



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**EFFECTO ANTINEOPLÁSICO Y MECANISMOS DE ACCIÓN DEL COMPUESTO DE  
COORDINACIÓN DE COBRE [Cu (5,6-DIMETIL-1,10  
FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O SOBRE EL CARCINOMA DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS ORALES HUMANAS *IN VITRO*.**

QUE PRESENTA:

**C.D. ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ.**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIA ODONTÓLOGICAS**

Área de especialización: **BIOLOGÍA BUCAL**

Dra. María Dolores Jiménez Farfán  
Facultad de Odontología, UNAM.

**TUTORA**

Mtra. María Cristina Trejo Solís  
Laboratorio de Neuroinmunología, INNN, SSA.

**COTUTORA**

**México, D.F. a 20 de septiembre de 2012.**

Este trabajo fue parcialmente apoyado por los proyectos DGAPA PAPIIT IN217912-3 y SEP-CONACyT 167464.



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.

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ABSTRAC.</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>3</b>
<b>4.</b>	<b>ANTECEDENTES.</b>	
	4.1.    Cáncer oral.	4
	4.2.    Tratamientos para el cáncer.	6
	4.3.    Casiopéínas y apoptosis.	7
<b>5.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>12</b>
<b>6.</b>	<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>14</b>
<b>7.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>14</b>
<b>8.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>14</b>
<b>9.</b>	<b>METODOLOGÍA.</b>	
	9.1.    Manejo del cultivo de la línea CAL-27 de carcinoma de células. escamosas oral humano.	15
	9.1.1. Procedimiento de cultivo celular.	15
	9.1.2. Tratamiento de la línea Cal-27 con la Cas VIa.	15
	9.2.    Efecto de la Cas VIa en la línea Cal-27.	16
	9.2.1. Ensayo de viabilidad celular.	16
	9.2.2. Determinación de la muerte celular y análisis del ciclo celular.	17
	9.2.3. Detección de apoptosis por TUNEL.	18
	9.2.4. Determinación de apoptosis por WB.	19
	9.2.5. Formación de especie reactivas de oxígeno.	21
	9.2.6. Determinación de lipoperoxidación.	22
	9.2.7. Determinación del involucramiento de las especies reactivas de oxígeno.	23
	9.3.    Efecto coadyuvante del 5-FU y Cas VIa.	24
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	
	10.1.    La Cas VIa inhibe la proliferación celular en la línea Cal-27.	25
	10.2.    La Cas VIa induce muerte celular por activación de apoptosis.	27
	10.2.1 Determinación de la muerte celular y análisis del ciclo celular.	27
	10.2.2 Determinación de apoptosis.	29

---

10.2.3	Formación de ERO.	32
10.2.4	Determinación del involucramiento de ERO.	34
10.3	Efecto coadyuvante de Cas VIa y 5-FU.	35
<b>11</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>38</b>
<b>12</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>43</b>
<b>13</b>	<b>PERSPECTIVAS.</b>	<b>44</b>
<b>14</b>	<b>PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN.</b>	<b>45</b>
<b>15</b>	<b>REFERENCIAS.</b>	<b>46</b>

## 1. RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer oral es una neoplasia maligna frecuente y, México reporta que 0.65% del total de neoplasias malignas corresponde a carcinoma de células escamosas oral (CCEO). La necesidad de encontrar terapias más efectivas y seguras contra el cáncer ha estimulado la síntesis de fármacos como las Casiopeínas<sup>®</sup> (Cas), compuestos de coordinación de cobre que contienen un centro formado por metales de la primera serie de transición, con actividad citotóxica y antineoplásica *in vitro* e *in vivo*.

**Objetivo:** Estudiar el efecto de Casiopeína IIIa (Cas IIIa), el efecto coadyuvante de este fármaco con el 5-fluorouracilo (5-FU), y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el CCEO *in vitro*. **Método:** Se utilizaron cultivos de la línea celular CAL-27 (carcinoma epidermoide de lengua humano) tratados con Cas IIIa (dosis 1, 2, 2.5 y 3 µg/ml) y con 5-FU (50, 75, 100, 150, 200 µM). **Resultados:** La Cas IIIa mostró efecto antineoplásico a través de la inhibición de la proliferación e inducción de muerte celular. La viabilidad celular disminuyó significativamente, mostrando un efecto dosis dependiente. El Western blot (Wb) reveló disminución en los niveles de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), así como inducción de apoptosis mediante la activación de proteínas proapoptóticas: Bid a Bidt, aumento de Bax, y activación de caspasas 3 y 8. No se observó incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) medidas por la sonda DCFH-DA (2',7'-diacetato de dichlorofluoresceína) y por la reacción de ácido tiobarbitúrico (TBA). Por otro lado, se observó rescate de la muerte celular de las CAL-27 en presencia de superóxido dismutasa (SOD), sin embargo, con catalasa y dimetilsulfóxido (DMSO) no se observó rescate de la muerte celular. Por último, se vió que Cas IIIa junto con el 5-FU tienen un efecto coadyuvante. **Conclusión:** La Cas IIIa mostró efecto antineoplásico a través de la inhibición de la proliferación e inducción de muerte celular en cultivos CAL-27, posiblemente vía receptores de muerte. El mecanismo de acción de la Cas IIIa posiblemente es dependiente de ERO.

## 2. ABSTRACT

Worldwide, oral cancer is a common malignancy, and Mexico reports that 0.65% of total malignancies corresponds to Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). The importance of finding secure and effective therapies against cancer has stimulated the synthesis of drugs such as the Casiopeinas<sup>®</sup>, copper coordination compounds which contain a center a transition metal from the first series, with cytotoxic and antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. **Objective:** To study the effect of Casiopeina IIIa (Cas IIIa), the adjuvant effect of this drug with 5-fluorouracil (5-FU) and the possible molecular mechanisms involved in the OSCC *in vitro*. **Method:** CAL-27 cultures (human Squamous Cell Carcinoma of tongue) were treated with Cas IIIa (1, 2, 2.5, 3 µg/ml) and with 5-FU (50, 75, 100, 150, 200 µM). **Results:** Cas IIIa exerted its antineoplastic effect through inhibiting the proliferation and inducing cellular death. Cellular viability significantly diminished in a dose-dependent fashion. Western blot (Wb) revealed reduction of Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) levels. It was possible by inducing apoptosis, as well as the activation of apoptotic proteins: Bid to Bid truncated (Bid<sub>t</sub>), Bax increase, and caspase 3 and 8 activation. No increment in reactive oxygen species (ROS) generation was observed. These were measured by DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) probe and thiobarbituric acid reaction. Besides, in presence of antioxidants a rescue of the cellular death of Superoxide dismutases (SOD) was observed. Nevertheless, it was not observed a rescue of the cellular death in the presence of antioxidants catalase and Dimethyl sulfoxide (DMSO). Cas IIIa with 5-FU showed an adjuvant effect. **Conclusion:** Cas IIIa proved an antineoplastic effect through cellular proliferation in CAL-27 cultures and cellular death induction probably through death receptors via. The mechanism of action of Cas IIIa might depend on ROS.

### 3. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas oral (CCEO) es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad bucal, ubicándose el mayor porcentaje en lengua (46.9%). Su incidencia sigue siendo alta. Existen diferentes tratamientos para el CCEO que van desde la escisión quirúrgica extensa, radioterapia, quimioterapia o una combinación de éstas. A pesar de la evolución en el tratamiento, la supervivencia total de los pacientes no ha mejorado significativamente durante los últimos 20 años. Sin embargo, la quimioterapia es uno de los tratamientos primordiales para el cáncer con medicamentos que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas. Su principal objetivo es activar la muerte celular selectiva, sin dañar a las células normales.

Actualmente existen fármacos de origen inorgánico aprobados para la práctica clínica, siendo el cisplatino y el 5-Fluorouracilo (5-FU) los de más amplio uso. En la década de los 80's se desarrolló las Casiopeínas® (Cas) como fármacos antineoplásicos. Las Cas son una familia de compuestos de coordinación de cobre (II) que han demostrado tener actividad antineoplásica, citotóxica, citostática, evaluada tanto *in vitro* como *in vivo* en diversas líneas celulares de tumores malignos.

Considerando que no existen reportes de los efectos de la Cas III-La ([Cu (5,6-dimetil-1,10 fenantrolina) (acetilacetato)] NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el efecto pro-apoptótico de dicho fármaco en el CCEO *in vitro*, así como el efecto coadyuvante con el 5-fluouracilo (5-FU), esto se llevó a cabo para ayudar a la

generación de más evidencia que permitirá considerar a la Cas como nueva alternativas quimioterapéuticas para el tratamiento del CCEO.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Cáncer oral.

El cáncer oral ocupa a nivel mundial, el octavo lugar de incidencia en hombres y decimocuarto en mujeres, representando el 3% de todos los cánceres en el mundo (De Camargo *et al.*, 2010). La tasa mundial de mortalidad es de 8,3 % por cada 100.000 habitantes (Parkin *et al.*, 2005). De acuerdo al Informe Mundial sobre el Cáncer, la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50% hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos (Secretaría de Salud, 2011).

El cáncer oral es una neoplasia de incidencia variable en el contexto mundial, con tasas relativamente bajas en países occidentales, y altas cifras en la India y otras regiones de Asia y Oceanía, en donde se ha mantenido como una de las formas más frecuentes de cáncer, representando un gran problema de salud (Parkin 2005). El cáncer oral corresponde en un 94%, a carcinoma epidermoide (Johnson *et al.*, 2005).

En México el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) reportó que los tumores de labio, cavidad bucal y faringe sumaron 1,657 registros en 2004, el 1.44% del total del registro nacional de ese año; en 2005 1,406 registros, 1.25% del nacional; y en el 2006 1,369, integrando el 1.29% del total anual, del cual el 0.65% se presentaron en cavidad bucal (Secretaría de Salud, 2011).



El carcinoma de células escamosas oral (CCEO) es una neoplasia maligna que se origina de las células escamosas del epitelio que recubre la mucosa. El CCEO representa más del 90% de los cánceres orales (Scully 2004). Los sitios primarios de localización son la lengua, piso de boca, mucosa bucal y alveolar, ubicándose el mayor porcentaje en lengua (46.9% aproximadamente) (Jerjes *et al.*, 2010; Neville *et al.*, 2011). El CCEO se presenta con mayor frecuencia entre la quinta y séptima década de la vida (Sankaranarayanan *et al.*, 1990), sin embargo el cáncer intraoral está incrementando en adultos jóvenes, con ligera predilección por hombres, representa el 3% de las neoplasias diagnosticadas en hombres y el 2% en mujeres (Neville *et al.*, 2011). Se han mencionado diversos factores de riesgo asociados como son: el tabaquismo, alcoholismo, sífilis, infecciones por virus del papiloma humano (VPH), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), liquen plano bucal, irritantes mecánicos, higiene bucal deficiente, factores hereditarios, entre otros (Moreno *et al.*, 2000). No obstante, existen discrepancias entre factores de riesgo y su supervivencia por raza, edad, género, sitio anatómico y exposición a sustancias carcinogénicas (Miller *et al.*, 2003). El CCEO se ha clasificado de acuerdo a su grado de diferenciación histológica, a la semejanza de células epiteliales y de su producción de queratina (Neville *et al.*, 2011).

Varios parámetros clínico-patológicos están implicados en el pronóstico, recurrencia y supervivencia del CCEO (Jerjes, 2010). El pronóstico del CCEO se encuentra entre los menos favorables de todos los tumores humanos, con aproximadamente un promedio de 5 años de supervivencia (en 50% de los casos) (Khuri, 1997), atribuido básicamente a lo tardío del diagnóstico, al nivel elevado de recurrencia, a la aparición

de segundos tumores (Casiglia & Woo, 2001; Khuri *et al.*, 2001; Leemans *et al.*, 1994) y al tamaño del tumor.

Las alteraciones moleculares que provocan la carcinogénesis oral han sido asociadas a factores genéticos involucrando aberraciones cromosómicas, genes de supresión tumoral, oncogenes, genes de reparación de DNA, factores ambientales y virales (Scully *et al.*, 2000; Scully, 2002; Jefferies & Foulkes 2001; Nunn *et al.*, 2003). En el CCEO, aproximadamente el 50% de los tumores exhiben expresión de p53 disfuncional. Así, las células con un genoma dañado no pueden ser capaces de llevar a apoptosis, permitiendo al genoma defectuoso persistir y replicarse en las células hijas (Stoll *et al.*, 2000). Estas mutaciones u otros mecanismos desregulados permiten a las células del CCEO proliferar en un rango que excede la muerte celular, migrar y penetrar la membrana basal e iniciar la angiogénesis (Regezi & Jordan 2001; Regezi *et al.*, 2003).

#### **4.2. Tratamientos para el cáncer.**

El tratamiento del CCEO se realiza dependiendo del estadio clínico de la enfermedad. Dentro de los tratamientos está la escisión quirúrgica extensa, radioterapia, quimioterapia o una combinación de estas (Neville *et al.*, 2011; Palme *et al.*, 2004).

Los tumores de cabeza y cuello son resistentes a diversos tratamientos, incluyendo inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia y otras terapias coadyuvantes. Asimismo, las células del CCEO son capaces de desarrollar rápidamente resistencia terapéutica a fármacos a los cuales eran previamente susceptibles. El 5-FU y el cisplatino son

usados como fármacos de primera elección en la quimioterapia del CCEO (Azuma *et al.*, 2004).

Los mecanismos por los cuales el 5-FU ejerce su efecto antineoplásico sobre el CCEO es a través de la inactivación de proteínas pro-apoptóticas como TRAF-2, cIAP-1 y cFLIP y activación de caspasas 8 y 3 (Tong *et al.*, 2000; Ohtani *et al.*, 2000), ambos mecanismos independientes de p53/p21 (Yoneda *et al.*). La apoptosis inducida por cisplatino es mediada por la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol (Azuma *et al.*, 2004). Sin embargo, los efectos tóxicos del cisplatino tales como mielosupresión y nefrotoxicidad han limitado su eficacia y llevado a elegir preferentemente la utilización del 5-FU en el tratamiento de CCEO, no obstante su menor eficacia. Por estas razones, existe una gran necesidad de identificar agentes quimioterapéuticos citotóxicos para las células de CCEO, con mínimos efectos colaterales y una amplia actividad antitumoral.

### 4.3. Casiopeínas y apoptosis.

La importancia de encontrar terapias alternativas para el tratamiento del cáncer en nuestro país ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de compuestos con un espectro terapéutico más amplio. Las Casiopeínas® (Ruiz 1990; 1992; 1997) son compuestos de coordinación que contienen como centro activo al cobre (II) y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoácidos o donadores (OO) con fórmula general  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  (Ruiz *et al.*, 1995). La Cas III-La con formula general  $[Cu(5,6\text{-dimetil-1,10 fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]NO_3H_2O$  (**Figura 1**).

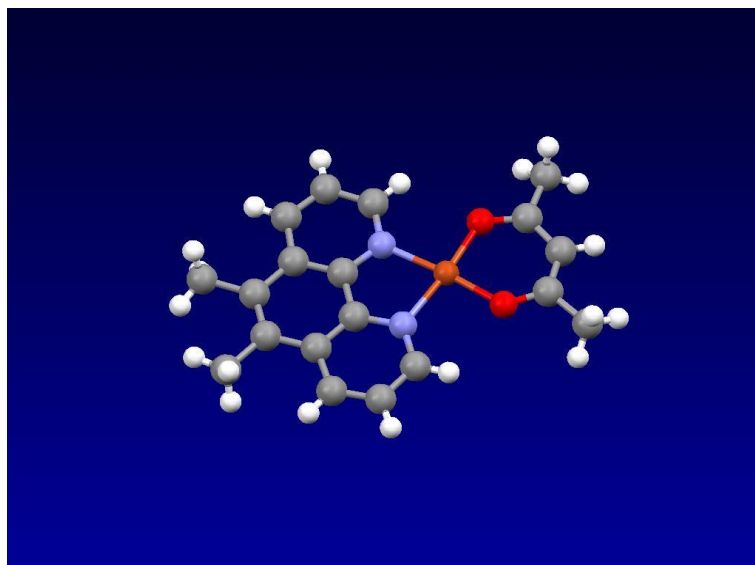


Fig. 1. Casiopeína IIIa.

Hasta la fecha se han sintetizado aproximadamente 100 de éstos compuestos, y algunos de ellos en diversos modelos experimentales han mostrado actividad citotóxica y antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*. La Cas II-gly [Cu (4,7 dimetil-1,10 fenentrolina) (glicina)] NO<sub>3</sub>, se ha desarrollado específicamente como un fármaco antineoplásico y citotóxico que actúa contra las líneas celulares de: carcinoma cérvico-uterino humano; HeLa y CaLo, glioma C6 de rata (Trejo-Solís *et al.*, 2005), meduloblastoma; Daoy (Mejia y Ruiz, 2008), neuroblastoma; SJ-N-SH Y CHP-212 (Tesis maestría, UNAM). La Cas I gly [Cu (4,7- difenil, 10- fenantrolina) (glicinato)] NO<sub>3</sub>, Cas II gly [Cu (4,7-dimetil, 1,10- fenantrolina) (glicinato)] NO<sub>3</sub> y Cas III-ia [Cu (4,4-dimetil, 2,2- bipyridina) (acetilacetato)] NO<sub>3</sub> presentan actividad antineoplásica sobre las líneas murinas de melanoma (B16) y carcinoma de pulmón de Lewis (LW1) (Ruiz y Bravo, 2010), así como en ratones desnudos xenotransplantados con la línea tumoral humana MCF-7 de carcinoma de mama (resultados no publicados), y HCT15

(carcinoma de colon), tumores altamente metastásicos por lo que resultan ser compuestos prometedores, en la clínica humana (Carvallo *et al.*, 2007).

Los mecanismos moleculares por los cuales las casiopeínas ejercen tales efectos antineoplásicos y citotóxicos no son del todo conocidos, sin embargo, se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos, son tóxicos en diferentes organismos. Esta toxicidad se le ha adjudicado a los iones metálicos, en especial a los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^+$  por su potencial para participar en reacciones de Fenton, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) (Stons & Bagchi 1995).

De este modo, el aumento en la concentración de ERO puede producir peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en los organelos y la membrana plasmática, oxidación de enzimas que contienen grupos sulfhidrilos, carbonilación y polimerización de proteínas, despolimerización de polisacáridos, hidroxilación de purinas o pirimidinas, y cortes de cadena sencilla o doble del DNA (Southern & Powis 1988).

Las Cas pueden inducir apoptosis mediante la generación de ERO (Trejo *et al.*, 2005; Kachadourian *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2008; Tesis maestría, UNAM) lo que podría suceder a través de la activación del factor de transcripción nuclear- $\text{KB}$  (NF- $\text{KB}$ ), regulador de genes que codifican citocinas, receptores de citocinas, y moléculas de adhesión, que inducen respuestas inflamatorias e inmunológicas (Lim *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 1999). La activación de NF- $\text{KB}$  está involucrada en múltiples aspectos de oncogénesis, inducción de apoptosis, cambios en el ciclo celular, diferenciación y migración celular (Pahl *et al.*, 1998). NF- $\text{KB}$ /Rel es una familia de factores transcripcionales diméricos, formada por cinco miembros: p50/p105 (NF- $\text{KB1}$ ),

p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), Rel-A (p65), c-Rel y Rel-B; cada uno de estos factores se distinguen por el dominio de homología Rel, la porción de la proteína que controla la unión al ADN, la dimerización, las interacciones con los factores inhibitorios (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\delta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ) de NF- $\kappa$ B, y que en general, mantienen al NF- $\kappa$ B inactivo en el citoplasma. La principal proteína inhibitoria es I $\kappa$ B $\alpha$ , que al ser fosforilada en los residuos de Serina 32 y Serina 36 (Li & Karin 1998) es desprendida de NF- $\kappa$ B y degradada por el proteosoma, esto permite la traslocación de NF- $\kappa$ B del citosol al núcleo. Se ha reportado desde hace varios años que agentes inductores de apoptosis en una gran variedad de líneas celulares inducen la activación de NF- $\kappa$ B, sugiriendo que el factor NF- $\kappa$ B está involucrado en la inducción de este proceso, a través de la regulación transcripcional del ligando Fas/Apo-1/CD95 (Fas-L) y de su receptor Fas/Apo-1/CD95 (Fas). Los promotores de los genes de Fas-L humano y murino tienen sitios  $\kappa$ B que son sobrerregulados cuando se exponen a las células T ante inductores de apoptosis (Kasibhatla *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 1998). Fas es sobrerregulado por NF- $\kappa$ B en células T-Jurkat inducidas a apoptosis por el tratamiento de ésteres de forbol y ionomicina, (Chang *et al.*, 1999) y la sobreexpresión de un super represor I $\kappa$ B $\alpha$  en la línea celular MCF7, ha mostrado ser oncogénico (Van Hogerlinder *et al.*, 1999).

La apoptosis inducida por la ruta de señalización de Fas, involucra la unión del ligando Fas a su receptor Fas, provocando la trimerización y activación de éste en la membrana plasmática, lo que activa el reclutamiento de moléculas adaptadoras FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que contiene un dominio de muerte (DD) en el extremo carboxilo terminal, que permite su unión al receptor Fas trimerizado a través de las interacciones DD-DD. También contiene un dominio efector de muerte (DED) en

su extremo amino terminal, el cual es asociado con los DEDs localizados en el dominio de la caspasa 8, formando el complejo de señalización de muerte, que lleva a la activación de la caspasa, la que subsecuentemente activa a las caspasas efectoras de apoptosis, que llevan a la muerte celular, mediante un mecanismo independiente de la actividad mitocondrial (Ashkenazi & Dixit 1998). Un sustrato de la caspasa 8 es la proteína proapoptótica Bid, a la cual rompe y activa, generando un fragmento carboxilo terminal de 15 kd, denominado Bid truncada (Bidt), el cual induce la translocación y oligomerización de la proteína pro-apoptótica Bax del citosol a la mitocondria (Li *et al.*, 1998), lo que origina la inactivación de Bcl-2 con la subsecuente liberación del citocromo c del espacio intramembranal mitocondrial hacia el citosol a través del poro de Bax. El citocromo c y dATP inducen un cambio conformacional al factor asociado a apoptosis (Apaf-1), permitiendo el reclutamiento y activación de la caspasa 9 (Zou *et al.*, 1997), la cual activa a las caspasas efectoras de apoptosis (caspasa 3 y 7), que hidrolizan proteínas importantes para la proliferación celular y reparación del ADN como la Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP), así como la activación de la DNAasa amplificando de esta manera la respuesta apoptótica (Liu *et al.*, 1999; Sheng *et al.*, 1998).

## 5. JUSTIFICACIÓN

Los esfuerzos por erradicar las células neoplásicas mediante fármacos, frecuentemente han resultado en efectos adversos sistémicos y citotóxicos, y el desarrollo de resistencia a la terapia. Asimismo, el daño inducido por la droga no necesariamente lleva a la muerte de células tumorales, en parte debido a la evasión de la apoptosis por parte de las células cancerosas. Recientemente, el descubrimiento de blancos subcelulares en las células cancerosas ha llevado al desarrollo racional de la “terapia dirigida”. Estas drogas recientemente diseñadas están dirigidas específicamente a diversos componentes de las vías de transducción de señales intracelulares que controlan el ciclo celular, apoptosis y angiogénesis.

Actualmente se acepta que la proliferación desregulada y la apoptosis llevan al desarrollo del cáncer. Sin embargo, parece que el aprovechamiento del potencial apoptótico de las células cancerosas puede generar nuevas terapias que podrían ser menos tóxicas para las células normales debido a su vía de sobrevivencia fisiológicamente controlada. En el caso del CCEO que representa el principal tipo de neoplasia que se desarrolla en cabeza y cuello, se ha sugerido el tratamiento de la displasia epitelial oral mediante quimioprevención.

La importancia de encontrar terapias alternativas para el tratamiento del cáncer ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de compuestos con un espectro terapéutico más amplio. En base a los diversos reportes científicos acerca de las casiopeínas, las cuales han sido estudiadas desde hace más de 15 años en México, el



presente estudio buscó establecer el efecto antineoplásico del compuesto de coordinación de cobre [Cu (5,6-dimetil-1,10 fenantrolina) (acetilacetonato)] NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O (Cas III La), sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el efecto pro-apoptótico de dicho fármaco en el CCEO *in vitro*, así como el efecto coadyuvante con el 5-fluouracilo (5-FU) debido a que actualmente éste es uno de los fármacos de elección para el tratamiento del CCEO. Este conocimiento contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas para el tratamiento del CCEO, con mayor viabilidad y accesibilidad para los pacientes con cáncer en nuestro país.

## **6. HIPÓTESIS.**

Si la Cas III La posee un efecto antineoplásico en el carcinoma de células escamosas oral *in vitro*, se observará una menor viabilidad celular e inducción de apoptosis a distintas dosis del fármaco posiblemente a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

## **7. OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar el efecto de Cas III La, el efecto coadyuvante de este fármaco con el 5-fluouracilo, y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el carcinoma oral de células escamosas *in vitro*.

## 8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar la viabilidad celular e inducción de apoptosis, analizando los niveles de expresión de las proteínas (Bidt y Bax), la activación de la caspasas (8 y 3).
- II. Determinar la formación de ERO *in vitro* y el involucramiento de las mismas en cultivos controles y tratados con el fármaco en presencia de los antioxidantes catalasa, SOD y DMSO.

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. Manejo del cultivo celular de la línea CAL-27 de carcinoma oral de células escamosas humano y fibroblastos gingivales.

Se utilizó la línea celular CAL-27 de carcinoma de células escamosas (American Tissue Culture Collection, ATCC). La línea celular proviene de un hombre caucásico de 56 años con una lesión en la mitad de la lengua y que aún no había sido sometido a ninguna terapia.

Se utilizó cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos donados por el Laboratorio de Inmunología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Los fibroblastos se obtuvieron de un explante de tejido de encía sano, a partir de un donante sin datos clínicos de enfermedad periodontal ni sistémica. Los cultivos de fibroblastos solo se utilizaron para determinar la viabilidad celular y el efecto coadyuvante por el ensayo de MTT.

### **9.1.1. Procedimiento de cultivo celular.**

Las células se sembraron en cajas de cultivo BD Falcon (75 cm<sup>2</sup>) con 12 ml de medio de cultivo Dulbecco Modificado (DMEM, Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10% y antibiótico (Sigma) al 1%. Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que las cajas tuvieron un 90% de confluencia fueron tratadas con la Cas IIIa.

### **9.1.2. Tratamiento de la línea CAL-27 con la Cas IIIa.**

1. Se pesaron 1500 µg de Cas IIIa y se disolvió en 1 ml de agua desionizada estéril. El tratamiento se preparó con medio de cultivo adicionado con SFB sin antibiótico.
2. Se formaron grupos de cultivos de la línea celular CAL-27 y fueron tratados con las dosis de 1, 2, 2.5 y 3 µg/ml de Cas IIIa. El grupo control continuó con medio DMEM. El tiempo de incubación de todos los experimentos fue de 24 h y se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas previamente.
3. Posterior al tiempo del tratamiento, las células se desprendieron con 2 ml de solución de tripsina-EDTA (0.25% Sigma-Aldrich). Una vez desprendidas, las células se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -20°C para su utilización en el resto de las pruebas realizadas.

## 9.2. Efecto de la Cas IIIa en la línea CAL-27.

### 9.2.1. Ensayo de viabilidad celular.

Para determinar cuantitativamente el efecto de la Cas IIIa en la sobrevivencia de CAL-27 y fibroblastos gingivales, se utilizó la prueba de MTT (sales de tetrazolium) (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio). El MTT es una sal amarilla que es reducida por células metabólicamente activas con ayuda de la succinato deshidrogenasa para generar formazán de color púrpura.

1. En cajas de 96 pozos fueron sembradas 20,000 células por pozo e incubadas con DMEM, SFB y antibiótico.
2. Posteriormente se trataron con la Cas IIIa a las dosis de 1, 2, 2.5 y 3  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron por 24 h. Consecutivamente se trataron con MTT a una concentración de 10  $\mu\text{g}$  por pozo.
3. Después de 4 h de incubación, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución solubilizadora y se incubaron durante 12 h.
4. Por último, se cuantificó el formazán utilizando un lector de ELISA (Microelisa® Minireader MR590 A Dynatech Product) a una longitud de onda de 540 nm. Se evaluó la correlación de las células no tratadas con las tratadas para determinar la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de la Cas IIIa.

### **9.2.2. Determinación de la muerte celular y análisis del ciclo celular.**

La inducción de la muerte celular sobre los cultivos tratados con Cas III se determinó por la aparición del pico Sub-G0 por la técnica de ioduro de propidio.

1. Se cultivaron  $1 \times 10^6$  de células CAL-27 en cajas de 6 pozos por 24 h; posteriormente fueron tratadas con las diferentes concentraciones e incubadas por 24 h.
2. Inmediatamente las células se recuperaron en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet fue resuspendido y fijado con etanol al 70% a 4°C por 24 h. Se lavaron tres veces con PBS 1x, se permeabilizaron e incubaron por 1 h en presencia de 1 mg/ml de RNasa y 20 µg/ml de ioduro de propidio a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Finalmente, se determinaron las diferentes fases del ciclo celular con un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson (California, USA).

### **9.2.3. Detección de apoptosis por TUNEL.**

La valoración de la apoptosis se realizó por el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling) (Roche), marcaje de extremos desnudos dUTP marcados por la enzima desoxinucleótido transferasa terminal (TdT), que detecta la rotura del extremo libre de 3'-OH del ADN, en donde se incorporarán los nucleótidos marcados mediante la acción de la enzima TdT.

1. Se sembraron 150,000 células aproximadamente en laminillas de 8 pozos y se incubaron en las condiciones establecidas para el manejo del cultivo celular.
2. Las células fueron tratadas con la Cas III La a las dosis de 1, 2, 2.5 y 3 µg/ml durante 24 h. El grupo control continuó con medio DMEM.
3. Se eliminó el tratamiento y cada pozo se lavó 2 veces con 500µl de PBS 1X. Para fijar las células se agregaron 500µl de paraformaldehído al 3.7%/PBS 1X y se dejó actuar por 1 h a 4°C. Se realizó un lavado con PBS 1X.
4. Se realizó la rehidratación mediante pases decrecientes de alcohol 96%, 70%, 50%, agua destilada (2 veces) y PBS, durante 30 seg en cada uno de ellos.
5. Se realizó la recuperación antigénica mediante una solución de sales de citrato (0.1 M, ácido cítrico y 0.1 M citrato de sodio, pH 6) hirviendo las laminillas durante 30 min en baño María. Posteriormente se dejaron enfriar y lavaron con agua corriente y PBS 1X.
6. Se colocó la reacción de TUNEL y se incubó durante 1 h a 37°C en una cámara húmeda.
7. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X y se llevó a cabo el montaje de las laminillas con Vectashield y DAPI (Vector, H-1200) para marcar los núcleos.

#### 9.2.4. Determinación de apoptosis por Western blot.

La determinación del efecto apoptótico sobre los cultivos celulares se realizó mediante Wb para analizar los niveles de expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bid<sub>t</sub>, Bax y la activación de las caspasas 8 y 3.

Para este procedimiento se utilizaron las células previamente tratadas con la Cas III<sub>La</sub> a dosis de 1, 2, 2.5 y 3 µg/ml y el grupo control.

1. Las células se lisaron con 250 µl de buffer de lisis (Cel Lytic<sup>TM</sup>MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, Sigma-Aldrich Co.) en agitación durante 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 9,000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante.
2. Se determinó la concentración de las proteínas obtenidas de los lisados celulares por el método de Lowry. Se tomaron 10 µl del lisado celular y se mezclaron en tubos de ensayo con 1 ml de agua destilada, 2ml del reactivo A (tartrato de sodio y potasio 1%, sulfato de cobre 1% y carbonato de sodio 2%) y 0.1 ml de reactivo B (Folin). Se incubó durante 15 min y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 560nm.
3. Una vez cuantificadas las proteínas se tomaron 30 µg/ml de proteínas de cada tratamiento. A cada muestra se le agregó buffer de carga 2X (Tris-HCl 100mM, pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20% y β-mercaptoetanol 10%) y se calentaron a 65°C durante 10 min. Se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. Las muestras se cargaron en geles SDS/PAGE al 12% y se corrieron por un periodo de entre 1 y 2 h a 128 V.
5. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 2 h a 0.20 Amp.

6. Las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo Svelty al 5% disuelta en PBS 1X en 1% Tritón X100 por 1 h; para las membranas que utilizaron anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology; mientras que la leche Svelty al 3% / PBS 1X fue utilizada para las membranas que usaron anticuerpos de Upstate.
7. Después del bloqueo, las membranas se incubaron en bolsas individuales de plástico con los anticuerpos primarios: PCNA (Sigma), Bax y Bid (Santa Cruz Biotechnology) y, caspasa 3 y caspasa 8 (Upstate). Los anticuerpos primarios de Santa Cruz Biotechnology se diluyeron en una proporción 1:500  $\mu$ l en una solución de 1 ml de leche Svelty (líquida) y 1 ml de solución de anticuerpo (albúmina 0.01%, Tween20 0.01% y PBS 1X). Los anticuerpos de Upstate se diluyeron 1:1000 en 2 ml de leche Svelty 3% (en polvo) y PBS 1X. Las membranas se mantuvieron en agitación a 4°C durante toda la noche.
7. Al día siguiente, cada membrana incubada con los anticuerpos Bax y Bid se lavaron 3 veces en solución de PBS 1X, Tritón al 1% durante 10 min y las membranas incubadas con caspasas 3 y 8, se lavaron 2 veces con agua destilada durante 5 min.
8. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos [goat anti-rabbit HRP (sc 2004) ó goat anti-mouse HRP (sc 2005)] en una dilución 1:1000 durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.
9. Cada membrana incubada con los anticuerpos Bax y Bid, se lavaron 3 veces en solución de PBS 1X, Tritón al 1% durante 10 min. Las membranas incubadas con anticuerpo de Upstate se lavaron 2 veces con agua destilada y una vez con PBS 1X/ Tween 0.05% durante 5 min.



10. Finalmente, se realizó el revelado por quimioluminiscencia con el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Amersham) durante 1 min utilizando las películas Kodak Biomax Light Film (23784-01).
11. Como control de carga se utilizó  $\beta$  actina (Sigma), desnudando la membrana con Buffer stripping ( $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris HCl 65.5 mM pH 6.8 y agua).

### 9.2.5. Formación de especies reactivas de oxígeno.

Para el análisis de ERO se usó la sonda DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetato). DCFH-DA es una molécula estable no-fluorescente que mediante esterasas es hidrolizada a DCFH. Esta molécula es oxidada a DCF en presencia de ERO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo), la cual es altamente fluorescente (Scott *et al.*, 1988).

1. Las células control y tratadas se lisaron con 250  $\mu$ l de buffer de lisis (Cel Lytic<sup>TM</sup>MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, Sigma-Aldrich Co.), en agitación por 30 min a 4°C.
2. Se diluyeron en una concentración 1:10 con 40 mM Tris (pH 7.4) y 5  $\mu$ M de DCFH-DA (Molecular Probes) en metanol y se incuban por 15 min a 37°C.
3. Posteriormente, se registró la fluorescencia (primera lectura) y se realizó una segunda lectura 60 min después. Se midió la formación del derivado oxidado fluorescente de DCF a una longitud de onda de 525 nm (ranura de 5 nm) a 37°C.

4. Se registró el nivel basal de la fluorescencia de las muestras, antes de calcular la formación de DCF cuantificada a partir de una curva estandarizada con DCFH. El análisis se realizó en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS.

#### **9.2.6. Determinación de lipoperoxidación.**

Las cantidades de productos aldehídicos generados por la lipoperoxidación, se determinaron en los lisados de los grupos controles y tratados empleando la reacción de ácido tiobarbitúrico.

1. A los lisados celulares se les agregó 1 ml de buffer Tris 150 mM (pH 7.4) y se incubaron a 37°C durante 30 min.
2. Se tomaron 0.4 ml de las muestras incubadas y se colocaron en tubos de ensayo. Se les agregó 1.5 ml de ácido acético al 20%, 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico 0.8% y 0.5 ml de agua destilada.
3. Los tubos se taparon y calentaron hasta la ebullición por 45 min en baño María. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar y se les agregó 1 ml de cloruro de potasio 1.2%, agitándolos por 5 seg con ayuda de un Vórtex.
5. Inmediatamente después se añadieron 5 ml de solución piridina-butanol (1:15) y se agitaron en un Vórtex durante 10 seg. Se dejaron en reposo hasta que se observó la separación de las fases (el color rosa se concentró en la parte superior).
6. De la fracción superior, se tomó 1 ml y se centrifugó a 7,000 rpm a temperatura ambiente.
7. Por último, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 532nm.

### **9.2.7. Determinación del involucramiento de las especies reactivas de oxígeno.**

Para conocer la participación de las ERO y la posible especie efectora, se formaron grupos a partir de los cultivos de CAL-27: 1) Aquellos que no recibieron tratamiento, 2) Tratados con Cas IIIa y, 3) Cultivos tratados con Cas IIIa más cada uno de los atrapadores de especies reactivas de oxígeno: 50 µg/ml de catalasa (inhibidor específico del peróxido de hidrógeno), 50 U/ml de SOD (inhibidor específico del ion superóxido), 1% DMSO (inhibidor de radical hidroxilo).

1. En cajas de 96 pozos se sembraron 20,000 células por pozo y se cultivaron bajo las condiciones mencionadas inicialmente para el manejo de cultivo celular.
2. Los pozos se dividieron en los grupos antes mencionados y fueron tratados con la Cas IIIa (1 µg/ml), catalasa (100, 250, 500 y 1000 U/ml), SOD (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 U/ml), DMSO (25, 50 y 75%) y grupos control con DMEM. Se incubaron por 24 h a 37°C.
3. Transcurridas las 24 h, se utilizó el método de MTT para determinar la viabilidad celular y se cuantificó la reacción utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm.

### **9.3. Efecto coadyuvante del 5-FU y Cas IIIa.**

Se determinó el posible efecto coadyuvante del 5-FU y la Cas IIIa mediante el ensayo de MTT sobre fibroblastos gingivales y CAL-27.

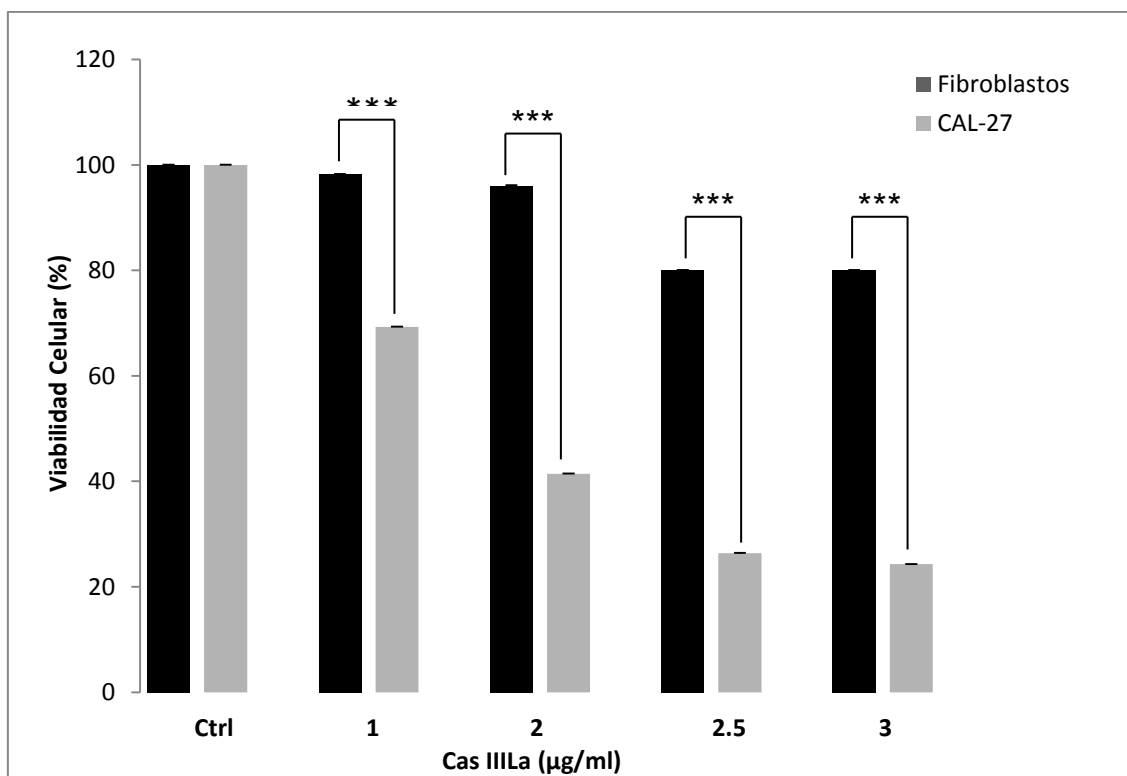
1. En cajas de 96 pozos se sembraron por separado 20,000 células de CAL-27 y fibroblastos, y fueron cultivadas con medio DMEM bajo las condiciones previamente establecidas.
2. Se formaron grupos en ambas líneas celulares:
  - Grupo I. Control, se mantuvo con DMEM y SFB 10%.
  - Grupo II. Tratados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Cas IIIa.
  - Grupo III. Tratados con 5-FU a las dosis de 50, 75, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ .
  - Grupo IV. Tratados con con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Cas IIIa más 5-FU (50, 75, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ).
3. Los cultivos se incubaron durante 24 h y posteriormente, se utilizó el método de MTT para determinar la viabilidad celular. Se cuantificó la reacción utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm.

## **10. RESULTADOS.**

### **10.1. La Cas IIIa inhibe la proliferación celular en la línea CAL-27.**

Para analizar la viabilidad celular en presencia de Cas IIIa, cultivos de la línea celular CAL-27 y fibroblastos gingivales normales fueron tratados con Cas IIIa a las dosis (1, 2, 2.5, 3  $\mu\text{g/ml}$ ) 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 Cas IIIa

se observó una disminución de la viabilidad celular en las células CAL-27. estadísticamente significativa (**Figura 2**).



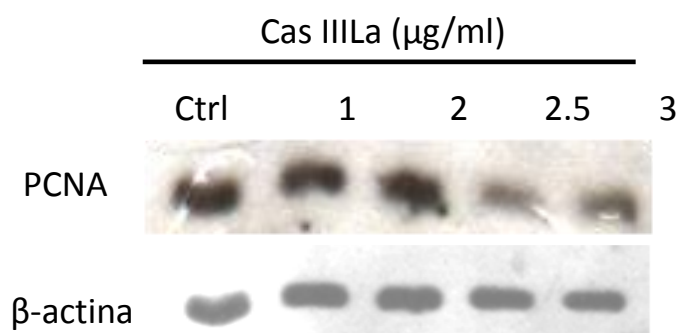
**Fig. 2. Cas IIIa inhibe la viabilidad celular de CAL-27.** La viabilidad medida por MTT mostró que el efecto es dosis dependiente y que la mayor actividad se observó a la dosis de 2.5 µg/ml. Los datos representan la media ± DE (\*p≤0.05, \*\*p ≤ 0.01 y, \*\*\*p≤0.001).

Se observó que la disminución significativa en el porcentaje de viabilidad celular, se presentó desde la dosis más baja (1 µg/ml) hasta la dosis de 2.5 µg/ml en CAL-27, presentando su mayor efecto entre las dosis de 2 a 2.5 µg/ml. Se demostró que aún a dosis bajas existe actividad del fármaco, ocasionando un descenso en la viabilidad celular. Sin embargo, en los fibroblastos gingivales el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta la dosis de 2 µg/ml con respecto al control, incrementando ligeramente y manteniéndose el efecto a dosis altas. Al comparar los resultados entre los dos tipos celulares, el porcentaje de fibroblastos viables fue mayor (80%) respecto a las células

neoplásicas (26%) cuando se empleó la dosis más alta de Cas IIIa (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), manteniéndose la diferencia de porcentajes en las demás dosis del fármaco. Se observó claramente mayor actividad de la Cas IIIa en células CAL-27 que en fibroblastos gingivales y el efecto es dosis dependiente sobre la viabilidad celular (**Figura 2**). Lo anterior indica que el fármaco presenta mayor afinidad por células neoplásicas que por células sanas.

Para demostrar que la Cas IIIa inhibe la proliferación celular en la células CAL-27, se analizó la expresión de PCNA por Wb, es una proteína que se localiza en el núcleo de las células y tiene un papel importante en la iniciación de la proliferación celular mediante la ADN polimerasa.

Los resultados mostraron que los niveles en la expresión de PCNA disminuyeron a partir de la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 3**). Se confirmó que la Cas IIIa inhibe la proliferación celular e induce la muerte de las células CAL-27.



**Fig. 3. Efecto en la expresión de PCNA.** El WB revela descenso en los niveles de PCNA.

## 10.2. La Cas III<sub>A</sub> induce muerte celular por activación de apoptosis.

### 10.2.1. Determinación de la muerte celular y análisis del ciclo celular.

Para determinar si la disminución en la viabilidad celular por la Cas III<sub>A</sub> fue el resultado de inducción de la muerte celular sobre los cultivos tratados con Cas III<sub>A</sub>, se analizó la aparición del pico subG<sub>0</sub> por la técnica de ioduro de propidio. La fase G<sub>0</sub> es un período en el ciclo de una célula en donde las células atraviesan por un estado quiescente, pudiendo permanecer ahí o producirse algún tipo de muerte celular. Los resultados mostraron que en el grupo control, el 6.25% de las células se encontraron en la etapa de subG<sub>0</sub> y en presencia de la Cas III<sub>A</sub>, el porcentaje de células que entraron en esta fase fue aumentando considerablemente al incrementar las dosis, de manera que al llegar a la concentración más alta de 3 µg/ml casi el total de las células estuvieron en fase subG<sub>0</sub> (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Efecto de la Cas III<sub>A</sub> en el ciclo celular.**

Cas III <sub>A</sub> (µg/ml)	% subG <sub>0</sub>
Ctrl	6.25 ± 1.4
1	54.92 ± 4.7
2	98.37 ± 1.9
2.5	99.48 ± 0.46
3	99.89 ± 0.11

Debido al incremento en el arresto de las células en la fase subG<sub>0</sub>, las células salen del ciclo celular y por tanto se produce algún tipo de muerte celular. Este resultado

mostró que la Cas IIIa indujo la muerte celular de las CAL-27 y en presencia de ésta, el porcentaje de muerte aumentó de manera dosis dependiente (**Figura 4**).

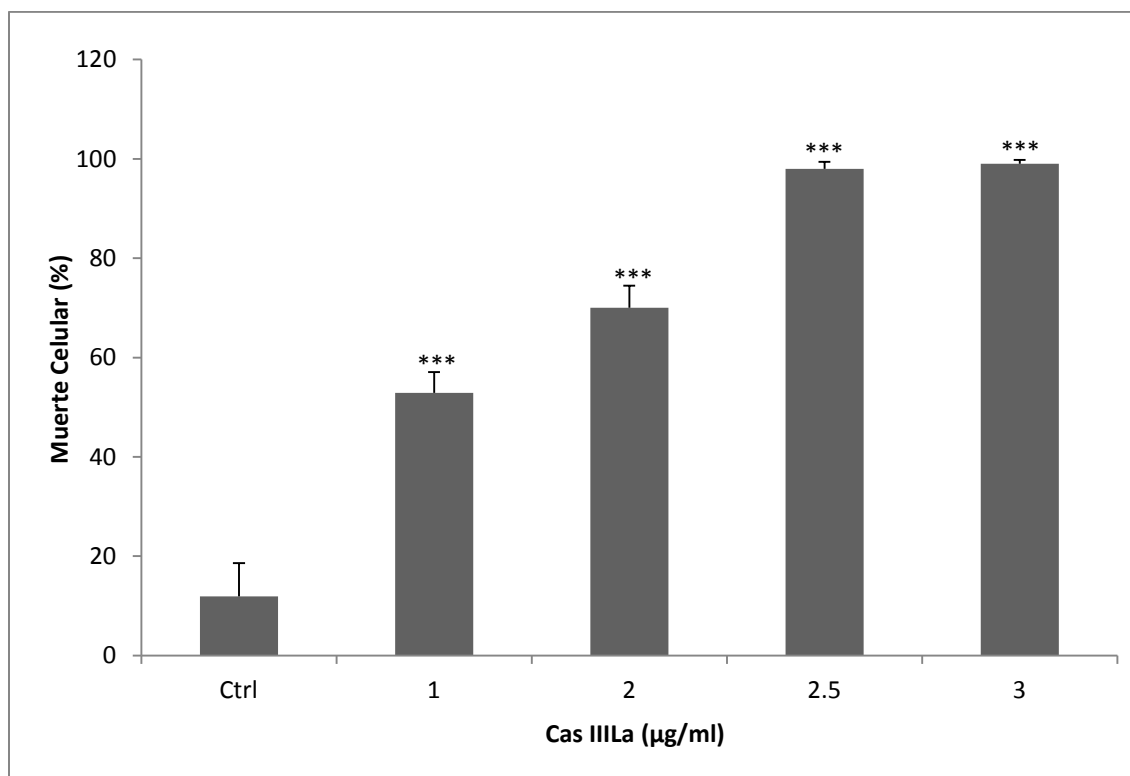


Fig. 4. Muerte celular de CAL-27 en el grupo control y tratados por 24 h medido por citometría de flujo después de la tinción con ioduro de propidio. El 99.48% de muerte celular se observó a partir de la dosis de 2.5 µg/ml. ± DE (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y, \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

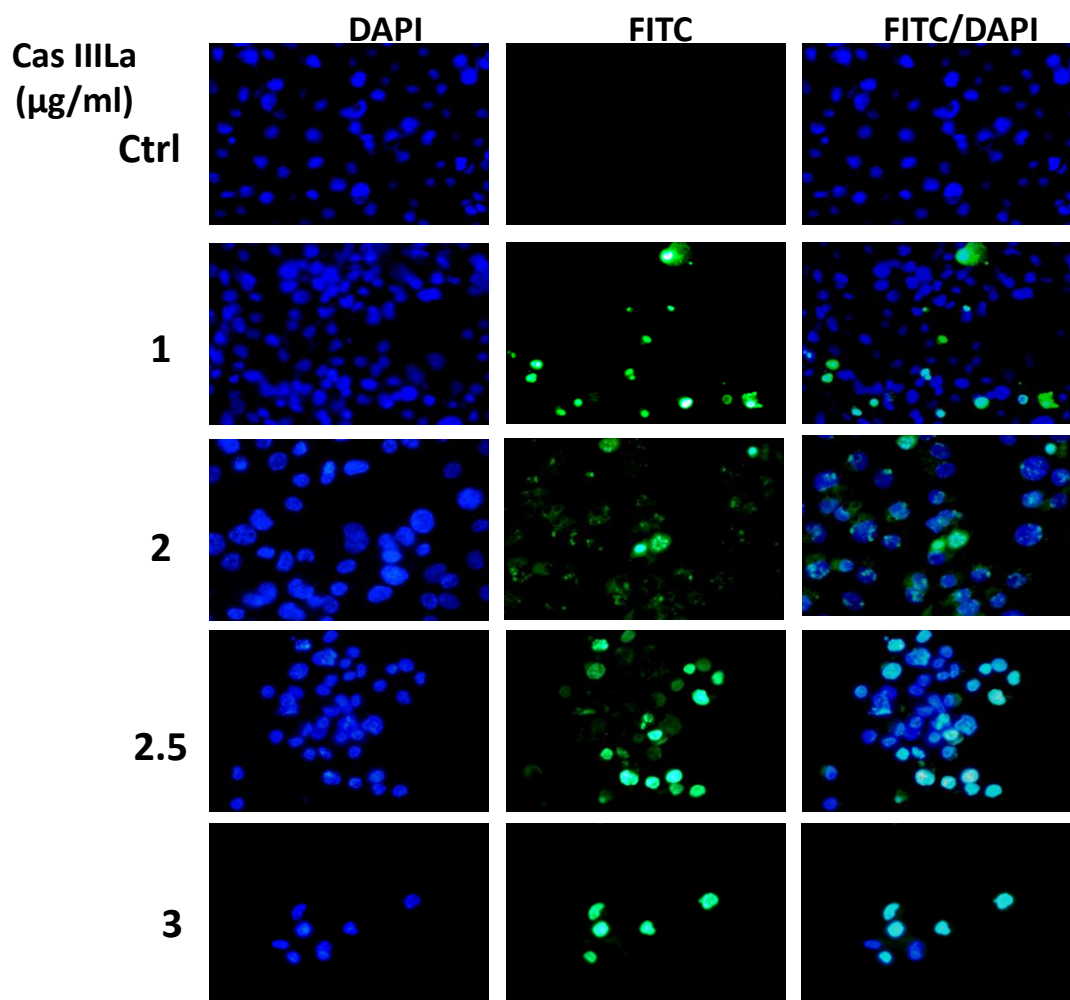
### 10.2.2. Determinación de apoptosis.

Para determinar el tipo de muerte celular, se realizó el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL.

En los resultados se observó que el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) fue positivo en todas las dosis de la Cas IIIa y negativo en el grupo control. En la **Figura 5**, se observa la positividad en el núcleo de las células debido a la



fragmentación del ADN, permitiendo que el extremo 3'-OH quede libre y es ahí en donde se incorporan los nucleótidos marcados por la acción de la enzima TdT. Se muestra que al incrementar la dosis del fármaco hay mayor cantidad de células positivas al mismo tiempo que disminuyen en número por aumento de la muerte celular. Lo anterior indicó que la muerte celular posiblemente era por apoptosis.



**Fig. 5. Cultivos tratados de CAL-27 teñidos con la reacción de TUNEL que muestran muerte celular dosis dependiente.** Sobresale la positividad de la mayoría de las células en la dosis de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ . FITC: unión de dUTP al extremo 3'-OH del ADN fragmentado. DAPI: tiñe el núcleo de las células.

Se determinó la activación de la proteína proapoptótica Bid a Bid truncado (Bidt), Bax y la activación de las caspasas 8 y 3 sobre los cultivos celulares tratados mediante WB.

Se observó una disminución en la expresión de la pro-caspasa 8 conforme se incrementó la dosis de Cas IIIa, lo que sugirió la probable activación de la caspasa 8. Bid mostró activación hacia su forma truncada (Bidt) y se observó un incremento en la expresión de Bax, así como activación de la caspasa 3 (**Figura 6**).

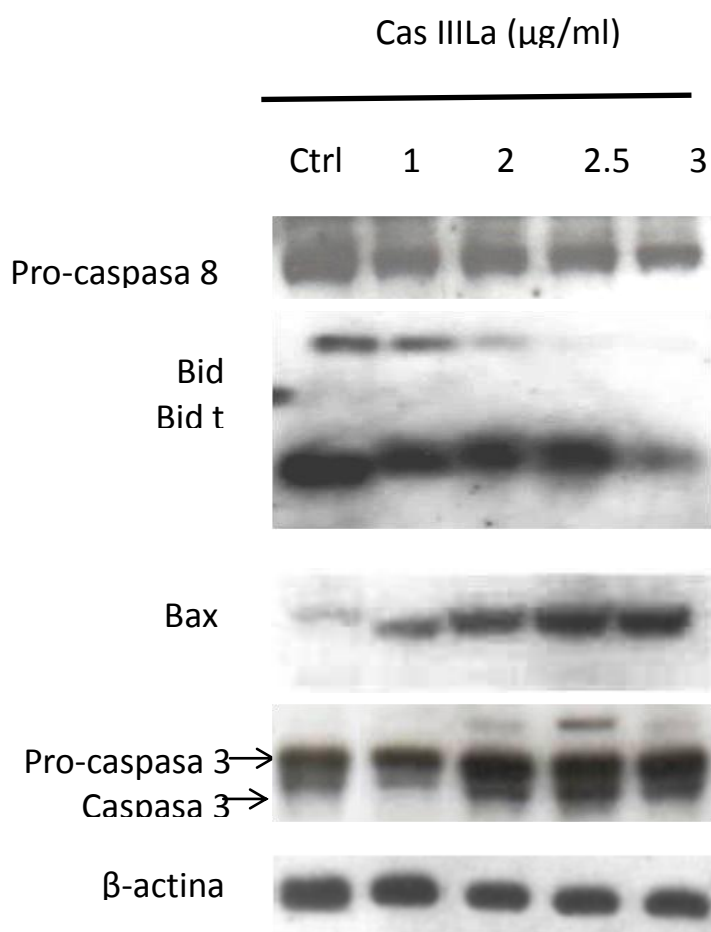
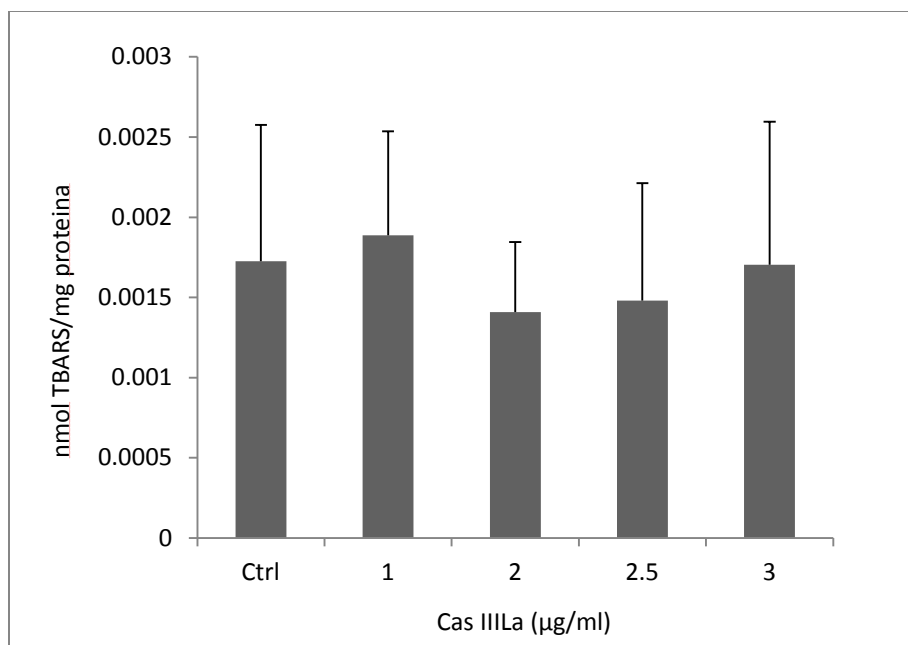


Fig. 6. Análisis por WB de Bax, Bid, Caspasa 3 y 8 a partir del lisado total obtenido de las células control y experimentales.

### 10.2.3. Formación de ERO.

Los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian, juegan un papel central en el equilibrio de la homeostasis. Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, capaz de inducir daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Finkel and Holbrook 2000).

Por tanto, se planteó determinar la presencia de ERO por medio de la sonda DCFH-DA en células lisadas, previamente tratadas con la Cas III<sub>L</sub>a y en el grupo control. Los resultados obtenidos no mostraron incremento en la generación de ERO, posiblemente porque dichos metabolitos presentan una vida media muy corta (**Figura 7**).



**Fig. 7. Determinación de ERO mediante la sonda DCFH-DA en cultivos tratados con Cas IIIa.** No se observa incremento significativo en la generación de ERO en ninguna de las dosis. Los datos representan la media  $\pm$  DE (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y, \*\*\* $p \leq 0.001$ ). La significancia estimada es de; 0.32 [1 µg/ml], 0.16 [2 µg/ml], 0.25 [2.5 µg/ml] y 0.47 [3 µg/ml]).

Para corroborar lo anterior, se midieron los productos aldehícos generados por la lipoperoxidación en los grupos controles y tratados tras 24 h de incubación. Se empleó la reacción de TBARS en donde se observó que no hubo diferencias significativas entre el control y los grupos tratados (**Figura 8**).

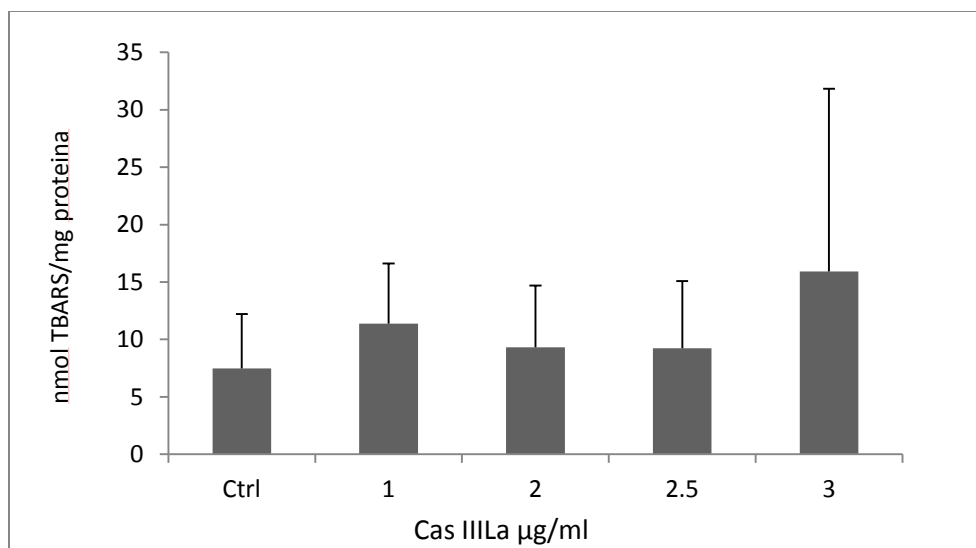


Fig.8. **Determinación de productos aldehídicos en cultivos tratados con Cas IIIa mediante la reacción de ácido tiobarbitúrico.** No hubo diferencias estadísticamente significativas. Los datos representan la media  $\pm$  DE (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y, \*\*\* $p \leq 0.001$ , la significancia estimada es de: 0.15 [1 $\mu\text{g/ml}$ ], 0.31 [2 $\mu\text{g/ml}$ ], 0.32 [2.5 $\mu\text{g/ml}$ ] y 0.17 [3 $\mu\text{g/ml}$ ]).

#### 10.2.4. Determinación del involucramiento de ERO.

Uno de los blancos de las especies reactivas de oxígeno son las enzimas antioxidantes, las cuales trabajan en las células para evitar los daños que éstas pueden ocasionar. Por lo tanto, se trataron cultivos de CAL-27 con la Cas IIIa más cada uno de los atrapadores de ERO (catalasa, SOD, DMSO).

Después de 24h de tratamiento al analizarlas por ensayo de MTT, en los resultados se observó rescate de la muerte celular de las CAL-27 en presencia de SOD sólo a la dosis de 25 U/ml en un 17.99% y 50 U/ml en un 10.2%. Sin embargo, con catalasa y DMSO no se observó rescate de la muerte celular (**Figura 9**).

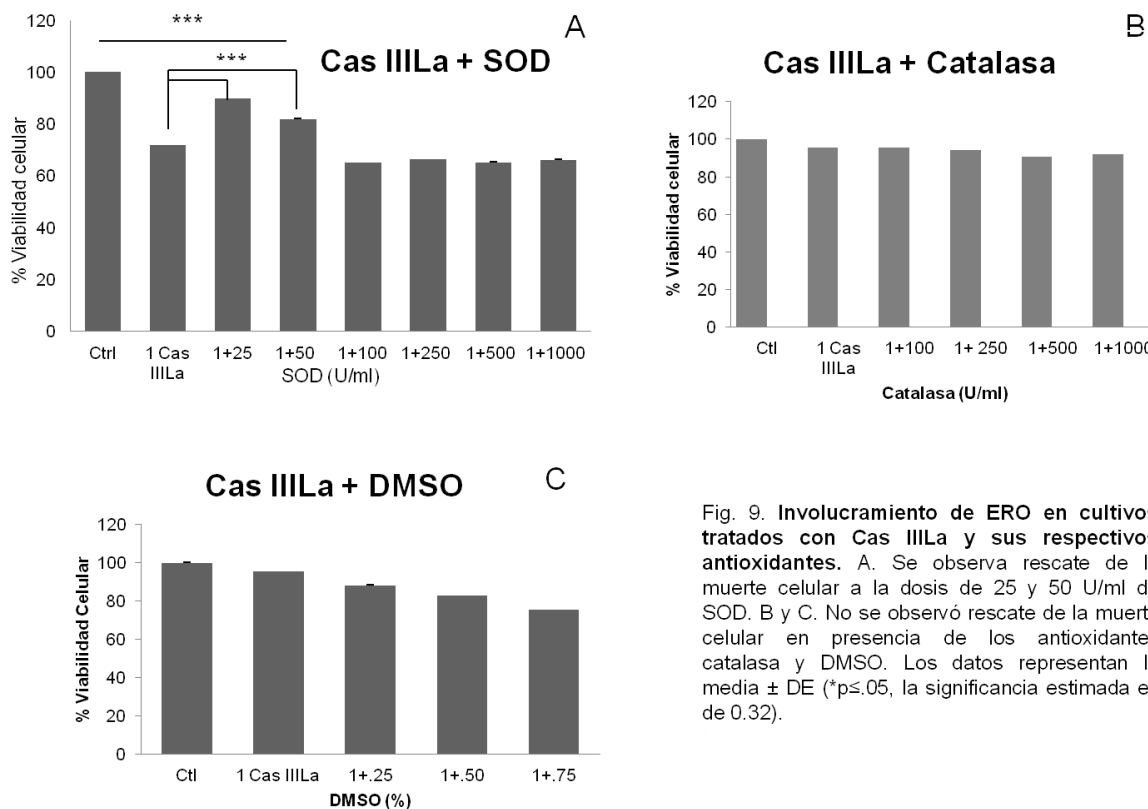
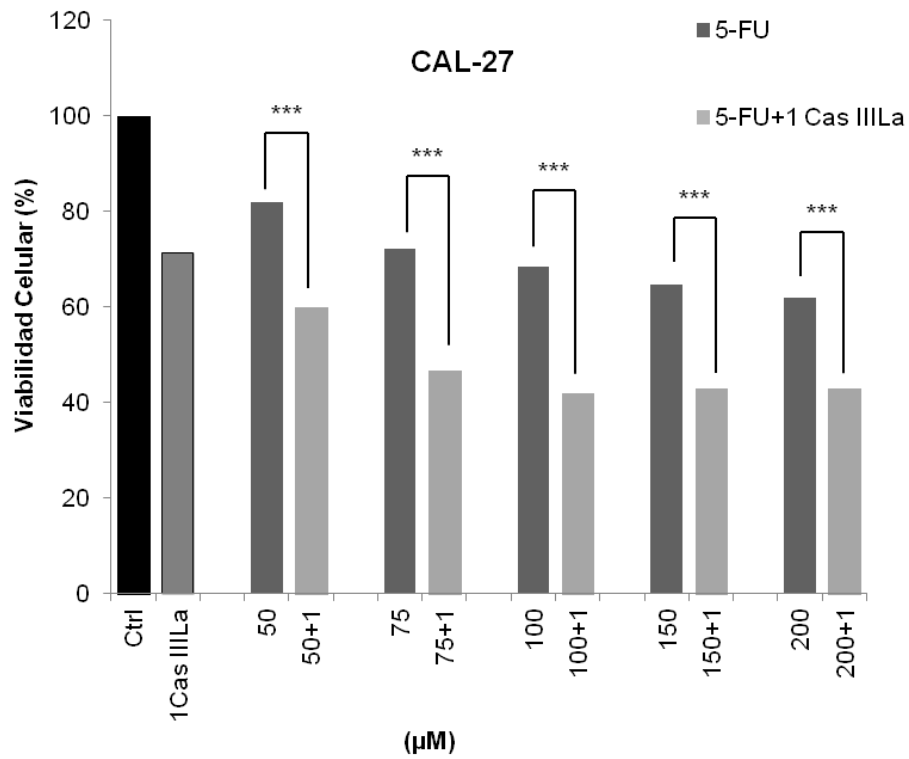


Fig. 9. Involucramiento de ERO en cultivos tratados con Cas IIIa y sus respectivos antioxidantes. A. Se observa rescate de la muerte celular a la dosis de 25 y 50 U/ml de SOD. B y C. No se observó rescate de la muerte celular en presencia de los antioxidantes catalasa y DMSO. Los datos representan la media  $\pm$  DE (\* $p \leq .05$ , la significancia estimada es de 0.32).

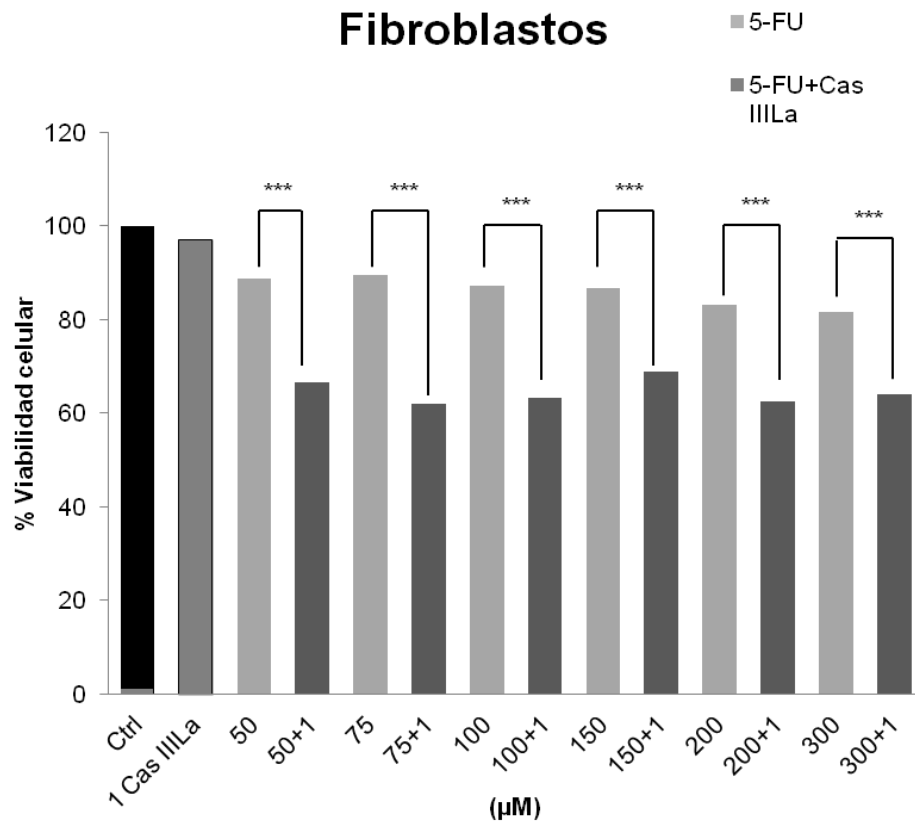
### 10.3. Efecto coadyuvante de Cas IIIa con el 5-fluoracilo.

El 5-FU es el antineoplásico más ampliamente utilizado en el tratamiento del CCEO por lo que se empleó para establecer si la Cas IIIa tenía un efecto coadyuvante con dicho fármaco. En cultivos de CAL-27 y fibroblastos gingivales, se aplicaron tratamientos con Cas IIIa a las dosis de 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en combinación con el 5-FU a las dosis 50, 75, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$  por 24h. Se determinó la viabilidad celular por ensayo de MTT, en donde se observó una mayor disminución en la viabilidad celular de las CAL-27 tratadas con ambos fármacos, mostrando así un efecto coadyuvante con el 5-FU sobre las células (**Figura 10**). Al comparar por separado la Cas IIIa con el 5-FU, se observó que es mayor el efecto de la Cas IIIa que el del 5-FU. Por otro lado, en los fibroblastos gingivales también se

observó una disminución de la viabilidad celular, pero en menor porcentaje en comparación con la línea CAL-27 (**Figura 11**).



**Fig. 10. Efecto coadyuvante de 5-fluoracilo y Cas IIIa sobre CAL-27.**  
Los datos representan la media  $\pm$  DE (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y, \*\*\* $p \leq 0.001$ ).



**Fig. 11. Efecto coadyuvante de 5-fluoracilo y Cas IIIa sobre fibroblastos gingivales.** Los datos representan la media  $\pm$  DE (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y, \*\*\* $p \leq 0.001$ ).



## 11. DISCUSIÓN.

El estudio del CCEO y sus posibles tratamientos sigue siendo un tema de gran importancia, ya que en México actualmente cada vez se presenta en edades más tempranas y con una mayor incidencia en lengua (Hernández *et al.*, en prensa).

Debido a que la Cas III-ia en modelos experimentales *in vitro e in vivo* han mostrado incrementar la muerte celular vía activación de la apoptosis (Trejo *et al.*, 2005; Mejia C y Ruiz L 2008; Trejo *et al.*, 2012), es interesante el estudio de la Cas III La como posible tratamiento antineoplásico del CCEO. Debido a que actualmente no hay reportes del mecanismo de acción de la Cas III La sobre el CCEO, se utilizó la línea celular CAL-27 de carcinoma de células escamosas de lengua, como modelo para estudiar los efectos antineoplásicos de esta Casiopeína.

En el cáncer, las células crecen a un ritmo descontrolado en el que se crean diferentes alteraciones que afectan procesos y vías que están relacionadas con la proliferación y diferenciación, muchas de las cuales traen como resultados desregulación del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2000; García-Carrancá 2003). Los resultados mostraron que la Cas III La tiene un efecto antineoplásico sobre la línea CAL-27 mediante la inhibición de la proliferación celular, aparentemente incrementando la muerte celular por apoptosis de manera dosis dependiente.

En estudios previos, se ha visto que la apoptosis tiene un papel central en la muerte inducida por fármacos sobre las células tumorales (Kaufmann y Eatnshaw

2000) y específicamente que las Casiopeínas inducen muerte vía dependiente e independiente de caspasas principalmente mediante la generación de ERO (Trejo *et al.*, 2005). La Cas III La mostró que su mecanismo de acción es vía dependiente de caspasas al observarse una disminución de la pro-caspasa 8 de manera gradual incrementando la dosis del fármaco, sugiriendo así que se activa a caspasa 8.

La proteína Bid reveló activación hacia su forma Bidt, debido a que la proteína Bid es sustrato de la caspasa 8, la caspasa rompe y activa a Bid originándose Bidt, el cual induce la translocación y oligomerización de la proteína pro-apoptótica Bax del citosol a la mitocondria (Li *et al.*, 1998). En nuestros resultados se observó un incremento de la expresión de Bax, así como la activación de la caspasa 3. Por lo que se deduce, que la sobreexpresión de Bax en la mitocondria inhibe a Bcl-2 e induce a la liberación del cit c al citoplasma, ya sea por la formación del poro por multimeros de Bax (Roucou *et al.*, 2002a) o por la inducción de a la apertura del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Shimizu *et al.*, 1999), produciendo la liberación del cit c, permitiendo así el reclutamiento y activación de la caspasa 9 (Zou *et al.*, 1997), la cual activa a las caspasas efectoras de apoptosis 3 y 7.

El mecanismo propuesto en diversas investigaciones por el cual las casiopeínas ejercen efecto antineoplásico es principalmente mediante la generación de ERO, por ser compuestos de coordinación de cobre son tóxicas por su alto potencial de participar en reacciones redox, generando la producción de ERO (Ferrer *et al.*, 1997). Estudios con Cas II gly mostraron que la producción de ERO se da por agotamiento en los niveles de glutatión (GSH) intracelular que eventualmente induce a el agotamiento de GSH mitocondrial y se ha asociado con niveles

aumentados de ERO mitocondrial y disfunción mitocondrial (Kachadourian *et al.*, 2010). También se ha observado que los compuestos de cobre-fenantrolina interactúan con el ADN mitocondrial generando daño en éste, dando como resultado un desequilibrio de los complejos de la cadena respiratoria, que se ha asociado con un aumento de la liberación de  $O_2^-$  (Wallace, D.C., 1999).

En el caso de la Cas III La al medir la generación de ERO con la sonda DCFH-DA no se observó incremento en la generación de ERO, probablemente debido a que las ERO son altamente reactivas y en consecuencia su vida media es corta. Por regla general, su presencia se infiere por los cambios característicos que producen en otras moléculas de su entorno próximo, como peroxidación de ácidos grasos, carbonilación y polimerización de proteínas entre otras (Gamaley *et al.*, 1999). Al medir los productos aldehícos generados por la lipoperoxidación de ácidos grasos, no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, para evitar el daño causado por las ERO en condiciones normales las células cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos que evitan que mueran por esta causa (Carvallo *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que en presencia de los antioxidantes SOD, Catalasa y DMSO, solo existió rescate de la muerte celular a dosis bajas de SOD y, con Catalasa y DMSO no existió rescate. Por lo que posiblemente la Cas III La si induce la generación de ERO.

La generación de ERO produce apoptosis por diferentes mecanismos, como es la liberación de factores apoptogénicos por daño en la mitocondria, o porque activan factores de transcripción como NF-kB o AP-1, los cuales se encargan de regular transcripcionalmente al receptor de muerte FAS y su ligando, induciendo así apoptosis vía extrínseca.

Como se mencionó anteriormente, un medicamento antineoplásico busca la eliminación de células tumorales sin afectar o dañar a las células normales. La mayoría de los fármacos antineoplásicos usados actualmente tienen una eficacia limitada y alta toxicidad, ya que también afectan a las células normales (Vizcaya *et al.*, 2003) como es el caso del 5-FU. Los fármacos con cationes lipofílicos son concentrados por la célula en las mitocondrias, debido al potencial eléctrico de membrana altamente negativo (Vizcaya *et al.*, 2003). El estudio en la Cas IIgly reportó que los potenciales de membrana plasmática y mitocondrial de las células tumorales (Koya *et al.*, 1996) pueden mejorar la orientación selectiva de Cas IIgly en las células tumorales y mitocondrias (Trejo *et al.*, 2005). Debido a ello, fibroblastos gingivales sanos fueron tratados con la Cas IIIa y el 5-FU. Los resultados mostraron que la Cas IIIa tiene mayor afinidad por las células neoplásicas que por los fibroblastos. Posiblemente también pueden influir en dicha selectividad los cambios fenotípicos que sufre la membrana celular en el cáncer, una de estas modificaciones son los cambios en la sialilación de las células malignas. Se ha reportado que la presencia del grupo carboxilo en el carbono 1 y del grupo amino en el carbono 5 en los ácidos siálicos, le confiere una carga neta negativa a pH fisiológico (Travig *et al.*, 1998). Debido a que la Cas IIIa presenta en su conformación al cobre le confiere una carga positiva, pudiendo ser atraída hacia las células neoplásicas. Por otro lado, el tratamiento con el 5-FU mostró mayor citotoxicidad que la Cas IIIa sobre los fibroblastos.

Por último, se estudió el posible efecto coadyuvante de la Cas III La junto con el 5-FU sobre las células CAL-27 y sobre fibroblastos, y se comparó por separado cada fármaco. En este estudio se observó que existe un efecto coadyuvante sobre las células CAL-27. Sin embargo, si comparamos la actividad que tiene la Cas III La por sí sola, el efecto es mucho mayor a dosis más bajas de las que se usan para el 5-FU. Por lo tanto, la utilización de ambos fármacos de manera simultánea, no representa ninguna ventaja adicional que pueda sugerir su utilización en el tratamiento del CCEO de forma combinada.

Con los resultados obtenidos, la Cas III La podría ser considerada en un futuro dentro del tratamiento de elección para el CCEO por su efecto antineoplásico, afinidad hacia las células neoplásicas, por su eficiencia a dosis bajas y, por su menor citotoxicidad en células sanas. No obstante, queda mucho por estudiar acerca del mecanismo de la Cas III La tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

## **12. CONCLUSIONES.**

- La Cas III-La mostró un efecto antineoplásico de manera dosis-dependiente desde las concentraciones más bajas, a través de la inhibición de la proliferación celular e inducción de muerte celular en los cultivos de CAL-27.
- La Cas III-La indujo muerte celular sobre las células CAL-27 vía apoptosis dependiente de caspasas.
- El mecanismo de acción de la Cas III-La se inicia posiblemente dependiente de EROs.
- La Cas III-La junto con el 5-FU genera un efecto coadyuvante, pero debido a que este último requiere de dosis más altas, puede generar mayor citotoxicidad. Lo anterior se traduce en la posibilidad de emplear la Cas III-La como fármaco único y no como coadyuvante en el tratamiento del CCEO.

### 13.PERSPECTIVAS

- Determinar la participación de ERO con un atioxidante general como NAC (N-Acetilcisteína).
- Estudiar la participación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1, mediante su inhibición.
- Debido a las propiedades antineoplásicas de la Cas III<sub>La</sub> en el modelo *in vitro* estudiado, será de gran importancia continuar con el estudio de sus efectos en modelos *in vivo*.

## 11. Productos de la investigación

Presentaciones orales:

- Primer Congreso de Alumnos de Posgrado. Ciudad Universitaria, mayo de 2011.
- Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR). Acapulco, Gro., junio de 2011.

Presentaciones en formato de cartel:

- Frontiers in Immunology Research International Conference. Salzburg, Austria, Julio 2012
- Segundo Congreso de Alumnos de Posgrado. Ciudad Universitaria, abril de 2012.



## 12. REFERENCIAS.

- Aguilera E, Martinez E, Máciás R, Cortés M, Ortiz M, Ruiz R, and Garcia M, Estimación del porcentaje de Muerte celular por Apoptosis y Necrosis en Células HeLa, Inducido por cinco Casiopeínas de la Familia III. Memorias de 5ª Jornada de Trabajos en Casiopeínas. Primer Congreso en Casiopeínas. Taxco, Guerrero, 2 a 3 de Diciembre de 2002. p 49-55.
- Azuma M, Harada K, Supriatno, Tamatani T, Motegi K, Ashida Y and Sato M. Potentiation of induction of apoptosis by sequential treatment with cisplatin followed by 5-fluouracil in human oral cancer cells. International Journal of Oncology. 2004; 24:1449-1455.
- Bravo M, Tovar A, Ruiz M, Ruiz R, and Moreno E. Diseño, Síntesis y Caracterización de compuestos de Coordinación de Cobre Casiopeinas®. Memorias de 5ª Jornada de Trabajos en Casiopeínas. Primer Congreso en Casiopeínas. Taxco, Guerrero, 2 a 3 de Diciembre de 2002. p 1-9.
- Carvallo F, Trejo C, Gómez C, Rodríguez E, Macías L, Cortés E, Cedillo C, Gracia I, Ruiz L, Madrid V and Constatino F. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cell in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. Biometals 2008; 21:17-28.

Casiglia J and Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *General Dentistry* 2001; 49:72-82.

Chang H, Bartos DP and Owen S. *Molecular Cell Biology* 1999; 19:2098-2108.

De Camargo M, Voti L, Guerra M, Chapuis F, Mazuir M and Curado M. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: Population-based incidence. *Head & Neck* 2010;32:357-367.

Ferrer G, Ruíz L and Radi R. Ternary copper complexes and manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin catalyse peroxynitrite-dependent nitration of aromatics. *Chemical Research in Toxicology*. 1997; 10: 1338-1344.

Finkel T and Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.

Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK and Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Donor Data Base Report. *Head & Neck* 2002; 24:165-180.

Galindo R, Hernandez J, González M, Cortés F, Ruíz L and Moreno R.  $\pi$ -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases. *The Journal of Physical Chemistry* 2011;13:14510-14515.

Gamaley IA and Kluybin IV. Roles of reactivio oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International Review of Cytology* 1999; 188: 203-255.

García-Carrancá A. La célula cancerosa. En: Jiménez, L.F., Merchant, H. Ed. *Biología Celular y Molecular*. México DF. 2003. Pearson Ed.

Gutiérrez Rodríguez, AG. Estudio de especies reactivas de oxígeno en el neuroblastoma por efecto de las Casiopeínas®. Tesis Maestría. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Hannahan D Weinberger. The hallmark of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.

Henri RE, Versteeg, Paul MP, Van-Bergen, Sander JH and Van-Deventer M. Cyclooxygenase-dependent signaling: molecular events and consequences. *FEBS Letters* 1999; 445:1-5.

Hernández JC, Jacinto LF, Jiménez MD, Macario A, Hernández F y Alcántara A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma in the General Hospital of Mexico City. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (en prensa).

Jefferies S and Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2001; 37:115–126.

Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas G, Kalavrezos N and Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Hed & Neck Oncology*. 2010, 2:9.

Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002, 108:153–164.

Kaufmann SH and Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*. 2000;256:42–49

Kasibhatla S, Genestier L and Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:987-992.

Khuri FR, Lippman SM, Spitz MR, Lotan R and Hong WK. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89:199-211.

Khuri FR, Kim E, Lee J, Winn R, Benne S and Lippman S. The Impact of Smoking Status, Disease Stage, and Index Tumor Site on Second Primary Tumor Recurrence in the Head and Neck Retinoid Chemoprevention Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001; 10:823-829.

Koya K, Li Y, Wang H, Ukai T, Tatsuta N and Kawakami M. MKT-007, a novel rhodacyanine dye in clinical trials. Exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Research* 1996; 56:538-543.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, Van der Waal I and Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994; 73:187-90.

Li H, Zhu H, Xu C and Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 90:405-413

- Lim JW, Kim H and Kim KH. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001; 81:343-360.
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum and Levin AC. NS398 selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCap cells. *Cancer Research* 1998; 58:4245-4249.
- Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A and Ju ST. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in cell hybridoma. *The Journal of Immunology* 1998; 161:3469-3473.
- McClevert, J.A. & Meyer, T.J. (2004) 9.18 Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. *Comprehensive Coordination Chemistry II. From Biology to Nanotechnology. Vol.9 Applications of Coordination Chemistry.* [Editor del Volumen: Ward, M.D.] Elsevier Pergamon, Reino Unido.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281:1305-1308.
- Medina R, Muñoz JL, Ruiz L and Gracia I. Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in Vitro* 2008; 22:710–715.
- Mejia C and Ruiz L. Casiopeinas IIgly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells. *Pathology and Oncology Research* 2008, 14:467-472.
- Mignogna MD and Lo Russo L. The World Cancer Report and the Burden of Oral Cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 2004; 13:139-142

Miller C, Henry R and Kay M. Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* 2003;95:570-575.

Moreno-López L.A. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncology* 2000; 36: 170-174

Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J. *Oral & Maxillofacial Pathology*. Saunders 2011.

Nunn J, Nagini S, Risk JM, Prime W, Maloney P, Liloglou T, Jones AS, Rogers SR, Gosney JR, Woolgar J and Field JK. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2003; 39:115–129.

Ohtani T, Hatori M, Ito H, Takizawa K, Kamijo R and Nagumo M. Involvement of caspases in 5-FU induced apoptosis in an oral cancer cell line. *Anticancer Research* 2000; 20:3117–3121.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappa B transcription factor. *Oncogene* 1999; 18:6853-6866.

Parkin DM, Posani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer* 1993; 54:594–606.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. *Global cancer statistics, 2002*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2005; 55:74–108.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L and Thomas DB. Cancer incidence in five continents Vol. VIII IARC Press: Lyon, 2003.

Regezi JA and Jordan RC. Oral cancer in the molecular age. Journal of the California Dental Association 2001; 29:578–584.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, editors. Oral pathology. 4th ed. W.B. Saunders; 2003. p. 52–72 [Chapter 2, p.23–74].

Rivero A, De Vizcaya A, Plant N, Ruiz L and Dobrota M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. Chemico Biological Interactions 2007;165:189-199.

Roucou X, Rostovtseva T, Montessuit S, Martinou JC and Antonsson B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bas Channels in liposomes. Biochemical Journal 2002a; 363(Pt 3):547-552.

Ruiz Azuara, L.

a. Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico. SECOFI.

REGISTROS NUM: 18801-120579,18802-105800.

b. US Patent Re 35, 458 Feb 18 (1997).

US Patent Number Ap 21 (1992).

No de registro 55763260, Nov 19 1996

No de registro 34458, Feb18 1996 EEUU.

Ruiz L and Bravo ME. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17 (31):3606-3615.

Ruiz L, De La Rosa ME, Gracia MI and Mendoza A. Casiopeinas, metal based-drugs, a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Inorganic Biochemistry* 1995; 59:206.

Sankaranarayanan R. Oral cancer in India: An epidemiologic and clinical review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1990; 69:325-330.

Scott JA, Homcy CJ, Khaw BA and Rabito CA. Quantitation of intracellular oxidation in a renal epithelial cell line. *Free Radical Biology & Medicine* 1988; 4:79-83.

Scully Crispian. *Oral and Maxillofacial Medicine*. Elsevier Science. 2004

Scully C, Field JK and Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncology* 2000; 36:311–327.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology* 2002; 38:227–234.

Shah JP, Jonson NW and Batsakis JG. *Oral cancer*. Martin Dunita. Reino Unido, 2003.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN. Modulation of apoptosis and expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research* 1998; 58:362-366.



- Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondria channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483-487.
- Southorn PA and Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 1988; 63:381-389.
- Stoll C, Baretton G, Ahrens C and Lohrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 2000; 436:102–108.
- Stons SJ, Bagchi, D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol Med* 1995; 18:321-336.
- Travig C and Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular Molecular Life Sciences*. 1998; 54:1330-1349.
- Tong D, Poot M, Hu D and Oda D. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncology* 2000; 36:236–241.
- Trejo-Solis C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropón A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Márquez-Rosado L, Sánchez A, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enríquez S and Sotelo J. Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* 2005; 7:563-574.
- Trejo-Solís C, Jiménez-Farfán D, Rodríguez-Enríquez S, Fernández-Valverde F, Cruz-Salgado A, Ruíz-Azuara L and Sotelo J. Copper compound induces

autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation. *BMC Cancer*. 2012 Apr 27; 12:156.

Van Hogerlinder M, Rozell BL, Ahrlund R and Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Research* 1999; 59:3299-3303.

Vizcaya R, Rivero M, Ruiz R, Howart J and Dobrota M. Hematotoxicity response in rats by de Koper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology* 2003; 194:103-113.

Wallace D.C. Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999; 283:1482-1488.

Yoneda K, Yamamoto T and Osaki T. p53- and p21-independent apoptosis of squamous cell carcinoma cells induced by 5-fluorouracil and radiation. *Oral Oncology* 1998; 34:529–537.

Zou H, HenzelW, Liu X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C elegans CED-4, participates in cytochrome c- dependent activation of caspase -3. *Cell* 1997; 90:405-413.