg/ml se observa disminución en el número de células adheridas y positivas a PCNA.

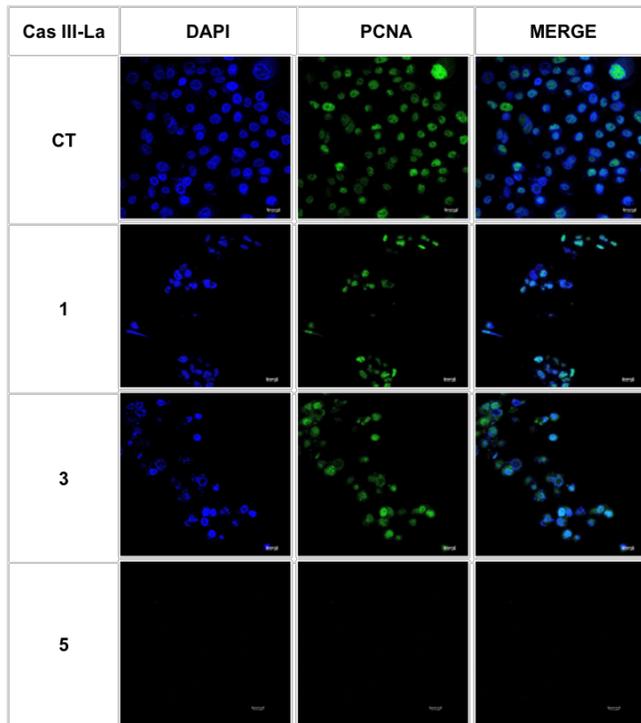


Fig. 3. Expresión de PCNA en la línea FaDu tratada con Cas III-La. En los grupos experimentales 1, 3 y 5 µg/ml se observa disminución en el número de células adheridas y positivas a PCNA.

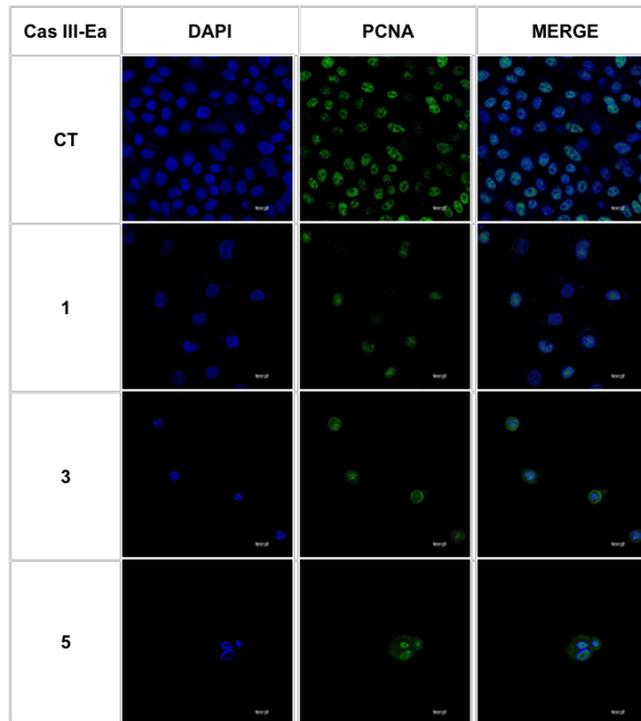


Fig. 4. Expresión de PCNA en la línea A253 tratada con Cas III-Ea. En los grupos experimentales 1, 3 y 5 µg/ml se observa disminución en el número de células adheridas y positivas a PCNA.

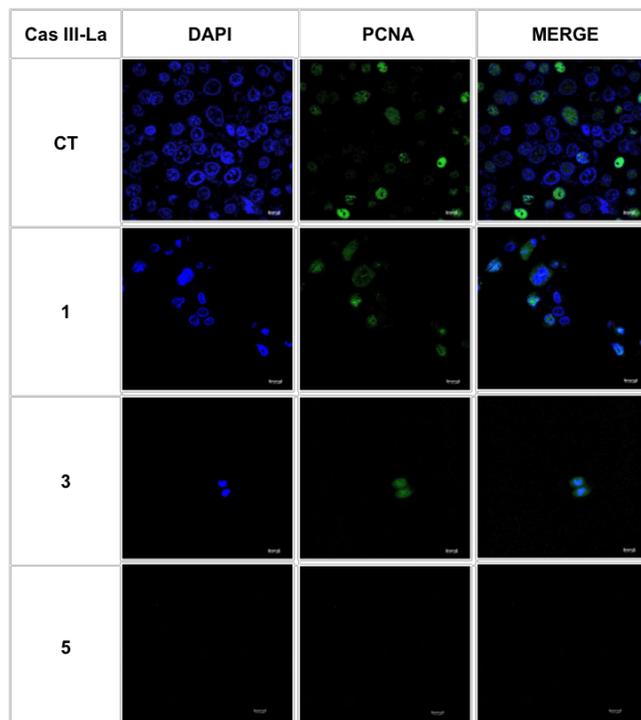


Fig. 5. Expresión de PCNA en la línea A253 tratada con Cas III-La. En los grupos experimentales 1 y 3 µg/ml se observa disminución en el número de células adheridas y positivas a PCNA.

10.3. Fragmentación de DNA con técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferasa)

En los resultados se observa un TUNEL positivo en las dosis 1 y 3 µg/ml siendo relevante la dosis 3 µg/ml, mientras que en la dosis 5 µg/ml ya no se observaron células debido a su desprendimiento por muerte celular como se puede observar en las figuras 6 Y 7.

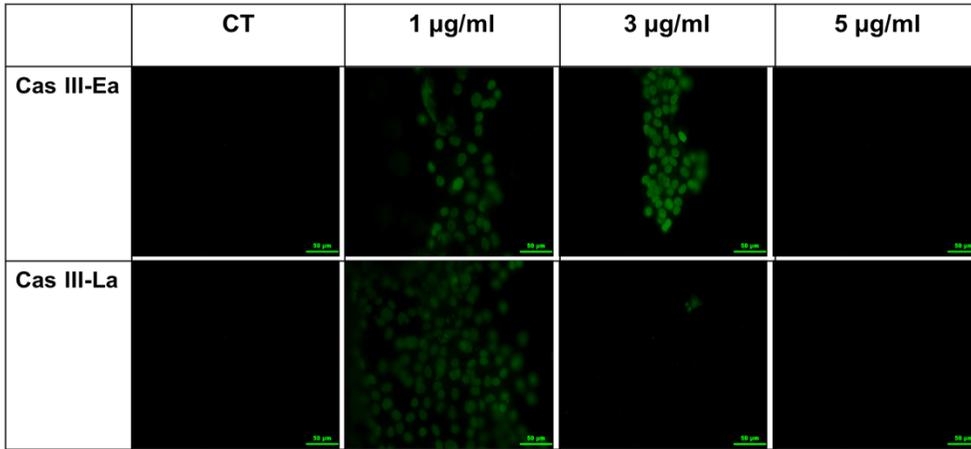


Fig. 6. Células FaDu TUNEL positivas tratadas con Cas III-Ea y Cas III-La durante 24 horas.

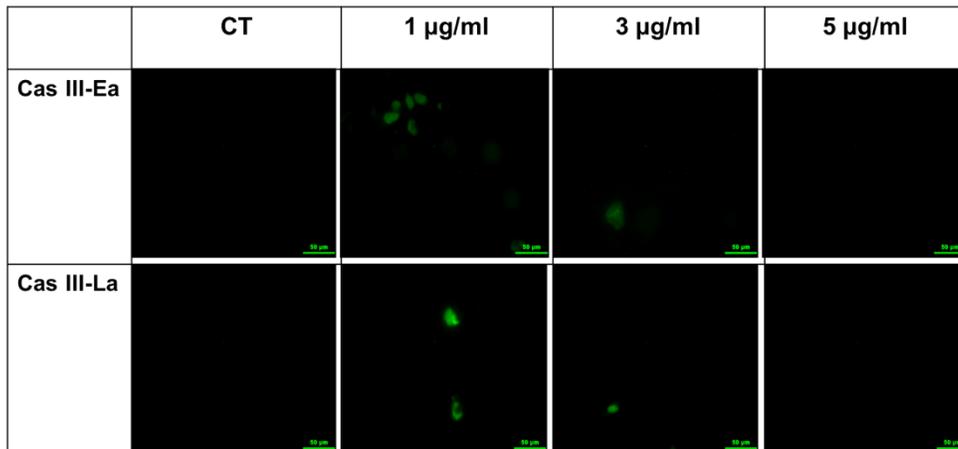


Fig. 7. Células A253 TUNEL positivas tratadas con Cas III-Ea y Cas III-La durante 24 horas.

10.4. Fragmentación de DNA en geles de agarosa

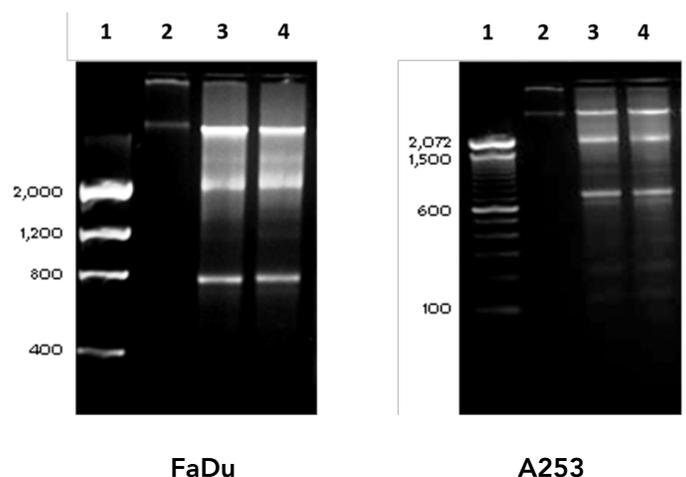


Fig. 8. Patrón de fragmentación de DNA inducido por Casiopeinas®. Células de cultivo FaDU y A253 fueron tratadas con las Casiopeinas® III-Ea y III-La y durante 24 h concentración 3 $\mu\text{g/ml}$. Los fragmentos de DNA fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de pb; carril 2: células no tratadas; carril 3: células tratadas con Cas III-Ea; carril 4: células tratadas con Cas III-La.

10.5. Expresión de las proteínas asociadas a apoptosis: Bcl-2, Bax y Citocromo C

Las dos líneas celulares FaDu y A253 mostraron reducción en el número de células en todos los grupos experimentales a las concentraciones 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de forma dosis dependiente (Fig.9 a Fig. 20). En las figuras 9 y 11 se puede observar que en el grupo control no existe expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, mientras que en las figuras 10 y 12 la expresión de Bcl-2 se encuentra al máximo, en las figuras 9, 10 y 12, la expresión de Bcl-2 disminuye junto con el número de células y la reducción en la viabilidad celular, pero en la figura 11 la expresión de Bcl-2 se mantiene activa en las concentraciones 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$.

En las figuras 13, 14, 15 Y 16 se puede observar que no existe expresión de la proteína proapoptótica Bax en el grupo control, sin embargo en las concentraciones 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ la expresión de Bax comienza a aparecer y mantenerse, cabe recalcar que el número de células va disminuyendo dosis dependiente debido a la muerte celular y al desprendimiento de las mismas.

En las figuras 17, 18, 19 Y 20 la expresión de Citocromo C se pudo observar desde el grupo control y en las concentraciones 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ se mantiene activa, sin embargo, el número de células disminuyó de forma dosis dependiente y las células se desprendieron, pero la expresión de Citocromo C se mantuvo.

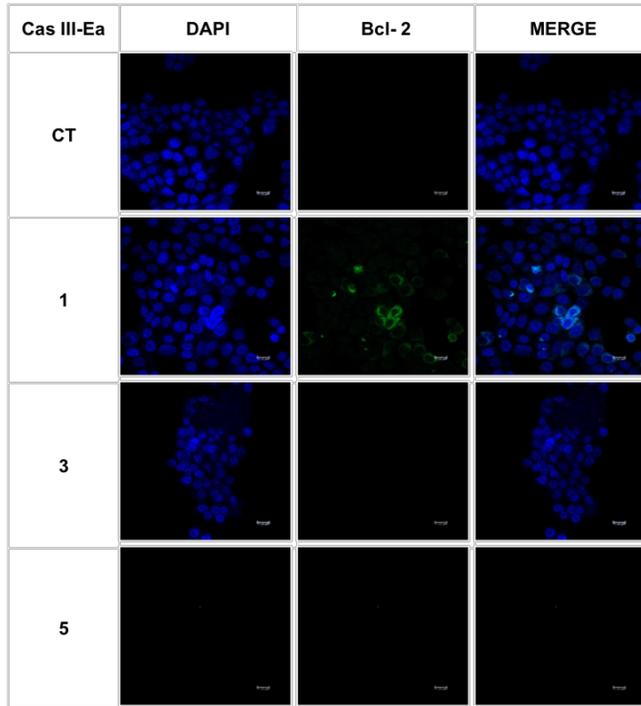


Fig.9. Expresión de Bcl-2 en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y la dosis 3 µg/ml la nula expresión de Bcl-2. En los grupos experimentales se muestra disminución en el número de células en la concentración 1µg/ml. misma donde se observa la expresión de Bcl-2. En la concentración 5 µg/ml no se observan células en los campos ópticos estudiados.

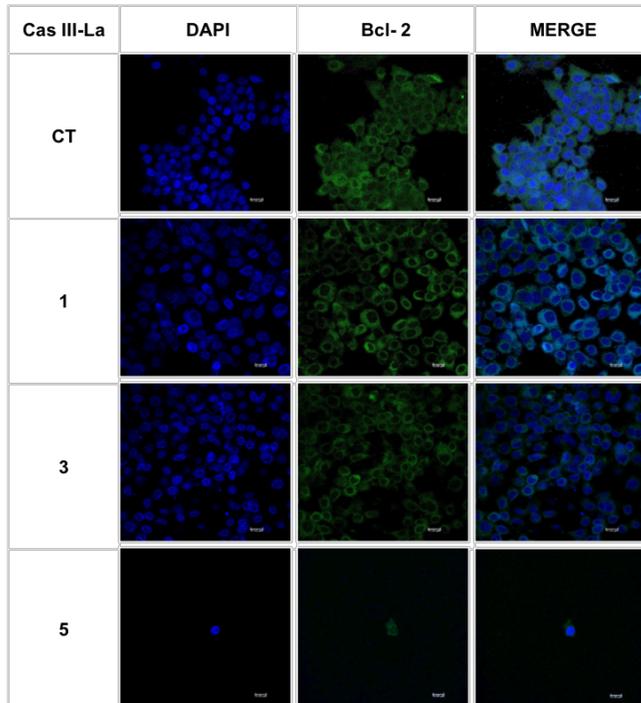


Fig. 10. Expresión de Bcl-2 en la línea FaDu tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control la expresión de Bcl-2 en la línea celular FaDu. En los grupos experimentales se observa disminución en el número de células positivas a Bcl-2 en las concentraciones 1, 3 y 5 µg/ml, siendo más relevante la concentración 5 µg/ml.

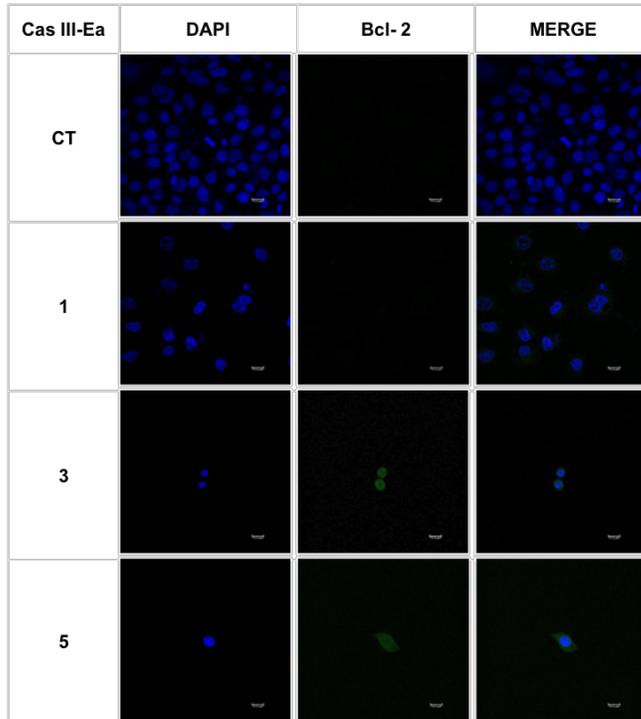


Fig. 11. Expresión de Bcl-2 en la línea A253 tratada con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y la dosis 1 µg/ml nula expresión de Bcl-2 en la línea celular A253. En los grupos experimentales se observa disminución en el número de células y presencia de células positivas a Bcl-2 en las concentraciones de 3 y 5 µg/ml.

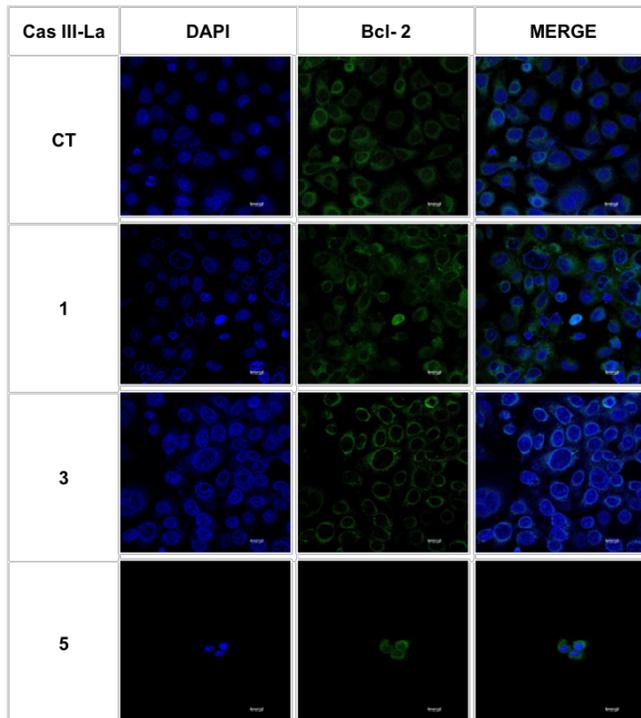


Fig. 12. Expresión de Bcl-2 en la línea A253 tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y las concentraciones 1, 3 y 5 µg/ml la expresión de Bcl-2. En los grupos experimentales se observa disminución en el número de células positivas a Bcl-2.

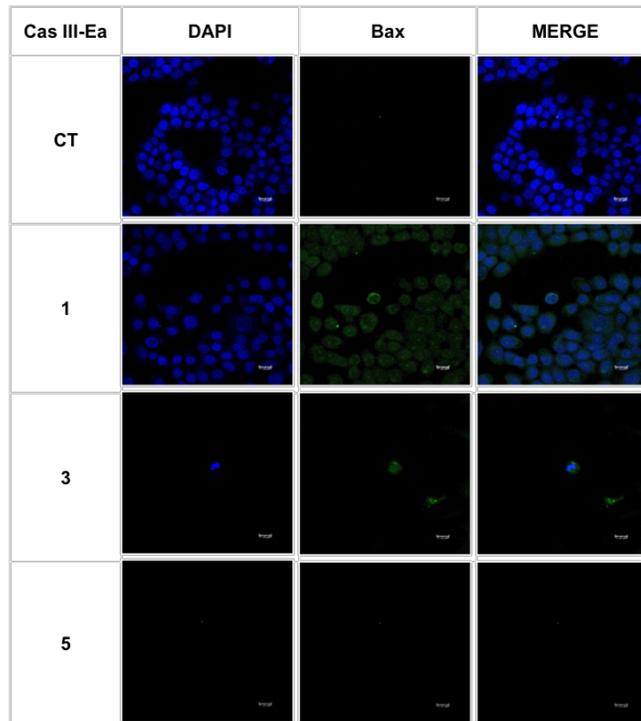


Fig. 13. Expresión de Bax en la línea FaDu tratadas con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control nula expresión de Bax en la línea celular FaDu. En los grupos control se observa disminución en el número de células en las concentraciones 1 y 3 µg/ml, mismas donde se muestran la expresión positiva a Bax. En la concentración 5 µg/ml no se observan células en los campos ópticos.

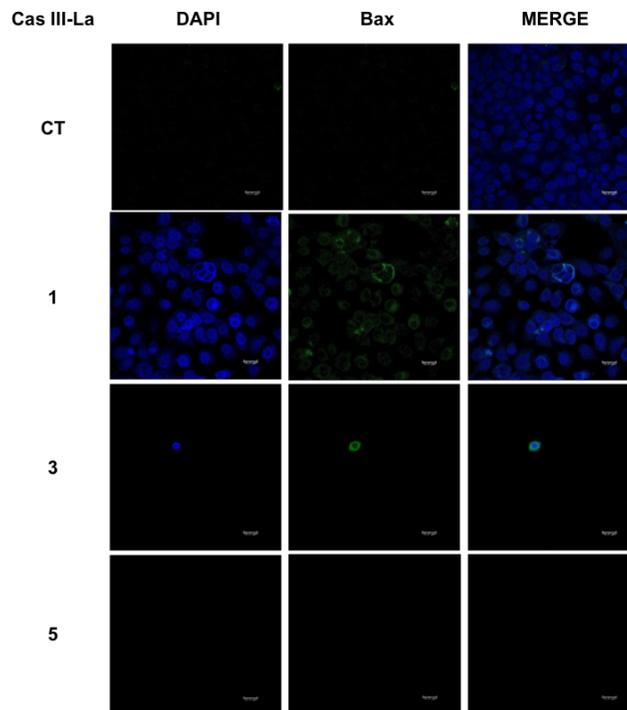


Fig. 14. Expresión de Bax en la línea FaDu tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control nula expresión de Bax en la línea celular FaDu. En los grupos experimentales se muestra disminución en el número de células dosis dependiente y en las concentraciones 1 y 3 µg/ml se observan células positivas a Bax, mientras que en la concentración 5 µg/ml no se observan células en los campos ópticos estudiados.

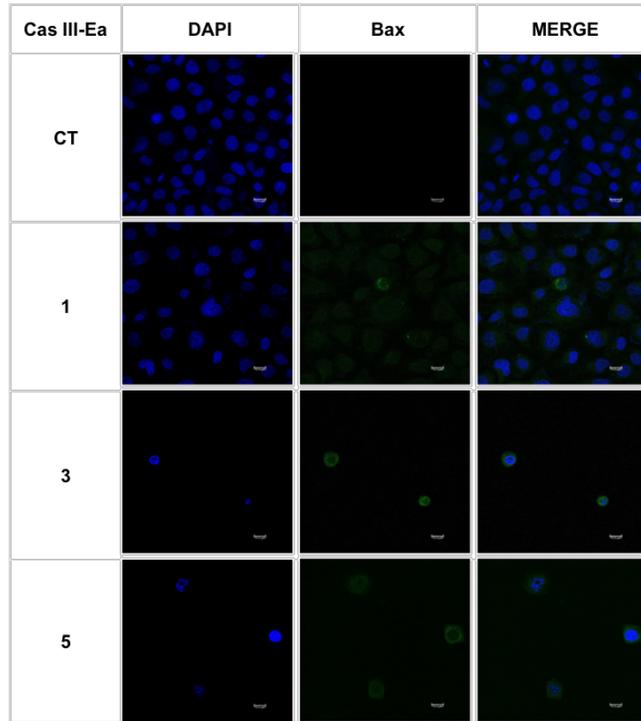


Fig. 15. Expresión de Bax en la línea A253 tratada con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control nula expresión de Bax en la línea celular A253. En los grupos experimentales se muestra disminución en el número de células positivas a Bax en las concentraciones 1, 3 y 5 µg/ml.

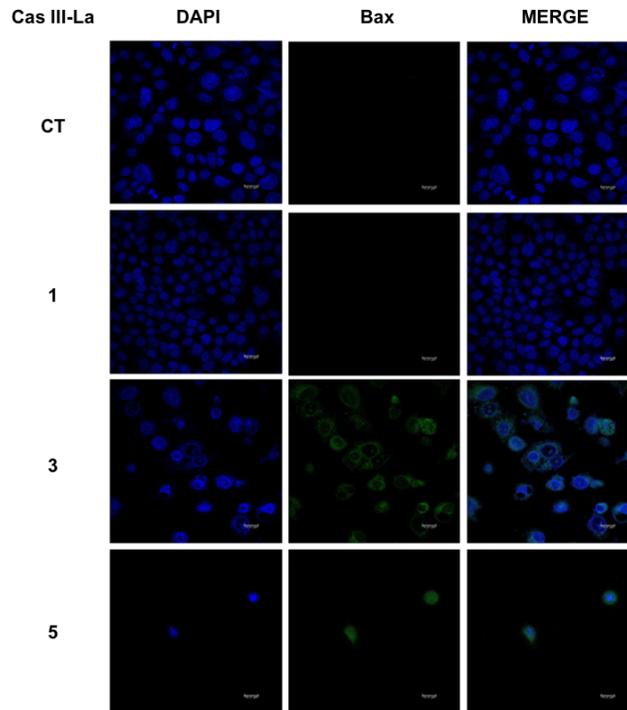


Fig. 16. Expresión de Bax en la línea A253 tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y la concentración 1 µg/ml nula expresión de Bax en la línea celular A253. En los grupos experimentales, se muestra disminución en el número de células dosis dependiente y en las concentraciones 3 y 5 µg/ml se observa la expresión positiva a Bax.

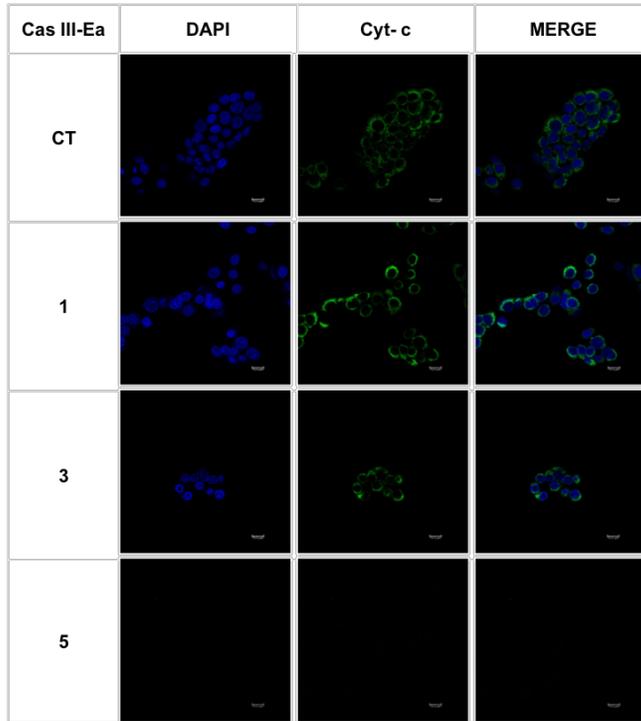


Fig. 17. Expresión de Citocromo C en la línea FaDu tratada con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control la expresión de Citocromo C en la línea celular FaDu. En los grupos control se muestra disminución en el número de células a las concentraciones 1 y 3 µg/ml. en la concentración 5 µg/ml no se observan células en los campos ópticos estudiados.

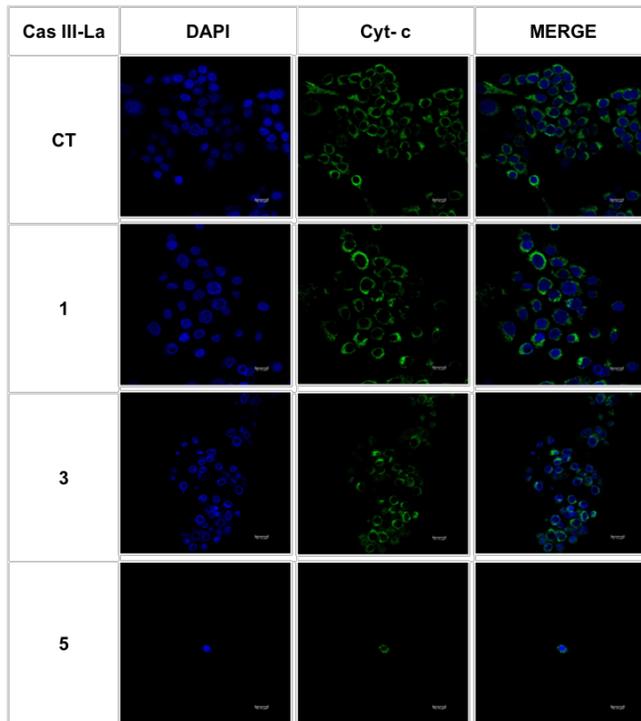


Fig. 18. Expresión de Citocromo C en la línea FaDu tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y las dosis 1, 3 y 5 µg/ml la expresión de Citocromo C en la línea celular FaDu. En los grupos experimentales se muestra disminución en el número de células en las dosis 1, 3 y 5 µg/ml, siendo más relevante la concentración 5 µg/ml.

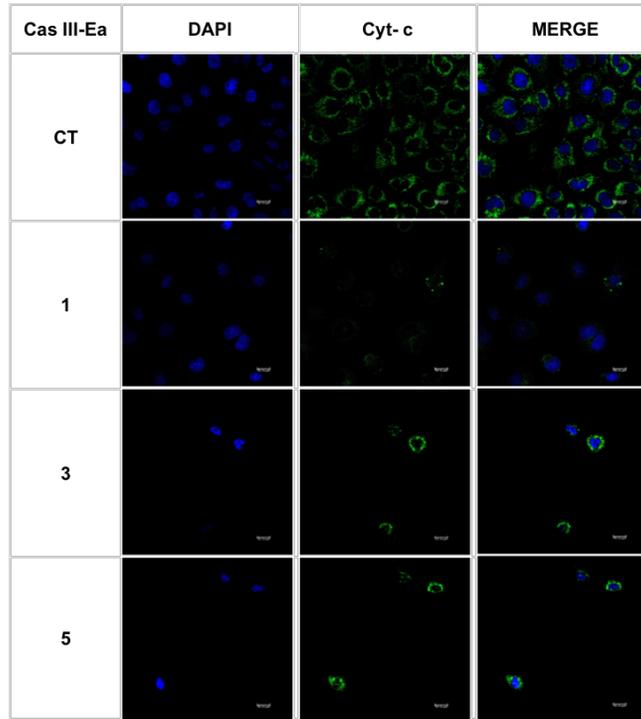


Fig. 19. Expresión de Citocromo C en la línea A253 tratada con Cas III-Ea. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control la expresión de Citocromo C en la línea celular A253. En los grupos experimentales se observa la disminución en el número de células a las concentraciones 1, 3 y 5 µg/ml.

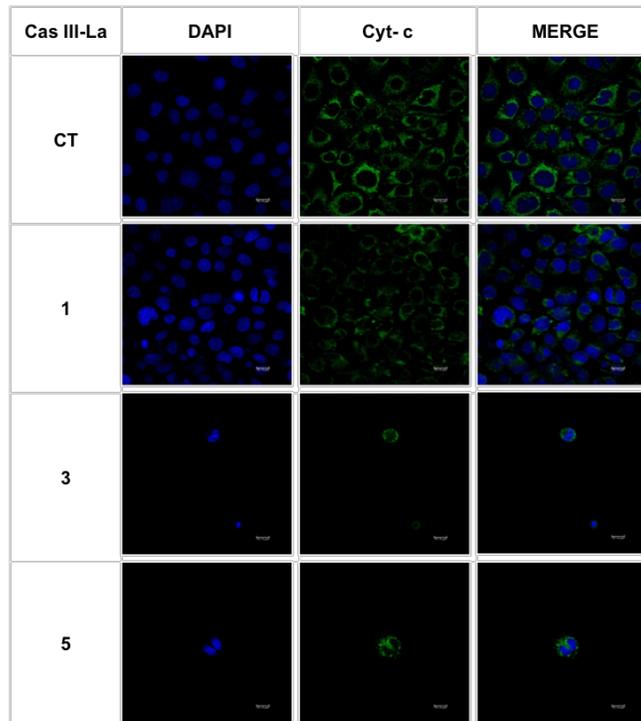


Fig. 20. Expresión de Citocromo C en la línea A253 tratada con Cas III-La. Micrografías de fluorescencia que muestran en el grupo control y las concentraciones 1, 3 y 5 µg/ml la expresión de Citocromo C en la línea celular A253. En los grupos experimentales se observa disminución en el número de células positivas a Citocromo C siendo relevantes las concentraciones 3 y 5 µg/ml.

11. Discusión

Actualmente el cáncer es considerado la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, y específicamente, México se encuentra dentro de los primeros 5 lugares con mayor incidencia en cáncer dentro de América Latina, siendo una de las más afectadas la región de cabeza y cuello con cuatro sitios específicos: cavidad bucal, orofaringe, laringe e hipofaringe (4, 6).

Los fármacos utilizados para la terapia contra el cáncer suelen no dar resultados 100% satisfactorios para el paciente oncológico, además de que la cantidad de fármacos utilizados para cáncer en la región de cabeza y cuello se reduce a 7 de aproximadamente 2000 que están destinados a quimioterapia (2).

Este aumento desmedido de casos de cáncer, no solo en México sino a nivel mundial, impulsa a buscar nuevas opciones para disminuir y prevenir el problema, por ello, esta investigación esta basada en el estudio de las Casiopeínas® que han demostrado incrementar la muerte celular mediante activación de apoptosis en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, (8, 9, 40, 44, 45, 50) lo que hace interesante su estudio como posible tratamiento para el cáncer en cabeza y cuello; y la selección de dos líneas celulares que corresponden a carcinoma de células escamosas pero con diferente grado de diferenciación y localización anatómica permite llevar a cabo análisis comparativos respecto a los efectos antineoplásicos de dos fármacos como las Casiopeínas®, pero en células con distinto grado de agresividad.

En estudios previos se ha visto que la apoptosis tiene un papel central en la muerte inducida por fármacos (51) y específicamente que las Casiopeínas® inducen muerte vía dependiente e independiente de caspasas, principalmente mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (42).

Los resultados muestran que las Casiopeínas® III-Ea y III-La tienen un efecto antiproliferativo mediante la inhibición de la proliferación celular demostrada en el ensayo de MTT

y la medición cualitativa de PCNA sobre las líneas FaDu y A253, donde se pudo observar disminución en la viabilidad celular dosis dependiente en las concentraciones 1 y 3 , siendo la dosis 3 $\mu\text{g/ml}$ la más significativa, mientras que en la dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ no se observaban células debido a su desprendimiento; estos mismos resultados donde la proliferación celular se ve afectada, han sido observados en las líneas celulares de cáncer cervico-uterino humano, glioma murino C6, melanoma murino B16 y carcinoma humano de mama, así como carcinoma de colon (9, 38-42). En este estudio se pudo observar durante el ensayo de MTT y PCNA, que la Cas III-La tuvo mejores resultados que Cas III-Ea en ambas líneas celulares, ya que la disminución en la viabilidad y proliferación celular se vieron más afectadas.

Al observar la disminución en la viabilidad celular, lo que implicaba que ambas Casiopeínas® provocaban muerte celular, se decidió realizar el ensayo de TUNEL y electroforesis en geles de agarosa para estudiar la fragmentación del DNA, y verificar que las células estaban muriendo por apoptosis. Los resultados fueron TUNEL positivos en las micrografías realizadas en ambas líneas celulares con la Cas III-Ea y Cas III-La, en las dosis 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$, siendo la dosis 3 $\mu\text{g/ml}$ la más significativa, mientras que en la dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ no se observaron células debido a su desprendimiento, se pudo observar también que la línea celular FaDu fue más resistente al tratamiento con ambas Casiopeínas® en comparación con A253, estos resultados TUNEL positivos han sido observados anteriormente en la línea celular Cal 27 que corresponde a carcinoma de células escamosas en lengua en un estudio realizado con la Cas III-La (53), con base en los resultados anteriores, se demostró que la Cas III-Ea y Cas III-La logran fragmentar el DNA en ambas líneas celulares en fragmentos constantes, lo que indicaría que el tipo de muerte celular llevado a cabo por ambas Casiopeínas® fue por apoptosis, estos resultados han sido observados en la Cas III-gly tanto *in vivo* como *in vitro* (41, 42), en Cas III-Ea y Cas III-Ha, en células HeLa y en linfocitos de sangre periférica, sugiriendo dos mecanismos de acción, uno donde las Casiopeínas afecten al

material genético y otro que implicaría daño oxidativo a estructuras subcelulares como las mitocondrias (37).

Para comprobar lo anterior, con ayuda de las proteínas Bcl-2, Bax y Citocromo C; se pudo observar en los resultados, la reducción en el número de células dosis dependiente en las dosis 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$. En la concentración 5 $\mu\text{g/ml}$ en la mayoría de las micrografías, no se observan células debido a la muerte y desprendimiento de las mismas. En los resultados de la proteína antiapoptótica Bcl-2, tradicionalmente relacionada con la prevención de la muerte celular programada, se observó que dicha proteína se mantuvo positiva en ambas líneas celulares con ambas Casiopeínas® III-Ea y III-La, principalmente cuando la dosis era mayor (30, 54, 55). Por su parte Bax, que se encuentra activo en todas las micrografías en las dosis 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$, siendo la dosis 3 $\mu\text{g/ml}$ la más relevante y la dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ donde son pocas las células que se lograron encontrar. En este sentido, se ha propuesto que Bcl-2 al estar activo se une a Bax para activarlo y este último al estar presente de manera saturada, se une a la membrana externa mitocondrial donde crea el poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT) a través del cual se liberan proteínas como el Citocromo C, que es el encargado de la energía de la célula a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En este sentido, se pudo observar que Citocromo C fue positivo para ambas Casiopeínas® III-Ea y III-La y en ambas líneas celulares desde el grupo control y en las dosis 1, 3, y 5 $\mu\text{g/ml}$. Estudios previos han demostrado que la salida del Citocromo C de la mitocondria al citoplasma de la célula genera pérdida del equilibrio del pH, de la regulación del Ca y el potencial de la membrana disminuye, al mismo tiempo en que Citocromo C se libera de la mitocondria, otros factores apoptóticos como Smac/Diablo se liberan, con o cual bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de apoptosis (PIA) y el factor inductor de apoptosis (FIA) que estimula la apoptosis a nivel nuclear de manera independiente a las caspasas (56-58). La línea FaDu perteneciente a carcinoma de células escamosas en hipofaringe demostró ser más resistente

con ambas Casiopéínas®, en comparación con la línea A253 perteneciente a adenocarcinoma de glándulas salivales. Este resultado sugiere diferentes mecanismos de resistencia dependientes de la localización anatómica y el tipo de tumor estudiado.

12. Conclusión

Las Casiopeínas® III-Ea y III-La:

1. Mostraron un efecto antiproliferativo e inducción de muerte celular en las líneas FaDu y A253
2. Indujeron muerte celular sobre las líneas FaDu y A253 mediante apoptosis vía independiente de caspasas.
3. La Cas III-La mostró mejores resultados disminuyendo la viabilidad y proliferación celular en comparación con Cas III-Ea en las líneas FaDu y A253.

Con los resultados obtenidos, las Casiopeínas® III-Ea y III-La podrían ser consideradas en un futuro dentro del tratamiento de elección para el carcinoma de células escamosas de hipofaringe y adenocarcinoma de glándulas salivales por su efecto antineoplásico y proapoptótico a través de la vía mitocondrial, su afinidad a las células cancerosas y su eficacia a dosis bajas; no obstante, resta mucho por estudiar acerca del mecanismo de las Casiopeínas® III-Ea y III-La tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*.

13. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud, 2017, Temas de la salud, Cáncer. Consultado el 03/08/2018
Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
2. Instituto Nacional del Cáncer, Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU., 2016, Cáncer de Cabeza y Cuello. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos>
3. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. Consultado el 16/04/2018. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/>
4. Roh J, Muelleman T, Tawfik O, Thomas SM. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol* 2015; 51:16–23.
5. Gallegos Hernández JF, Head and neck cancer, *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2015; 14:-17
6. Instituto Nacional de Cancerología, México. Consultado el 20/08/2018. Disponible en: <http://www.incan.salud.gob.mx/>
7. Carvallo Chaigneau F, Trejo Solis C, Gómez Ruiz C et al. Casiopeína III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*. 2008; 21:17-28.
8. Alemón Medina R, Muñoz Sánchez JL. Ruiz Azuara L. Mendiola Cruz MT. Determinación de la actividad oxidativa de las Casiopeínas Cas III-Gly, Cas III-Ia y CasIII-Ea en células HELA, Congreso Nacional de Química Médica. Disponible en: file:///Users/magalysanchez/Downloads/03_alemon-medina_y_col..pdf
9. Gracia Mora I, Ruiz Ramírez L, Gómez Ruiz C, Tinoco Méndez M, Márquez Quiñones A, Lira LR, Marín Hernández A, Macías Rosales L, Bravo Gómez ME. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs* 2001; 8:19-28.

10. Avelar M, Martínez A. Casiopeínas® para prevenir la enfermedad del cáncer actuando como antiradicales estudio de reactividad química aplicación de la teoría funcional de la densidad. Revista de la Sociedad Química Mexicana. Versión impresa ISSN 1870-249X. J. Mex. Chem.Soc 2012; 56: 2050-2056
11. International Agency for Research on Cancer, Cancer Today. Consultado el 08/05/2018
Disponibile en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
12. Diagnóstico y tratamiento del cancer epidermoide de cavidad oral en pacientes mayores de 18 años. México: Secretaria de Salud, 2010. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-323-10. Consultado el 21/08/2018 Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
13. Cardemil FM. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma Rev Chil Cir 2014; 66:386-96
14. Hernández Guerrero JC, Jacinto Alemán LF, Jiménez Farfán MD, Macario Hernández A, Hernández Flores F, Alcántara Vázquez A. Prevalencetrends of oral squamouscell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2013; 18:306-11
15. Rosai J. Cavidad Oral y Orofaringe, Patología Quirúrgica, 10ª edición, España, Amolca 2013.
16. Cisternas Bittencourt MJ, de la O Corrochano E, de Saa Álvarez MR, Capítulo 148: Patología tumoral de glándulas salivales, Sociedad española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial, Libro Virtual de formación en Otorrinolaringología, 1ª Edición, España, Páginas 1-16.
17. Castellanos SA, Soto Céliz M, Alonso Galarreta J, del Riego Valledor A, Miján de la Torre A. Associated metabolic and nutritional side effects to biological cancer therapy. NutrHosp 2014; 29: 259-68

18. González García R, Nam Cha SH, Muñoz Guerra MF, Gamallo Amat C. Basal cell adenoma of the parotid gland. Case report and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:430-433.
19. Archundia García A, Gurrola Machuca H. *Cirugía 2, Cap. 9: Cabeza y Cuello*, Mc Graw Hill, 1ª edición, 2013.
20. Avila RE, Samar ME, Fonseca I, Olmedo L, Asís OG, Ferraris R. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: histological and immunohistochemical prognostic factors. *Int J Morphol* 2011; 29: 183-7
21. Civetta JD, Civetta D. Carcinogénesis. *Rev Salud Pública de México* 2011;53:405-414.
22. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. Editorial médica Panamericana, 4ª edición.
23. Proliferación celular, Zedón Muñoz L, Eusalud. 2007, consultado el 05/06/2018 Disponible en: http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_07.pdf
24. Martínez Salazar M, Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XI No. 2 Diciembre 2009 152-166.
25. Villamor N. Apoptosis, mecanismos celulares e implicaciones clínicas, *Haematologica* 2004;89:126-48.
26. Sosa Ricardo D, Brandan Nora, Javier Pérez. Apoptosis. Cátedra de bioquímica, Facultad de Medicina UNNE, 2012. Consultado el 13/06/2018 Disponible en: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>
27. Taylor R, Cullen S, Martin S. Apoptosis: demolición controlada a nivel celular, *NatureReviews Molecular CellBiology* 2008; 9: 231-241.

28. Elmore S, Apoptosis: Una revisión de la muerte celular programada *ToxicolPathol.* 2007; 35: 495 – 516.
29. Adolfo Elena G, Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. Simposio sobre anestesia y estrés. *RevArg. Anest* 2002 60: 391-401.
30. Pérez Machado J, Eliécer A, Concepción L. Apoptosis, mecanismo de acción. *Revista de ciencias Médicas de la Habana* 2012; 18
31. Cascales Angosto M. Bases moleculares de la apoptosis *Anal. Real Acad. Nal. Farm.,* 2003, 69: 36-64
32. Ramírez Agudelo ME, Rojas López M. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular, *ISSN 0121-0793* 2010; 23: 166-177
33. Gato del Monte A, Padrón Yaquis A, Desarrollo tecnológico de cisplatino solución inyectable, *ISSN 0034-7515, Rev Cubana Farm.* 2012; 46: 173-182
34. Breast Cancer. Org Consultado el 19/07/2018. Disponible en: <http://www.breastcancer.org>
35. Ferreiro J, García JL, Barceló R, Rubio I. Adverse effects to treatment chemotherapy. *Gaceta Médica Bilbao* 2003; 100:69-74.
36. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Froman D, Plummer M. Globant burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *LancetOncol* 2012 13:607-15.
37. Sermet Guerrero J, Reyes Pérez E, Breña Valle M. Fragmentación de ADN por diferentes casiopeínas. México, 2007 Disponible en: [file:///Users/magalysanchez/Downloads/95_serment-guerrero_y_col.%20\(1\).pdf](file:///Users/magalysanchez/Downloads/95_serment-guerrero_y_col.%20(1).pdf)
38. American Cancer Society, Atlanta, Georgia, EE.UU. 2017. Quimioterapia para el cáncer de orofaringe y de cavidad oral. Consultado el: 27/07/2018. Disponible en:

<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-orofaringe-y-de-cavidad-oral/tratamiento/quimioterapia.html>.

39. Ohtani T, Hatori M, Ito H., Takizawa K, Kamijo R, Nagumo M, Involvement of caspases in 5-FU induced apoptosis in a oral cancer cell line. *Anticancer Res* 2000; 20:3117-21.
40. Alemón Medina, Bravo Gómez ME, Gracia Mora MI, Ruiz Azuara L. Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína II-gly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicol In Vitro* 2011; 25:868-73.
41. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz Azuara L, Gracia Mora I, Day BJ. Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicol* 2010; 268:176-83.
42. Trejo Solís C, et al. Cas II-gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*. 2005; 7: 563–574.
43. Stoli C, Baretton G, Ahrens C, Lohrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *VirchowsArch* 2000; 436:102-8.
44. Anaya Rubio I, Jiménez Farfán D, Palencia G, Ruiz Azuara L, Sotelo J, Trejo Solís C, Casiopeína III-La disminuye proliferación, migración e invasión en GBM. Primer Simposio de Química Inorgánica y Medicinal 2015. Consultado el 23/07/2018 Disponible en: <http://www.iquimica.unam.mx/dfq/wp-content/uploads/2015/10/Simposio-oraes.pdf>
45. Centeno Llanos S, Moreno Lorenzana D, Avilés Vázquez S, Sandoval Esquivel M, Ayala Sánchez M, Torres H, Ruiz Azuara L, Bravo Gómez M, Mayani H, Chávez González A. Casiopeína III-Ea como agente de eliminación preferencial de células primitivas de leucemias mieloides. Primer Simposio de Química Inorgánica y Medicinal 2015. Consultado el 06/07/2018 Disponible en: <http://www.iquimica.unam.mx/dfq/wp-content/uploads/2015/10/Simposio-oraes.pdf>

46. de Castro de Pardo Clemencia, Determination of the citotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test. Facultad de Medicina, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia 2006. Consultado el 25/07/2018 Disponible en: https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
47. Escobar M, Rivera A, Aristizabal G. Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Revista de la facultad de química farmacéutica. ISSN 0121-4004. 2010;17: 67-74
48. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas: Inmunocitoquímica. Consultado el 13/07/2018. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>
49. Rahirant S, Garavito Z, Hurtado H. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C. Colombia. Biomédica 2000;20:144-15.
50. Cruces MP, Jiménez VE, Pimentel E, Ruiz Ramírez L, Bravo Gómez. Efecto de las casiopéptinas: Cas III-Ea y Cas II-Gly en la longevidad y velocidad de desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Simposio de química inorgánica y medicinal 2015. Consultado el 14/07/2018. Disponible en: <http://www.iquimica.unam.mx/dfq/wp-content/uploads/2015/10/Simposio-orales.pdf>
51. Kaufmann Scott H, Earnshaw William C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*. 2000; 256: 42-9.
52. Castellano V, Sotelo T, Ballestín C, López Encuentra A, Varela G. Análisis de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en 24 carcinomas primarios de pulmón de células no pequeñas y correlación con la supervivencia. *Archivos de Bronconeumología*. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica SEPAR. 1996;32:127-131.
53. Chávez Cortéz Elda G. Efecto antineoplásico y mecanismos de acción del compuesto de coordinación de cobre [Cu (5,6-dimetil-1,10 fenantrolina)(acetilacetona)] NO₃H₂O sobre el

- carcinoma de células escamosas orales humanas *in vitro*. Tesis, Programa de maestría y doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud, 2012. Consultado el 27/07/2018.
54. Luna López A, López Díaz Guerrero N, González Puertos V, Triana Martínez F, KönigsbergFainstein M. El fantástico mundo de la proteína Bcl-2, 2008;27: 93-102.
55. Ramírez García , Márquez González H, Barranco Lampón G, López Aguilar J. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer Septiembre-Diciembre 2014;9:84-94 Disponible en: www.medigraphic.com/elresidente
56. Lizarazo SF, Ricardo FA. Bases moleculares de la apoptosis, implicaciones clínicas y terapéuticas. Revista Peruana de Cardiología Junio 2000;26:35-46.
57. Günther Dingeldeln A, Pokorná S, Lidman M, Sparman T, Sachi R, Hof M, Gröbner G. Apoptotic bax at oxidatively stressed mitochondrial membranes: Lipid dynamics and permeabilization. Biophysica Journal. 2017;112:2147-2158.
58. Colman V, Costa E, Chaves R, Tórtora V. Roles biológicos del citocromo c: transporte electrónico mitocondrial, muerte celular programada y ganancia de actividad peroxidática. AnFaMed- ISSN: 2301-1254. 2015;2:59-70