



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**“Efecto del compuesto S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido
(MeDDTC-SO), sobre el potencial proliferativo, muerte y ciclo celular de
las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer
cervicouterino”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
KARLA GALICIA OLIVOS

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.,

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis papas

Marco Antonio y Araceli

Por brindarme apoyó, cariño, amor; por que siempre confiaron en mí; me dieron las armas necesarias para poder vencer cualquier obstáculo; inculcándome confianza, tenacidad, perseverancia y honestidad. Este no es sólo mi triunfo, es una meta que cumplimos juntos. Los adoro son el pilar de mi vida.

A mis hermanos

Marco Antonio, Alejandro y Emmanuel

Ellos más que mis hermanos son unos magníficos amigos, con los cuales contaré siempre.

A mis abuelitos

Carlos †, Gaby †, Humberto y Margarita

Que me compartieron sus conocimientos y experiencias, dándome el impulso para seguir adelante, inculcándome que las cosas no son fáciles, pero con perseverancia siempre se pueden lograr, les doy las gracias por su cariño, por sus regaños, por sus consejos.

A Ivan

Por estar a mi lado, llenar mi vida de felicidad y convertirte en la mejor historia de mi vida. Te Amo

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez, por proporcionarme todos los recursos y conocimientos que ayudaron a mi formación profesional.

Al Dr. Ignacio Regla, por donar el compuesto con el que se realizó este trabajo.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su apoyo técnico y por compartir sus conocimientos.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández, por compartir conmigo sus conocimientos y herramientas que sin duda alguna fueron indispensables para poder realizar el trabajo.

Al M. en C. Hugo López, por compartir su conocimiento que ayudó a enriquecer mi trabajo.

Al Dr. René García Sánchez, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE y al Dr. Dionisio Parra Roldan jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, por habernos facilitado las muestras de cérvix humano con las que se realizó este trabajo.

A Mariana, Elizabeth, Eliceo, Reynaldo, Yolanda, Itzel, Gaby, Araceli, Moisés, Marisol, Cindy, Elena, Rocío, Alma Rosa, Lupe, Yadira, no sólo son mis amigos, forman parte ya de mi familia, vivimos momentos increíbles que me hicieron adorarlos, gracias por permitirme ser parte de su vida, por compartir conmigo sus tristezas, alegrías e inquietudes, por que siempre tuvieron palabras para hacerme sentir mejor.

La tesis fue realizada con apoyo del proyecto PAPIME: PE204609 y del proyecto CONACYT 84380

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	
Célula	3
Proliferación celular	3
Ciclo celular	5
Muerte celular	5
Necrosis	5
Apoptosis	6
Cáncer	9
Cáncer cervicouterino	10
Tratamientos	11
Disulfiram y metabolitos	12
Planteamiento del problema	15
Justificación	16
Hipótesis	16
Objetivo general	17
Objetivos particulares	17
Método	18
Resultados	23
Discusión	30
Conclusiones	33
Apéndice	34
Referencias	39

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los carcinomas más agresivos siendo la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas después del cáncer de mama. Actualmente, las diferentes alternativas terapéuticas (Cirugía, Radioterapia y Quimioterapia), son ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad, no son suficientemente selectivas y producen efectos que deterioran la calidad de vida del paciente, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas.

Dentro de las estrategias para combatir el cáncer, se ha explorado la acción de compuestos derivados de drogas conocidas como agentes terapéuticos, destacándose al Disulfiram por sus propiedades analgésicas, antifúngicas y antitumorales entre otras. En el caso de los metabolitos del Disulfiram, se ha encontrado que pueden interferir en procesos biológicos, tales como la proliferación y/o la muerte celular. Algunos de éstos han sido probados en cáncer de pulmón, próstata y mama, sin embargo muchos otros siguen sin estudiarse, como es el caso del compuesto S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO) por lo que en el presente trabajo, se evaluó el efecto antitumoral del compuesto MeDDTC-SO sobre las células provenientes de CaCu HeLa y CaSki. Al respecto se obtuvo una IC_{50} de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ para ambas líneas tumorales. La actividad antiproliferativa del MeDDTC-SO induce una disminución de las células en fase G1 del ciclo celular y un incremento de la región subG1, sugiriendo que la actividad antiproliferativa del MeDDTC-SO es dependiente del ciclo celular. El incremento en la expresión de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN, observada en ambas líneas tumorales al ser estimuladas con el MeDDTC-SO, sugiere que este compuesto induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. De manera relevante, se encontró que la actividad antiproliferativa del MeDDTC-SO en células tumorales no afectó el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano así como en células linfocíticas de sangre periférica humana. Además, las pruebas de citotoxicidad sugieren que este Ditiocarbamato no induce un efecto citotóxico en ambas líneas tumorales ni en células linfocíticas de sangre periférica humana, indicando que el MeDDTC-SO es un compuesto con potencial antitumoral, con acción selectiva y no citotóxico, que lo hace un fuerte candidato para ser evaluado como agente quimioterapéutico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial la cual contiene diversas anomalías fenotípicas como la pérdida de la diferenciación, una alta tasa de proliferación, invasividad y con mayor frecuencia menor sensibilidad a los fármacos, por lo que la quimioterapia resulta poco eficiente, además de disminuir la calidad de vida del paciente (Alberts *et al*, 1994).

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas (INEGI 2009). Su desarrollo se asocia a factores entre los que destacan: el nivel socioeconómico bajo, el inicio temprano de la actividad sexual, el antecedente de haber tenido más de una pareja sexual, embarazo a temprana edad, más de dos partos, el uso de anticonceptivos hormonales y el tabaquismo (Tirado *et al*, 2005). El carcinoma de cérvix, en un 99 %, es originado por la infección del virus del papiloma humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70 % de casos de este cáncer (Muñoz y Bosch, 1997). El estudio de la biología del cáncer cervicouterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se manifiesta y desarrolla, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana (Alonso, 2000).

Entre las estrategias para combatir al cáncer se tiene que en los últimos años, la investigación ha explorado el papel de compuestos derivados de fármacos para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre los cuales podemos destacar a los Ditiocarbamatos. Estos son un grupo de compuestos con posibles propiedades antitumorales, dentro de los cuales podemos encontrar al Disulfiram y sus metabolitos a los cuales se les ha atribuido una participación en procesos biológicos tales como: antiproliferación, muerte celular y posibles actividades antitumorales (Ryan & Wilding, 2000; Gourley & Williamson, 2006; Daniel *et al*, 2000 y Guang-Yam *et al*, 1998). Es por ello que el estudio de estos productos ha generado un gran interés.

MARCO TEÓRICO

Célula

La célula es la unidad estructural de los sistemas vivos, es el elemento básico con la cual todos los organismos están compuestos y en donde se reconocen todas las funciones de los organismos vivos (Curtis y Barnes, 2005). Ésta se auto-reproduce y experimenta procesos de desarrollo, diferenciación y muerte (Anthony y Thibodeau, 1991).

El mantenimiento de la estructura que constituye a un organismo pluricelular requiere de señales celulares que permitan a un tejido u órgano crecer o detener su crecimiento. Estas señales guardan un equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular (Callen, 2000).

Proliferación Celular

La vida de un mamífero principia con la formación de un óvulo fecundado, a partir de ello se pueden desarrollar animales que tienen trillones de células. Cada órgano y parte del cuerpo tienen una forma determinada, así como un tamaño establecido genéticamente; la información genética está presente dentro de cada individuo en desarrollo, y esta información dicta un camino ordenado de proliferación, división y diferenciación celular para cada tejido del cuerpo (Karp, 1996).

La proliferación es gobernada por la influencia de factores activadores e inhibidores. Ambos factores interactúan con receptores localizados en la membrana celular para influir sobre el metabolismo y la decisión final de las células para dividirse o no (Johnson, 1994).

Las células normales detienen su proliferación a altas densidades, el fenómeno es una respuesta de las células al medio ambiente ya sea celular o químico, en el que se encuentran incluidas (Karp, 1992). Existen también factores que ayudan a estimular la proliferación celular o a inhibirla; estableciéndose una estrecha relación en el proceso de activación celular y los puntos de control del ciclo celular (Sonnenschein y Soto, 1999).

Ciclo Celular

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, conocido como ciclo celular, es el mecanismo esencial mediante el cual todos los seres vivos se reproducen (Alberts *et al*, 2004). El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para

reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (Burgues, 2005). Es una serie de eventos ordenados que la célula presenta para que divida su material genético (Lodish, 2000).

El ciclo celular se encuentra dividido en cuatro fases G₁, S, G₂ y M; que constituyen el mecanismo por el cual las células pueden duplicarse y transmitir la información genética a nuevas generaciones celulares (Zentella, 1996). La fase G₁ es el periodo que sigue a la fase M y en ella las células son susceptibles a estímulos que activan o bloquean la proliferación celular que determinan si la célula se divide o no (Lodish, 2000), en ella se desencadena el compromiso de división por lo que especialmente al principio de la fase se presenta una activa síntesis de ARN y proteínas, además de otros componentes celulares por lo que la célula aumenta de tamaño (Mathews y van Holde, 1998). La fase S es un periodo que transcurre con la síntesis del ADN, ésta culmina con la duplicación del ADN, formándose una copia exacta. La fase G₂ es el periodo que sigue a la fase S, en este intervalo la célula incrementa su tamaño, aumentando el número de proteínas y orgánulos, actúa como un periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta antes de comenzar la mitosis (Garret, 2001). También en esta fase el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis, actúa como un periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta antes de comenzar la mitosis (Burgues, 2005). Finalmente se inicia la mitosis o fase M durante la cual se presenta la división del material genético y la división celular; este es un proceso que garantiza que se lleve a cabo la continuidad genética que da como resultado descendientes con las mismas características de los padres. En ocasiones cuando no hay estímulos mitogénicos o se presenta un bloqueo como la inhibición por contacto, se entra a un estado denominado G₀ (Zentella, 1996) (Figura 1).

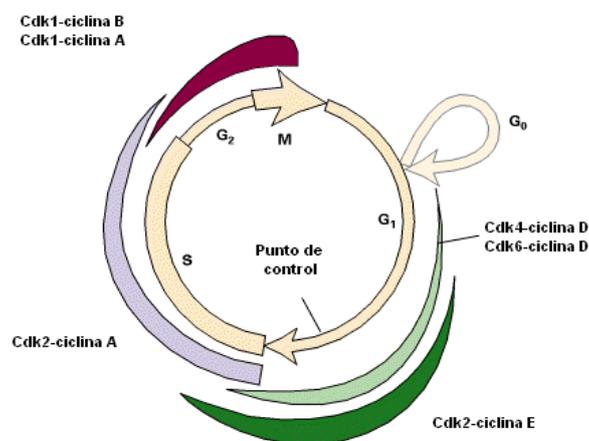


Figura 1: Etapas del ciclo celular mostrando la intervención de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas y sus ciclinas respectivas (Cdk-ciclinas) que actúan en la transición en cada una de las fases del ciclo celular. Tomado de Lodish, 2004.

Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula se encargan de dirigir el proceso a través de las distintas fases del ciclo celular. Las células eucariotas han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, conocidas como sistema de control del ciclo celular, que gobierna la progresión a través del ciclo celular: la familia de las CDKs fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo celular, y la familia de las ciclinas son proteínas que se unen a las CDKs lo que resulta en la activación. Se conocen 6 distintas combinaciones de ciclinas, cuya formación de complejos CDK-ciclina resulta en la activación de sustratos indispensables para la progresión de cada una de las diferentes fases del ciclo celular que actúan en tiempos específicos durante el ciclo celular (Peralta *et al*, 1997).

La concentración de las ciclinas, es un evento que controla el ciclo celular, es decir el aumento o decremento de dicha concentración varía según la fase del ciclo en la que se encuentre. En el ciclo celular existen 3 complejos principales de ciclinas, CDKs que actúan sobre la G, S y Mitosis:

1.- Las ciclinas D1, D2, D3 y E actúan en la fase G₁ /S, uniéndose a las Cdk 4, 6 y 2 al final de G₁ y determinan que la célula replique el DNA.

2.- Las ciclinas: A y E se unen a las Cdk 2 durante la fase S y son necesarias para iniciar la replicación del DNA.

3.- Las ciclinas: A y B estimulan a las Cdk mitóticas 2 y 1, induciendo los acontecimientos de la mitosis (Gasió *et al*, 2005).

Las células eucariotas han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, conocida como sistema de control del ciclo celular. El núcleo de este sistema es una serie ordenada de interruptores bioquímicos que controlan los principales acontecimientos del ciclo, incluyendo la replicación de ADN y la segregación de los cromosomas replicados. Estos interruptores se presentan en la fase tardía de G₁ y en la interfase G₂/M, para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas (Mathews y Van Holde, 1998).

Muerte Celular

En los organismos multicelulares, la homeostasis es mantenida a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular. En la actualidad se conocen en general dos tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis.

Necrosis

La necrosis fue descrita por primera vez en 1958 por Virchow y puede ser definida como un proceso degenerativo producido por un daño repentino y severo como un trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos (Caballero y Julio, 2002). Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintas: los cambios

tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células vecinas (Coto, 2007). La cromatina se condensa de forma irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar (Janie et al, 2007).

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como pueden ser la hipoxia, hipertermia, infecciones virales y venenos. En el proceso necrótico las células alteran su forma y pueden formar un abultamiento probablemente como un resultado de cambios en la concentración de Ca^{++} , afectando los componentes del citoesqueleto: La necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria (Bowen y Bowen, 1990).

Apoptosis

La apoptosis se define como una muerte celular programada que tienen todas las células y que está codificada genéticamente, es un proceso innato y evolutivamente conservado en el cual las células se inactivan y degradan su propia estructura (Sánchez-Torres et al, 2003); es parte de un proceso de eliminación de células en organismos maduros. Las células apoptóticas presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan de una serie de eventos controlados genéticamente (Caballero y Julio, 2002).

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la fase de ejecución se dan la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos y la tercer etapa de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Sánchez-Torres, et al.2003).

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son en muchos casos originadas por estrés biológico, el cual origina la liberación del citocromo c de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a un receptor presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca) (Cuello, 2006).

Vía intrínseca:

Los factores que desencadenan la muerte por este camino pueden ser la presencia de toxinas bacterianas, la acción de agentes físicos como rayos gamma sobre el núcleo. Estos factores activan proteínas proapoptóticas como

Bim que a su vez activan a Bcl-2, proteína presente en la membrana de la mitocondria, que interacciona con una proteína cercana llamada Bax promoviendo la salida del citocromo C del interior mitocondrial al citoplasma donde se une a la proteína Apaf-1 (factor activador 1 de la proteasa apoptótica) y a la procaspasa-9. La unión se realiza con la intervención de ATP (Adenosín trifosfato), así se forman los llamados apoptosomas (Ting-Jun *et al*, 2005). De este modo se activa la procaspasa-9, transformándola en la caspasa 9 activa (las caspasas, son una familia de proteasas, enzimas que degradan cadenas polipeptídicas) que en consecuencia activará a la procaspasa-3, convirtiéndola en la caspasa 3 activa, la cual dará lugar a una serie de eventos en cascada que terminan con la degradación de los componentes celulares y nucleares (activación de endonucleasas) (Cohen, 1997). La activación de la apoptosis puede ser inducida por diferentes proteínas que detectan el daño al ADN. Por ejemplo, la proteína p53, se libera en caso de daño al ADN y es un potente inductor de la apoptosis. Sin embargo, existen factores llamados IAPs o inhibidores de la apoptosis, los cuales funcionan en ciertas condiciones uniéndose a los apoptosomas, logrando inhibir o retrasar los eventos apoptóticos. Tanto las rutas de activación así como de inhibición de la apoptosis, actualmente son centros de fuerte atención, ya que se ha encontrado que algunas de las proteínas que participan en ambas rutas se encuentran mutadas, como es el caso de los cambios genéticos en el gen p53, mutación que da como consecuencia que la célula no responda a los factores de inducción de la apoptosis. Estas proteínas están fuertemente relacionadas con las células cancerosas (Putcha *et al*, 2002).

Vía extrínseca:

La vía extrínseca involucra la activación en receptores de la membrana celular en respuesta a señales (ligandos) extracelulares. Los Inductores de esta vía son los miembros de la familia del TNF [TNF (del inglés, Tumoral necrosis factor), Fas L (del inglés, Fas Ligand), Trail (del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand)], ligandos de los receptores de muerte celular (Zhaoyu y El-Deiry, 2005). Una vez activado el receptor se inicia la fase intracelular. Durante esa fase la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula logra sobrevivir. Pero, una vez pasado cierto punto, no hay retorno y la célula morirá. FADD (del inglés, Fas-Associated protein with Death Domain) está asociado al receptor de muerte y a su vez está en contacto con la procaspasa 8, cuando se activa la caspasa 8 desencadena una sucesión en cascada que activa a la caspasa-3 (Díaz *et al*, 2005) induciendo al complejo sistema de desmontaje celular característico de la apoptosis. Sin embargo, hay factores como el FLIP y IAPs que tienen la capacidad de evitar la apoptosis (Zhaoyu y El-Deiry, 2005). La caspasa 8 puede también cortar a la proteína Bid para dar lugar a la forma inhibida (tBid) que actúa sobre la mitocondria, de éste modo se da la conexión entre ambas vías (intrínseca y extrínseca) (Figura 2).

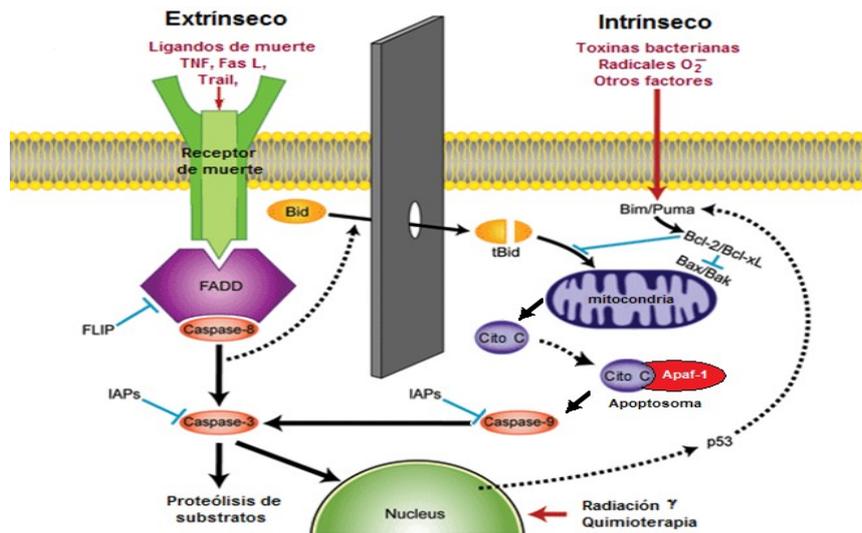


Figura. 2. Esquema simplificado de la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis (modificado de Coto, 2007)

La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno. En etapas posteriores la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta. Finalmente la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contienen parte de la cromatina y de los organelos celulares que se conocen como cuerpos apoptóticos (Alberts et al, 2002).

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de las caspasas, las cuales pertenecen a una familia de proteasas de cisteína que muestran entre sí similitud en la secuencia de aminoácidos, en estructura y en especificidad que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato (Sánchez-Torres *et al*, 2003). Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva (procaspasas) y son activadas por un corte proteolítico. Las caspasas cortan proteínas clave en la célula como la laminina que contribuye a la inestabilidad de la doble membrana nuclear además degradan a la enzima que inactiva a la ADNasa lo que ocasiona la degradación del material genético (Alberts *et al*, 1996). Las caspasa 3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del ADN (Sánchez-Torres *et al*, 2003). Existen diferencias concretas entre los dos tipos de muerte, la necrosis y la apoptosis, que pueden ser apreciadas morfológicamente y estudiadas bioquímicamente (Figura 3).

La apoptosis, es un proceso fisiológico que tiene un papel crítico en la embriogénesis, metamorfosis, respuestas del sistema inmunitario, respuesta celular a las infecciones víricas. Alteraciones en la regulación de la muerte celular apoptótica pueden contribuir a la patogénesis de ciertas enfermedades como lo son el cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y desordenes neurodegenerativos (Jacobson *et al*, 1997).

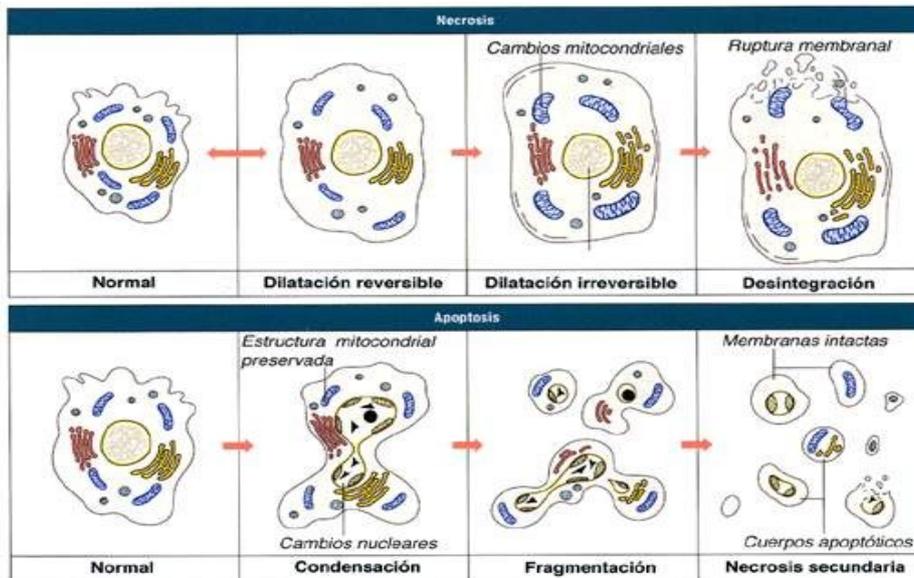


Figura 3: Principales diferencias morfológicas entre la apoptosis y necrosis. Tomado de www.retina.umh.es. Consultada en marzo 2009.

Cáncer

En la mayor parte de los tejidos y órganos de un animal maduro suele conservarse un equilibrio entre la renovación y la muerte de las células. Los diversos tipos de células maduras del cuerpo tienen una vida de duración determinada; conforme mueren células se generan nuevas gracias a la proliferación y diferenciación de diversos tipos de células progenitoras. Sin embargo, en ocasiones aparecen células que ya no están sujetas a los mecanismos normales de control del crecimiento. Estas células dan lugar a clonas que pueden alcanzar un tamaño considerable con la producción de un tumor o neoplasia (Goldsky, 2004).

Los tumores o cánceres se clasifican de acuerdo con el origen embrionario del tejido del que se deriva la masa. En su mayor parte son carcinomas, es decir, tumoraciones que se originan en tejidos endodérmicos o ectodérmicos, como la piel o el revestimiento epitelial de los órganos y las glándulas internas. Las leucemias y los linfomas son tumores malignos de las células hematopoyéticas de la médula ósea. Los sarcomas que son malformaciones menos frecuentes, se derivan de tejidos conjuntivos mesodérmicos como hueso, grasa y cartílago (Pardo, 1998).

Cuando los genes que controlan la reproducción celular son dañados por agentes físicos, químicos o biológicos, pueden causar que las células sanas y normales se transformen en células tumorales, iniciándose así el proceso llamado carcinogénesis (Yocota, 2000). Las células cancerosas, con frecuencia presentan diversas anomalías fenotípicas como pérdida de diferenciación, mayor invasividad y menor sensibilidad a los fármacos, una anomalía fenotípica casi siempre presente en todas las células cancerosas es la desregulación del control del ciclo celular. La alteración del crecimiento de las células cancerosas parece deberse a la ausencia de respuestas de control adecuadas a señales que normalmente hacen que la célula detenga el ciclo celular y deje de crecer.

La transformación de una célula normal a una célula tumoral se debe a mutaciones en genes que normalmente controlan el ciclo celular, motivando así la pérdida de señales que regulan el crecimiento celular (Alberts *et al*, 1994).

El cáncer es una enfermedad en la que las células individuales rompen el orden natural y empiezan a proliferar a expensas de sus vecinas. Las células de un tumor no solo crecen en un área delimitada y localizada, sino que en ocasiones suelen ser capaces de invadir los tejidos circundantes, de entrar en el torrente circulatorio, y migran a otras partes del hospedero desarrollando metástasis, estas células forman nuevos tumores que a menudo son quienes tienen un mayor impacto en la salud (Darnell *et al*, 1993) (Figura 4).

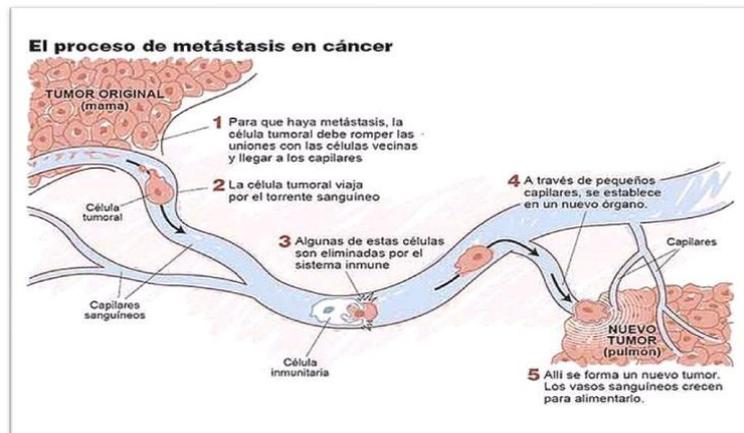


Figura 4: La metástasis es la capacidad que tienen las células tumorales para emigrar e invadir a otros órganos por medio de los vasos sanguíneos o linfáticos. www.retina.umh.es. Consultada en marzo 2009.

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células, provocada por modificaciones en la información genética. Generando con ello que las células cancerosas proliferen sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva destruyendo tejidos y órganos normales. Es una de las dos principales causas de muerte en los países occidentales, superada solo por las cardiopatías, afectando a uno de cada tres individuos (Karp, 1998).

En el caso particular del cáncer cervicouterino, problema de salud pública, es la enfermedad neoplásica más frecuente y mortal en la población femenina. Cada año son diagnosticados en el mundo 500,000 casos nuevos (Franco *et al*, 2001).

Cáncer cervicouterino (CaCu)

Desde hace más de veinte años se ha señalado que el CaCu, por su presentación en pacientes con características epidemiológicas, se comporta como una enfermedad de transmisión sexual (Alonso *et al*, 2000).

El CaCu en México representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2009). Los factores de riesgo involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad (Lira,2001), déficit nutricionales, el uso de anticonceptivos orales, polimorfismo del gen p53 (Suárez *et al*,2001) haber tenido varias parejas sexuales, el nivel socioeconómico (Gorey *et al*,1997), edad temprana del primer embarazo, dos o más partos, el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además de hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol, así como una detección tardía, son las principales causas de adquisición, manifestación y progresión del CaCu (De Villiers EM, 2003; Atalah E, 2001; Faggiano F, 1997).

El CaCu, se encuentra asociado en un 99.7%, a la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Lorincz *et al*, 1992; Walboomeis *et al*, 1999) y en particular los tipos 16 y18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cervicouterino es negativo a VPH (zur Hausen, 1996). Se han descrito más de 130 tipos diferentes de VPH que son catalogados como de bajo riesgo- tipo cuya infección no provoca patologías malignas y de alto riesgo – aquellos tipos que provocan malignidad.

La infección por VPH en los epitelios escamosos, secos y húmedos, se inicia en las células basales del epitelio y es en este lugar en donde se tiene el desarrollo del ciclo de vida del VPH, el cual está relacionado al programa de diferenciación de la célula hospedera con la producción de partículas virales maduras restringida a las células supra basales diferenciadas. La infección por VPH se presenta a través de microheridas en el epitelio donde se exponen células de la lámina basal a la infección viral. Las células de la lámina basal se encuentran en constante división y proveen un reservorio de células para la región supra basal (Longworth y Laimins, 2004).

Como el VPH infecta células basales que se dividen regularmente, el genoma viral es transmitido a las células hijas, una de las cuales ha de

permanecer en la lámina basal y las otras han de migrar hacia los estratos superiores al tiempo que experimentan diferenciación. En un epitelio normal con células no infectadas, salen del ciclo celular conforme se han alejado de la lámina basal, al tiempo que se presenta una pérdida del núcleo. Por el contrario, todas las células infectadas con VPH conservan la propiedad de dividirse aun en los estratos supra basales (Longworth y Laimins, 2004).

Tratamientos

Existen tres clases diferentes de tratamientos para los pacientes con CaCu:

- **Cirugía.-** Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados. Extirpación quirúrgica de un tumor canceroso y tejido cercano, y posiblemente nódulos linfáticos cercanos. Si el cáncer ha alcanzado capas más profundas del cérvix pero no se ha propagado más allá del cérvix, el médico puede extirpar sólo el tumor y tejido circundante normal. En algunos casos, se necesita una histerectomía (extirpación del útero completo).

- **Radioterapia.-** La radiación ionizante tiene como objetivo dañar irreparablemente el ADN del tumor, induciendo a las células a morir. El mecanismo es el siguiente: la radiación genera radicales libres que rompen de manera irreparable las cadenas de ADN celular. Puede no haber muerte celular real hasta el momento de la división celular, cuando la célula intenta replicar el ADN defectuoso. Por lo tanto, el curso de la respuesta clínica en cualquier tejido, normal o maligno, está determinado por la velocidad del recambio tisular. Los tejidos normales (la médula ósea y la mucosa gastrointestinal) y las neoplasias de proliferación rápida (el cáncer de pulmón de células pequeñas y el linfoma) suelen mostrar pérdida celular pasados días o semanas de la primera dosis de radiación; en cambio, los tejidos normales (los nervios y los hepatocitos) y los tumores con una velocidad de recambio lenta (el carcinoma de próstata) pueden no manifestar pérdida celular durante meses o años.
La velocidad de respuesta es característica de la población celular, pero no del resultado eventual. Las biopsias obtenidas después de la radioterapia pueden demostrar que hay células tumorales, pero es preciso practicar exámenes seriados (químicos, clínicos o radiológicos) si tienen capacidad de reproducción (Cameron, 1995).

- **Quimioterapia.-** El uso de medicamentos tóxicos para matar células cancerígenas. La quimioterapia se puede administrar en muchas formas incluyendo: pastillas, inyecciones, y vía catéter. Los medicamentos entran en el torrente sanguíneo y viajan a través del cuerpo matando a células que se encuentran en proceso de división. La quimioterapia sola, rara vez cura el cáncer cervicouterino. Se puede usar junto con cirugía y/o radiación: la quimioterapia y radioterapia

juntas han mostrado ser más efectivas que la radioterapia sola. La quimioterapia también se puede usar para ayudar a controlar los síntomas (dolor y sangrado) cuando una cura ya no es posible.

La gran desventaja es que tanto los rayos de alta energía como los medicamentos, no son específicos, ya que atacan por igual a las células cancerosas y a las células normales, dañando la función replicativa de ambas, de la misma forma. Esto trae graves consecuencias pues los tejidos que necesitan renovarse constantemente, como lo son: las paredes del esófago y del estómago, la piel; son dañados y se desencadenan graves consecuencias en el paciente.

Debido al impacto que esta enfermedad tiene sobre la población mexicana surge la necesidad de revalorar la actividad de fármacos ya utilizados en otros tratamientos para su uso como agentes terapéuticos o preventivos.

Disulfiram (DSF) y Metabolitos

El Disulfiram [bis (dietilcarbamoil) disulfuro] (DSF) es un miembro de la familia de los ditiocarbamatos, un medicamento que se ha utilizado durante más de medio siglo para combatir el alcoholismo (Shen *et al*, 2000) y, más recientemente, se ha sugerido un potencial en el tratamiento de la dependencia de cocaína (Sofouglu y Kosten, 2005). Es una sustancia que al ser administrada previamente a una ingesta de alcohol, provoca una serie de malestares como náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo, la acción farmacológica del DSF deriva de la inhibición de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial hepática (ALDH2) (Marikovsky *et al*, 2003), enzima que cataliza el último paso de la oxidación del etanol (Lundwall y Bakeland, 1991). En 1997 se demostró que el disulfiram no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol, pues encontraron que, después de ser ingerido, es reducido rápidamente a dietilditiocarbamato (DDTC) por acción de la glutatión reductasa (Cobby, 1997) (Figura 5).

Varios laboratorios han investigado la actividad antitumoral del disulfiram en células tumorales, encontrando que disminuye la proliferación de células de carcinoma pulmonar (Ryan y Wilding, 2000) y melanoma (Brar *et al*, 2004). Además ha mostrado reducir angiogénesis (Gourley y Williamson, 2006), inducir apoptosis en células de cáncer de mama (Chen Di *et al*, 2006), carcinoma de ovario (Dazhi Cen, 2002), y de pulmón (Malin *et al*, 2007). También se ha propuesto que el efecto del disulfiram está limitado por que al formar un complejo con cobre se activa y finalmente se ha recientemente propuesto que su mecanismo de acción se presenta al inhibir al

proteosoma 26S. (Malin *et al*, 2007). Algunas de las propiedades atribuidas a los ditiocarbamatos demuestran que presentan acción antineoplásica sobre la línea celular U-937 (leucemia humana) y actividad antioxidante (Malaguarnera *et al*, 2005).

No obstante en los estudios mencionados, no existe evidencia del efecto del Disulfiram en células normales o no tumorales, lo cual genera la idea de no ser selectivo, además de que se ha demostrado que el DSF al ser ingerido inmediatamente es metabolizado y convertido a metabolitos los cuales en realidad son los responsables del efecto, induciendo a la búsqueda de metabolitos del Disulfiram que pudiesen potencializar el efecto antitumoral y ser selectivos con respecto a las células tumorales.

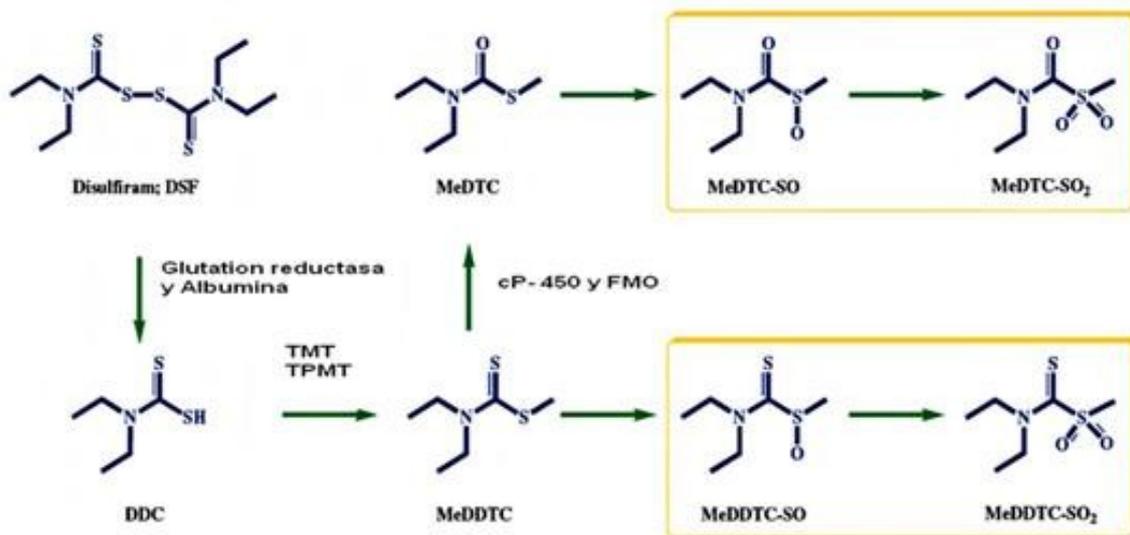


Figura 5. Vía metabólica para la biotransformación del Disulfiram (DSF). DDC: N,N- ácido dietilditiocarbamato; MeDDTC, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato; MeDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato; MeDTC-SO, S-metil-N, N-dietiltiocarbamato sulfóxido; MeDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfona; MeDDTC-SO, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido; MeDDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato Sulfona; TMT, tiol metiltransferasa; TPMT, tiopurin metiltransferasa; CP-450: complejo citocromo P-450; FMO, flavina que contienen mono-oxigenasas. Tomado de Hu *et al*, 1997.

Los metabolitos más estudiados son la Pirrolidina Ditiocarbamato (PDDTC) a la que se le ha atribuido un efecto apoptótico en células de cáncer de mama (Daniel *et al*, 2005), próstata (Chen Di *et al*, 2005), en líneas promielocíticas HL-60 (Della Ragione, 2000) además de inducir en líneas de cáncer de hígado (HepG2) una detención en la fase G1 del ciclo celular (Guang-Yaw *et al*, 1998); sin embargo se le ha atribuido un efecto citotóxico en líneas leucémicas (Wickstroem *et al*, 2007). Otro metabolito es el Dietilditiocarbamato (DDTC) que induce apoptosis en líneas leucémicas (Kanno *et al*, 2003) y presenta un efecto citotóxico.

MeDDTC-SO

El S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), es un metabolito del Disulfiram (Figura 5) al cual solo se le ha estudiado su actividad inhibidora sobre la Aldehído deshidrogenasa mitocondrial hepática (ALDH). Este compuesto ha sido sintetizado por oxidación del dietilditiocarbamato de sodio con peróxido de hidrógeno y posterior alquilación con yoduro de metilo y por oxidación del DDTC-Me con meta-peryodato de sodio.

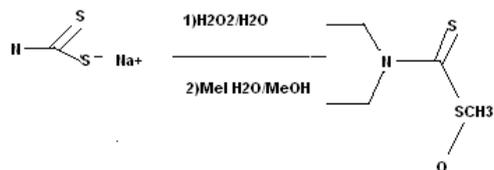


Figura 6 .Síntesis del compuesto MeDDTC-SO. Tomado de López, 2008.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, mientras que en México durante el 2007, los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI 2009). Para combatir esta enfermedad, existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, éstos son muy agresivos, poco selectivos y sin efecto en pacientes en fases avanzadas o terminales de la enfermedad, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En la actualidad existe un fuerte interés en compuestos conocidos que actualmente se aplican en diferentes tratamientos, con la intención de encontrar en éstos actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis y con acción selectiva. En los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos derivados de drogas conocidas para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos se encuentra el Disulfiram y sus metabolitos.

Existen estudios sobre la actividad antiproliferativa que presenta el Disulfiram sobre líneas tumorales (Ryan y Wilding, 2000 ; Brar et al., 2004; Gourley y Williamson, 2006) , sin embargo, es conocido que el Disulfiram es transformado a metabolitos (Cobby, 1997) que son los responsables de la actividad antiproliferativa, por lo que es necesario realizar estudios que proporcionen información sobre la actividad biológica del metabolito S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, siendo la tasa de defunción ajustada por edad en 14.0 por 100 000 habitantes. El virus del papiloma humano (VPH) se ha encontrado en el 99.7% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras, teniendo los tipos 16 y 18 una relación con el cáncer de un 70% de los casos, por lo que se considera a la infección por este virus como el factor de riesgo más importante (Lacruz, 2003). Además del número creciente de compuestos que han sido propuestos en terapias alternativas, orientados hacia la quimioprevención del cáncer, existen también los compuestos enfocados para el tratamiento de esta enfermedad. Dentro de este último grupo se encuentra el Disulfiram y sus metabolitos, al cual se le ha atribuido un efecto antiproliferativo en líneas tumorales; sin embargo no se cuenta con estudios sobre la actividad antiproliferativa de metabolitos del DSF sobre el cáncer cervicouterino; por lo que es necesario generar información acerca de la actividad del MeDDTC-SO sobre células tumorales de CaCu HeLa y CaSki.

HIPÓTESIS

Es conocido que el Disulfiram y algunos de sus metabolitos presentan actividad antifúngica, antitumoral e inductora de apoptosis en células de cáncer de mama, por lo que se espera que el metabolito del Disulfiram S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO) presente actividad antiproliferativa, así como inductora de apoptosis en células provenientes de cáncer cérvico-uterino.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo del S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO) así como su efecto en el ciclo celular e inductor de apoptosis en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar cultivos de las líneas celulares CaSki y HeLa así como establecer cultivos de fibroblastos de cérvix humano no tumorales y linfocitos de sangre periférica humana.
 - Determinar la concentración de MeDDTC-SO, requerida para disminuir en un 50% (IC_{50}) la densidad celular en cultivos in vitro de las líneas tumorales CaSki y HeLa.
 - Determinar si la IC_{50} obtenida, induce un efecto citotóxico en las líneas tumorales así como en cultivos de linfocitos humanos.
 - Establecer si el MeDDTC-SO afecta el ciclo celular de las líneas tumorales CaSki y HeLa, a través del análisis de la distribución del ADN en las fases del ciclo celular, determinada por citometría de flujo.
 - Evaluar si el MeDDTC-SO, induce un incremento en la expresión de caspasa 3 activa en las líneas tumorales CaSki y HeLa por inmunocitoquímica.
 - Determinar si el compuesto MeDDTC-SO induce fragmentación del ADN en las células tumorales CaSki y HeLa a través de la técnica de TUNEL.
-
- Determinar si la IC_{50} obtenida para las células tumorales CaSki y HeLa, afectan el potencial proliferativo de fibroblastos no tumorales de cérvix y de linfocitos de sangre periférica humana.

MÉTODO

Cultivo de células de cáncer cervicouterino: CaSKi y HeLa.

Las células provenientes de cáncer cervicouterino fueron sembradas en cajas petri de 10 mm (Pirex USA), en 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX) con 5% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Morgan y Darling, 1995). Se permitió la proliferación de los cultivos hasta alrededor de un 70% de confluencia para realizar los ensayos.

Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI al 20% de suero fetal bovino (SFB) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en escindir el tejido en trozos pequeños (5 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05%, la cual se lleva a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex, USA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37°C en un baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vierte a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. El filtrado se centrifugó (centrifuga; Dinac, USA) por 5 minutos a 1500 rpm, se decanta el sobrenadante y el botón celular es cultivado en cajas petri que contienen 5ml de RPMI-1640 al 10% de SFB, los cultivos se mantienen en una incubadora (Nuaire, USA) al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas, después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio (totalmente), de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10% y se continua así hasta obtener cultivos de células en crecimiento exponencial con una saturación del 70%.

Obtención del compuesto MeDDTC-SO

El compuesto MeDDTC-SO fue sintetizado en el laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM). Brevemente: Una solución de 2 g de dietilditiocarbamato de sodio (11.69 mmoles) en 100 ml de agua se enfrió a 0°C y se adicionaron, en un lapso de 30 segundos, 1.32 ml (11.69mmoles) de peróxido de hidrógeno al 30%. La solución se dejó con agitación por dos minutos más, después de lo cual la temperatura se elevó a 3°C y el color cambió a amarillo claro. De inmediato se adicionaron 100 ml de metanol y 1.6 g (11.69 mmoles) de yoduro

de metileno y se agitó a 4°C por 12 h. Se evaporó el metanol en un rotavapor a 25°C y el residuo acuoso se extrajo con cloruro de metileno (3x30 ml). El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidrido y se concentró en un rotavapor. Se purificó por cromatografía en columna (Figura 7).

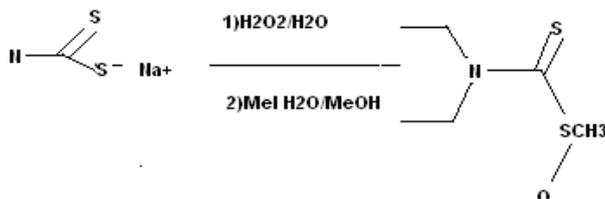


Figura 7. Síntesis del compuesto MeDDTC-SO. Tomado de (López, 2008).

Preparación del stock

Para la preparación del stock 2 mg del compuesto son solubilizados en 50 µl de etanol, del cual se toma el volumen necesario para obtener las diferentes concentraciones utilizadas en el trabajo experimental.

Efecto del compuesto MeDDTC-SO sobre el potencial proliferativo de células de cáncer cervicouterino.

Para determinar la concentración de MeDDTC-SO a la cual se disminuye en un 50% el número celular (IC₅₀) de cultivos de las líneas tumorales provenientes de CaCu, 7500 células/pozo de las líneas tumorales HeLa y CaSki fueron sembradas por separado en placas de 96 pozos (Corning, USA) en 100 µl de medio de cultivo RPMI suplementados con 5% de SFB por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó el MeDDTC-SO en RPMI fresco (5% SFB) a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 µg/ml. El ensayo control contempló la cantidad de etanol utilizada en la concentración máxima a probar, en estas condiciones se mantuvo el cultivo por 24 h más. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción de cristal violeta. Para ello, primeramente se retiró el medio contenido en las placas de cultivo de 96 pozos y se procedió a agregar el fijador glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) el cual se mantuvo durante 15 minutos. Posteriormente el fijador fue retirado, y la placa fue lavada un par de veces con un buffer salino de fosfatos, pH= 7.2 (PBS) durante 5 minutos. El PBS fue retirado y la placa de cultivo se dejó secar al aire. Posteriormente se agregó el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 min en agitación. Al término de este tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada o bidestilada, con la intención de retirar el exceso de colorante. Después, la placa de cultivo se dejó secar al aire y por último, se procedió a solubilizar el colorante con una solución de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación durante 20 min., para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector de placas (Imagen Tecan Spectra). Los

resultados de los grupos estimulados se compararon con respecto al control. Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procede a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50% (IC₅₀) la densidad celular de las líneas de CaCu.

Efecto del compuesto MeDDTC-SO sobre el ciclo celular

Las células fueron sembradas con una densidad de 500 000 células por caja de 5 ml en cajas de plástico (35 x 10 mm, Corning Inc.), en RPMI al 5 % de SFB. Se incubaron por 24 horas para permitir su adherencia, después de lo cual fueron estimuladas con MeDDTC-SO a concentraciones de IC₅₀, en estas condiciones se mantuvo el cultivo por 24 h. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno, se centrifugaron y lavaron con PBS. El botón celular fue fijado y resuspendido en 1 ml de metanol al 50 % en PBS, pasados 20 min se centrifugó y lavó con PBS. El botón fue resuspendido en 500 µl de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37° C por 30 min. Posteriormente se adicionaron 10 µl de yoduro de propidio (200 mg/l) se mezcló y se protegió de la luz. Finalmente las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACS ARIA II, USA).

Expresión de la caspasa 3.

Para determinar si el compuesto MeDDTC-SO induce una expresión de la caspasa 3, como un parámetro para inducir apoptosis, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm, en un volumen de 300 µl de RPMI al 5 % de SFB en cámara húmeda por 24 h. Al término de las 24 h se procedió a estimular a las células con concentración de IC₅₀ en medio de cultivo RPMI al 5 % de SFB por 24 h. Posteriormente se realizó la detección de la caspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 20 minutos, al término del tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS y a continuación se permearon con tritón (x-100 0.5 %) durante 5 minutos a 4°C, nuevamente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:50 en PBS) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:100 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1 h, posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después aplicar DAPI de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestras con medio de montaje antifolding y selladas con esmalte de uñas. Una vez

realizadas las preparaciones, se procedió a analizarlas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (Nikon, JAP).

Detección específica de fragmentos de DNA a través de la técnica de TUNEL.

Fueron sembradas 50 000 células en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la caspasa 3. Al término del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS el cual debe ser preparado al momento. Las células fueron lavadas con PBS y permeadas con tritón X-100 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron con PBS y se adicionaron inmediatamente 30 µl de buffer de equilibrio en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar. Se incubaron por 1 h con enzima Tdt (33µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción), en cámara húmeda. Al termino del tiempo se detuvo la reacción adicionando buffer de paro (Chemicon international, USA) (1:34 buffer de paro/agua desionizada) por 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavaron con PBS, se incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon international, USA) (68 µl de solución de bloqueo más 62 µl de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron los respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incubó con DAPI por 1 minuto. A continuación, se lavaron las muestras con PBS en cámara húmeda. Las preparaciones fueron montadas con medio de montaje, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Proliferación de linfocitos humanos con Carboxifluoresceina (CSFE).

En tubos vacutainer con EDTA, fueron obtenidos 20 mL de sangre periférica de un voluntario sano y colocados (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (SIGMA, USA) (un total de 4 tubos), se cubrieron con aluminio y centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y fue aumento gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retiró el plasma y colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió en 10ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. (El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, e incubaron durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las

células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y resuspendió nuevamente el botón celular en 5ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para el ensayo de Carboxifluoresceína; se agregó en cada tubo eppendorf la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 de células/ml de medio total (tubos por condición; activados y marcados con Carboxifluoresceína, vehículo y tratamiento). Se realizan dos lavados con PBS libre de suero. Para marcar con Carboxifluoresceína (Zigma-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de Carboxifluoresceína por mililitro de solución y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos eppendorf a una densidad de 1 000 000 de células por mL de RPMI suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/mL (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con MeDDTC-SO se trataron las células con IC₅₀ (1.7 μ g/ml). Las células contenidas en cada tubo eppendorf fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l e incubadas hasta su evaluación. Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno frío por 5 min, se centrifugó y retiró el verseno, posteriormente se lavan las células con 500 μ l de PBS (dos veces), y finalmente se resuspenden en 500 μ l de paraformaldehído al 1%, para ser evaluadas en el citómetro de flujo.

Ensayo de Citotoxicidad LDH

Para poder realizar el ensayo de citotoxicidad, células provenientes de cáncer cervicouterino (7500/pozo), fueron sembradas en placas de 96 pozos (Corning, USA), con 100ml de medio RPMI al 5% de SFB; (Gibco, USA), por 24 h. ó 200 000 linfocitos/pozo en placas de 95 pozos en RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó la concentración de IC₅₀ obtenida en RPMI fresco 5% de NCS o 20% SFB para linfocitos, contemplando los siguientes controles: Control basal (únicamente medio de cultivo), Control negativo (células con medio y suero al 5%), Control positivo (Tritón X-100 al 1%) y vehículo (Etanol) cada uno por triplicado, además para linfocitos se incluyeron controles de activación. El cultivo de células tumorales se mantuvo por 24 horas más y el de linfocitos por 72 horas. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y centrifugó a 1500 rpm (Conservando el sobrenadante), se transfirió 100 μ l/pozo, del sobrenadante de

cada uno de los controles y del tratamiento a otra placa de 96 pozos, para adicionarle 100 μ l de la mezcla de reacción (Bio Vision, California) a cada pozo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para finalmente medir la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (Image Tecan Spectra).

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007.

Obtención de la IC₅₀

Para calcular las IC₅₀, los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dosis respuesta, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplica regresión lineal y es obtenida la ecuación de la recta, de este modo, en base a la ecuación obtenida de la recta, el valor de "Y" se substituye por 50 y el valor de X = IC₅₀. Obteniendo así finalmente el valor de la IC₅₀ respectiva.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un fuerte interés, sobre todo en aquellos que son de origen biológico y en compuestos que son usados dentro de la medicina como tratamientos para otras enfermedades. En el caso particular del Disulfiram y sus metabolitos, se ha reportado que han mostrado acción antiproliferativa e inductora de apoptosis sobre células cancerosas de mama, pulmón y de próstata, entre otras. Sin embargo, no todos los metabolitos del Disulfiram han sido estudiados, generando la necesidad de llevar estudios que permitan establecer si estos metabolitos presentan acción antiproliferativa, inductora de apoptosis de manera selectiva. Este es el caso del metabolito S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), al cual sólo se le ha estudiado su actividad inhibidora en la enzima Betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (López, 2008).

Actividad antiproliferativa

Con la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo del MeDDTC-SO así como el determinar la concentración requerida del compuesto que induzca un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}), cultivos de células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa y CaSki) fueron tratadas con diferentes concentraciones de MeDDTC-SO (Figura 8).

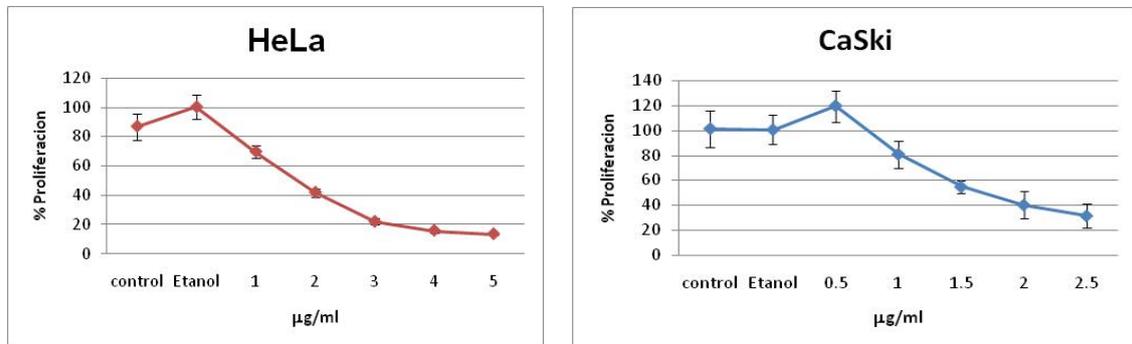


Figura 8. Efecto del MeDDTC-SO sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa y CaSki. 7500 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de MeDDT-SO por 24 horas. El número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta. La curva muestra que la respuesta es dosis dependiente, encontrando un valor de IC_{50} para ambas líneas tumorales de 1.7 µg/ml.

Los resultados mostrados en la Figura 8 sugieren que el efecto antiproliferativo del MeDDTC-SO es dosis dependiente, es decir, conforme se incrementa la concentración disminuye el número celular. De igual manera la concentración del compuesto requerida para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}) fue calculado (ver Material y Métodos), encontrando para ambas líneas tumorales una IC_{50} de 1.7 µg/ml.

Efecto en la morfología celular

Con el fin de determinar si el compuesto ejerce un efecto en la morfología celular, cultivos de células HeLa y CaSKi fueron estimuladas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO por 24 h. y los cultivos fueron fotografiados con una cámara digital en un microscopio (Nikon, JAP) (Figura 9).

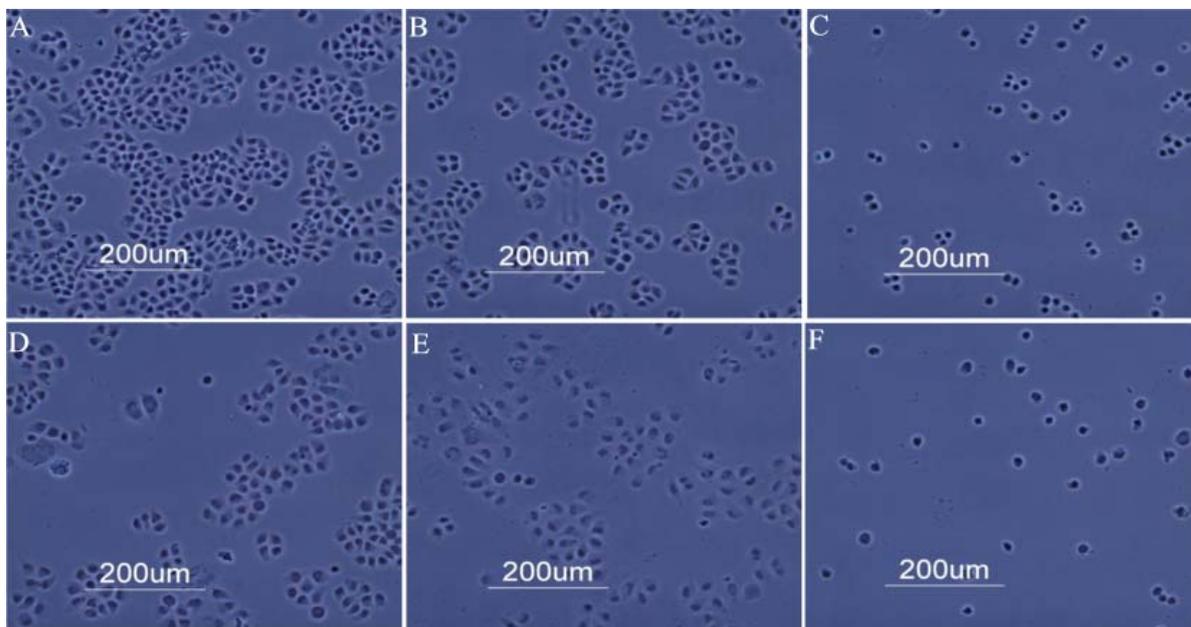


Figura 9. Efecto del compuesto MeDDTC-SO en la morfología celular de cultivos de células HeLa y CaSKi. A, B y C son células CaSKi y D, E y F son células HeLa. A y D: control; B y E: estimuladas con 1% de etanol; en estas células se puede observar una forma poliédrica, con citoplasma extendido, formando islotos, manteniendo contacto entre ellas; por el contrario C y F: células estimuladas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO pierden la forma poliédrica adquiriendo una forma redondeada, con citoplasma reducido y perdiendo el contacto entre ellas. Las fotografías representan un experimento de un mínimo de tres ensayos independientes.

Como se muestra en la figura 9 el compuesto MeDDTC-SO afecta la morfología de ambas líneas celulares, induciendo en ellas una reducción significativa del citoplasma, las células se observan aisladas, sin contacto entre ellas sugiriendo un efecto en las fibras que constituyen al citoesqueleto con posible reducción en la adherencia celular (C, F). Por el contrario de las células control (A y D) y tratadas con el etanol (B y E) en las cuales se pueden observar islotos de células, que tienen contacto entre si además de una forma poliédrica.

Actividad Citotóxica

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica. Una de las características principales de la actividad citotóxica es el rompimiento de la membrana citoplásmica, liberando el contenido intracelular al exterior de la célula. En el citoplasma se encuentra una variedad de moléculas con funciones específicas, entre las cuales se encuentran algunas enzimas como la Lactato deshidrogenasa (LDH), la cual convierte al lactato en piruvato. Con el propósito

de establecer sí el MeDDTC-SO ejerce una acción citotóxica sobre las células de cáncer cervicouterino, cultivos de células CaSki y HeLa fueron estimulados con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y la actividad de la LDH fue determinada en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales mediante el LDH-Cytotoxicity Assay kit (Viobision; N° Cat. K311-400) (Figura 10).

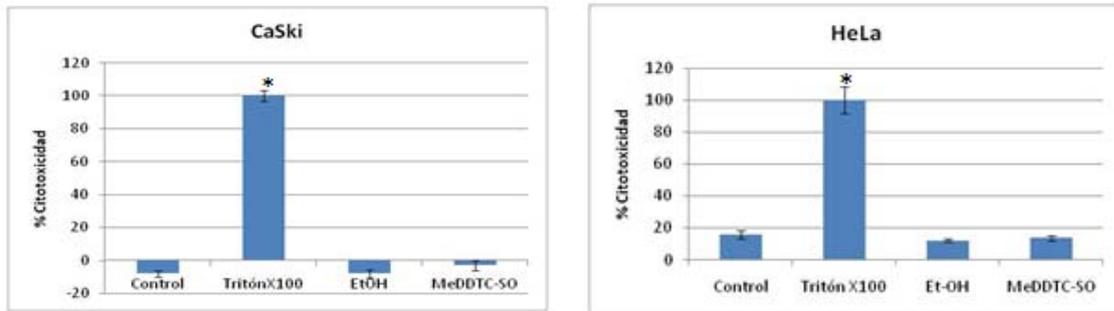


Figura 10. Efecto citotóxico del MeDDTC-SO sobre células tumorales. Cultivos de la línea tumoral CaSki y HeLa fueron sembradas en placas de 96 pozos y estimuladas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y el efecto citotóxico fue evaluado mediante el LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Viobision; N° Cat. K311-400). (*. $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey). La prueba de citotoxicidad indica que no existe un efecto necrótico inducido por el MeDDTC-SO.

Los resultados obtenidos muestran que el MeDDTC-SO no ejerce una acción citotóxica sobre las células tumorales, sugiriendo que el decremento observado en el número celular en los cultivos de células HeLa y CaSki tratadas con el MeDDTC-SO es causado por una actividad diferente a la vía citotóxica (Necrosis).

No obstante este resultado, es importante determinar sí el MeDDTC-SO a la concentración de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ ejerce una acción citotóxica sobre células no tumorales. Un modelo celular muy utilizado para probar los efectos citotóxicos, genotóxicos etc., de compuestos o drogas es el cultivo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana. Al respecto, cultivos de linfocitos fueron tratados con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y la actividad de la LDH fue evaluada (Figura 11).

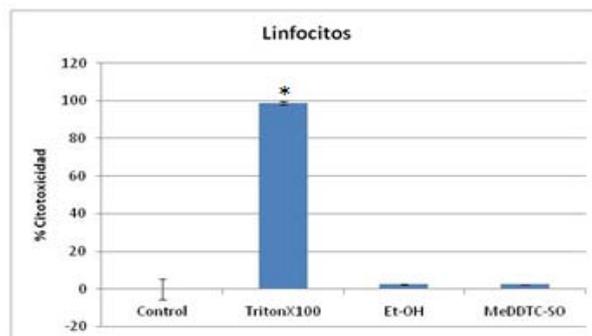


Figura 11. Efecto citotóxico del MeDDTC-SO sobre cultivos de células linfocíticas humanas. La gráfica representa el promedio de tres eventos independientes para los cultivos de linfocitos. (*. $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se muestra en la Figura 11, el MeDDTC-SO no induce un efecto citotóxico sobre las células linfocíticas, sugiriendo que este compuesto no ejerce una acción citotóxica sobre células no tumorales.

Efecto del MeDDTC-SO en el ciclo celular.

Para explicar sí el decremento observado en el número celular en los cultivos de células tumorales estimuladas con el MeDDTC-SO, está relacionado con una detención en alguna fase del ciclo celular, cultivos de células HeLa y CaSki fueron estimuladas con la concentración 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo (Figura 12).

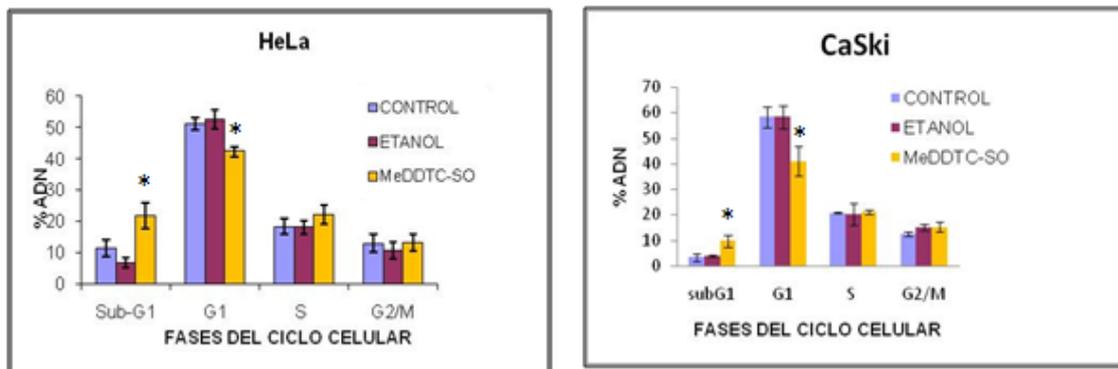


Figura 12. Efecto del MeDDTC-SO sobre la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas tumorales HeLa y CaSki. CONTROL: Células no tratadas, ETANOL: Células tratadas con Etanol, MeDDTC-SO: Células tratadas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO; donde existe una disminución de las células que se encuentran en la fase G1 y un incremento en la región sub-G1, con respecto a las células control; este comportamiento se da en ambas líneas tumorales. La gráfica representa el promedio de cinco eventos independientes para ambas líneas tumorales. (*. $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos en la Figura 12 indican que el compuesto MeDDTC-SO induce un decremento en el número de células que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular para ambas líneas tumorales, así como un incremento en el número de células que se encuentran en la región subG1, sugiriendo que el MeDDTC-SO induce a las células tumorales a salir de la fase G1 del ciclo celular para inducir fragmentación del DNA, que podría indicar muerte celular.

MeDDTC-SO y apoptosis.

Con el propósito de establecer sí el MeDDTC-SO es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, cultivos de células HeLa y CaSki fueron tratadas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y la detección de la caspasa 3 activa así como la fragmentación del DNA fue evaluada por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, como dos parámetros primordiales de la apoptosis (Figura 13 y 14).

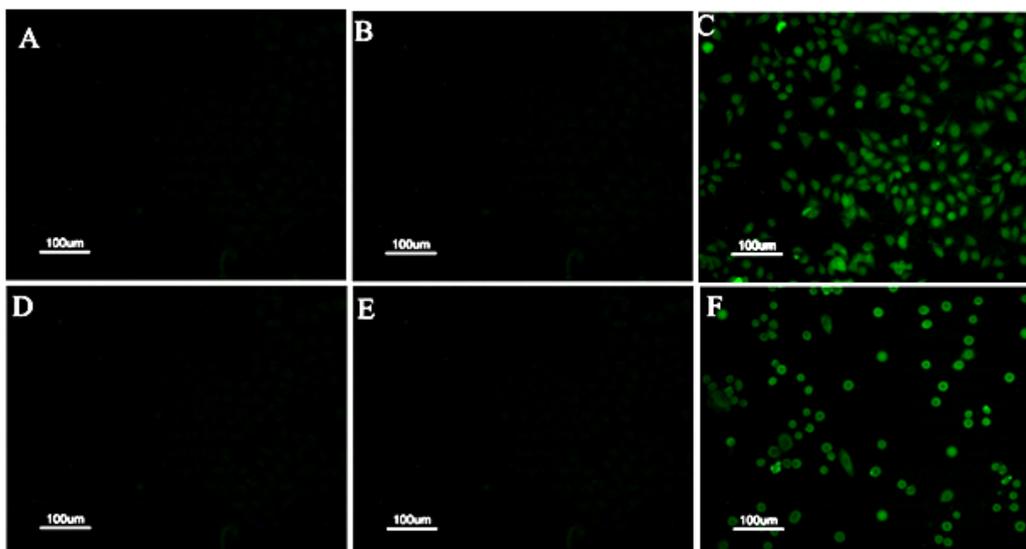


Figura 13. Expresión de la caspasa 3 en células tumorales estimuladas con MeDDTC-SO. Las células A, B y C son células CaSKi y D, E y F son células HeLa. A y D: control; B y E: estimuladas con 1% de etanol y C y F: estimuladas con 1.7 µg/ml de MeDDTC-SO. En estas células existe una expresión de la caspasa 3, indicado por la fluorescencia verde, expresión que no se presenta en las células control y las tratadas con etanol. Las fotografías representan un experimento de un mínimo de dos ensayos independientes.

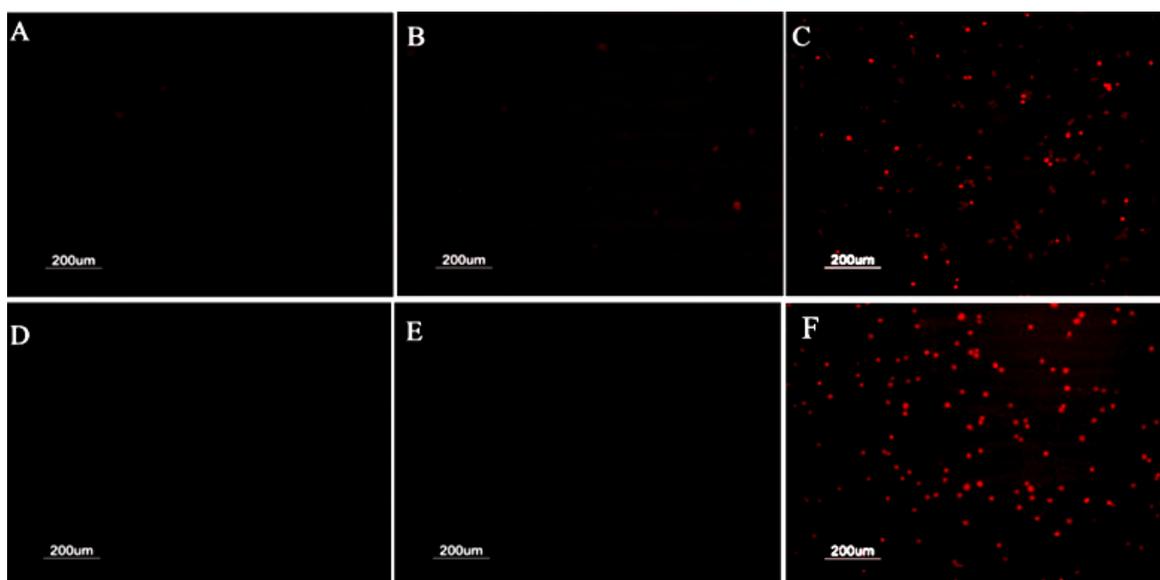


Figura 14. Fragmentación de ADN en cultivos de líneas tumorales tratadas con MeDDTC-SO. Las células A, B y C son células CaSKi y D, E y F son células HeLa. A y D: control; B y E: estimuladas con 1% de etanol y C y F: estimuladas con 1.7 µg/ml de MeDDTC-SO. La coloración roja indica células con fragmentación de ADN. Los ensayos se realizaron con cultivos de 50'000 células en cubreobjetos con 300 µl de RPMI al 5 % de SFB. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

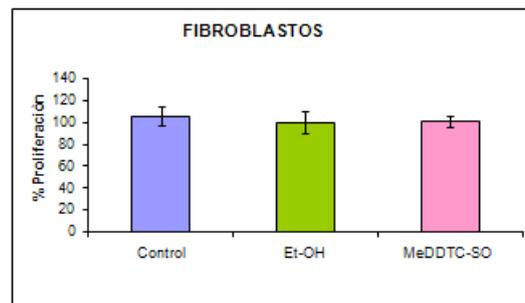
Como se puede apreciar en las Figuras 13 C y F, donde las células de ambas líneas tumorales fueron tratadas con el MeDDTC-SO, expresan la caspasa 3 activa, sugiriendo que el MeDDTC-SO induce la expresión de esta caspasa como parte de su mecanismo para inducir apoptosis. También se puede apreciar en la figura 14 C y F que este ditiocarbamato es capaz de inducir en las células tumorales una fragmentación del ADN, concluyendo junto

con la inducción de la caspasa 3 activa que el MeDDTC-SO induce muerte por apoptosis en estas líneas tumorales.

Efecto antiproliferativo del MeDDTC-SO en células no tumorales.

Hasta el momento, los resultados obtenidos indican que el MeDDTC-SO ejerce una actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en las células CasKi y HeLa, sin embargo, para adjudicarle una actividad selectiva, debe evaluarse el MeDDTC-SO en células no tumorales, con el fin de establecer si este compuesto es capaz de afectar el potencial proliferativo de la misma manera que lo hace en las células tumorales, por lo que cultivos de fibroblastos no tumorales provenientes del cérvix, así como cultivos de células linfocíticas fueron estimuladas con 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de MeDDTC-SO y su número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta e incorporación de carboxifluoresceína respectivamente (Figura 15 y 16)

A



B



Figura 15.A: Efecto del MeDDTC-SO sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano no tumorales. Cultivos de fibroblastos en fase exponencial fueron sembrados en cajas de 96 pozos y estimulados con MeDDTC-SO (1.7 $\mu\text{g/ml}$). El número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta. Como se puede observar el MeDDTC-SO no afecta el potencial proliferativo de los fibroblastos. La gráfica es representativa de por lo menos tres ensayos independientes. ($p > 0.05$ vs Etanol. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey). B: Efecto del MeDDTC-SO en la morfología de células fibroblásticas. Las células control y tratadas con etanol mantienen una forma aguzada y con citoplasma extendido; mientras que los fibroblastos tratados con MeDDTC-SO, se ven un poco afectados en su morfología, donde algunos se observan con el citoplasma retraído, indicando una posible pérdida de adherencia,. Fotografías tomadas con una cámara SONY Super SteadyShot DSC-W90 (Zoom de 1.5) en un microscopio invertido.

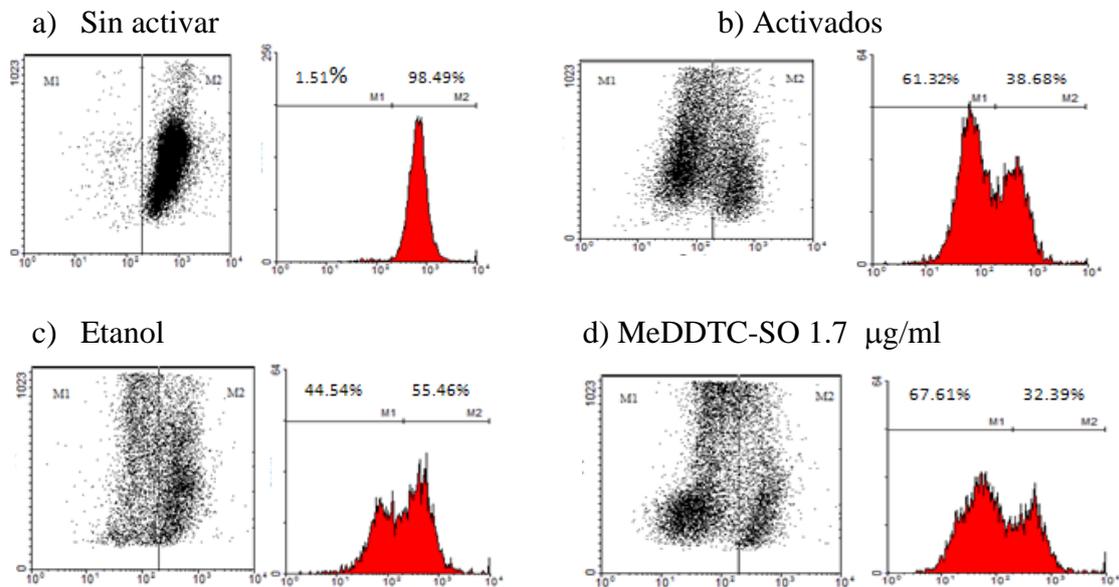


Figura 16. Efecto del MeDDTC-SO en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de Linfocitos fueron marcados con carboxifluoresceina y el potencial proliferativo fue evaluado con y sin el MeDDTC-SO. La proliferación fue medida mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceina y evaluada por citometría de flujo. M1: Región de células en proliferación. M2: Región de células no proliferantes. Los diagramas representan: a) Linfocitos Sin activar; b) Linfocitos Activados; c) Etanol 10µL/mL; d) MeDDTC-SO 1.7µg/ml.

Como se observa en la figura 15 y 16 el MeDDTC-SO no afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix así como de células linfocíticas de sangre periférica humana. De igual manera este compuesto no afectó significativamente la morfología de las células fibroblásticas provenientes del cérvix humano.

DISCUSIÓN

A nivel mundial cada año son diagnosticados 500,000 casos nuevos de CaCu, siendo la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas. Actualmente, los tratamientos aplicados contra el cáncer cervicouterino carecen de selectividad sobre células tumorales, ya que también afectan a células normales edemas de ser ineficientes en estadios avanzados y con efectos secundarios graves que afectan la calidad de vida del paciente. Esta situación ha desencadenado un gran interés en la búsqueda, de nuevas drogas antitumorales, con propiedades quimioterapéuticas o quimiopreventivas que puedan inhibir el proceso oncogénico. Entre los compuestos que despiertan mayor interés, tenemos aquellos que son usados dentro de la medicina como tratamientos para otras enfermedades como es el caso del Disulfiram (DSF), que ha mostrado tener efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en líneas celulares de cáncer pulmonar (Ryan y Wilding, 2000), cáncer ovárico (Dazhi Cen, 2002), cáncer de mama (Chen Di *et al*, 2006), entre otros. Sin embargo, se ha demostrado que el DSF al ser ingerido inmediatamente es metabolizado y convertido a metabolitos (Pike *et al*, 2001), los cuales, en realidad son los responsables de la actividad antiproliferativa y apoptótica presentes en el DSF, dando pauta a buscar cuál o cuáles metabolitos son los que ejercen dichas actividades. En investigaciones recientes se ha demostrado que algunos metabolitos del Disulfiram como el Dietilditiocarbamato (DDTC) y la Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) tienen efecto antiproliferativo y apoptótico frente a líneas de cáncer de próstata, mama, pulmón y leucemia (Wickstroem *et al*, 2007).

En el caso del compuesto S-metil,N-N,dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), los resultados indican que posee un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración sobre líneas de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki, es decir, conforme se incrementa la concentración el número celular disminuye. Sin embargo, la concentración de MeDDTC-SO requerida para inducir un decremento del 50% en el número celular fue de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ (9.496 μM) para ambas líneas tumorales, por debajo del valor del Disulfiram (20 μM) mostrado en líneas de cáncer de mama (Chen Di, 2006). Es importante que en un futuro se lleven a cabo pruebas del MeDDTC-SO en más líneas tumorales de cérvix y de otros órganos, con el propósito de establecer si el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis es específico de estas líneas tumorales o es un efecto generalizado, independiente de la presencia del VPH.

No obstante la acción antiproliferativa reportada para el DSF, existen reportes que indican que el DSF y su metabolito PDTC, presentan efecto citotóxico en la línea celular de mieloma HEK 293 (Wickstroem *et al*, 2007), mientras que otro metabolito, el DDTC afecta a líneas leucémicas (Kanno *et al*,

2003). En el caso particular del MeDDTC-SO, sorprendentemente éste no presentó un efecto citotóxico en las líneas tumorales ni en células linfocíticas de sangre periférica humana, indicando que este ditiocarbamato induce a las células tumorales a morir por una ruta diferente a la necrosis, mientras que a células no tumorales como los linfocitos de sangre periférica humana no les causó efecto alguno, sugiriendo una acción selectiva del MeDDTC-SO.

Por otro lado, con respecto al efecto del MeDDTC-SO en el ciclo celular, se conoce que el PDTC, en células de cáncer de hígado, Hep-G2 (Guang-Yaw *et al*, 1998), induce una detención del ciclo en la fase G1. Sin embargo, el MeDDTC-SO induce un decremento del número de células HeLa y CaSki que se encuentran en la fase G1, así como un incremento de células en la región subG1, estableciendo que el efecto del MeDDTC-SO sobre las líneas celulares HeLa y CaSki se presenta en la fase G1 del ciclo celular para inducir las a una muerte celular. Al respecto, se conoce que el Disulfiram induce una muerte por apoptosis en células leucémicas (Dazhi Cen, 2004) y en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-321 (Chen Di *et al*, 2006), además de que el metabolito PDTC induce también una muerte apoptótica en células de cáncer de mama (Daniel *et al*, 2005) y próstata (Chen D *et al*, 2005) y el DDTC en líneas leucémicas (Kanno *et al*.2003). De igual manera el MeDDTC-SO, induce a las células HeLa y CaSki a una muerte por apoptosis, como lo indica el incremento en la expresión de la caspasa-3 activa y la fragmentación del ADN, sugiriendo así, que el MeDDTC-SO conserva la actividad inductora de apoptosis presente en el DSF y sus metabolitos DDTC y PDTC. Es importante resaltar que el efecto inductor de apoptosis presente en estos ditiocarbamatos, genera la ventaja de no inducir un estado inflamatorio, ya que no se activa la respuesta inmunológica, mientras que en pacientes tratados con quimio y radioterapia se presenta una inmunosupresión y en particular el cis-platino (un medicamento usado en la quimioterapia) disminuye el conteo celular de la médula ósea (Torrella y García, 2004). Tal efecto inductor de apoptosis permite una acción antitumoral silenciosa, lo que hace del MeDDTC-SO un buen candidato para ser estudiado como agente quimioterapéutico .

En la mayoría de los compuestos descritos con actividad antitumoral, se evalúa en algunos el efecto citotóxico, en otros su actividad antiproliferativa o inductora de apoptosis, sin poder concluir si estos compuestos son citotóxicos o no. Además, la mayoría de los estudios sobre el efecto del Disulfiram y los metabolitos del Disulfiram, se realizaron sobre líneas celulares establecidas, careciendo de su contraste con cultivos de células normales humanas; otros estudios comparan el efecto con líneas celulares normales inmortalizadas, las cuales, presentan una característica común con las líneas celulares tumorales, la proliferación excesiva, por lo que no es muy claro o concluyente su acción selectiva. Para poder establecer una acción selectiva se recomienda el uso de células humanas provenientes de preferencia del mismo origen o estirpe o del

mismo órgano. En el caso del MeDDTC-SO, el efecto antiproliferativo fue comparado en células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano y en linfocitos de sangre periférica humana, demostrando que la concentración de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ no afecta el potencial proliferativo de los fibroblastos ni de los linfocitos humanos, sugiriendo que este ditiocarbamato presenta una actividad antitumoral selectiva y no citotóxica.

No obstante lo prometedor de los resultados, es conveniente determinar el o los mecanismos moleculares que están implicados en la acción antiproliferativa o antitumoral, que dejen visualizar los genes o proteínas que regulan dicha acción y que podrían ser objeto de estudio que permitiera realizar una caracterización completa de las propiedades antitumorales que pudiera presentar el MeDDTC-SO para poder hacer una valoración correcta de su uso como agente terapéutico o preventivo en el desarrollo del CaCu así como aportar evidencia de sus propiedades antitumorales que pudieran ser de utilidad para su empleo en el tratamiento de otros tipos de cáncer.

CONCLUSIONES

- La concentración de MeDDTC-SO a la cual se disminuye la densidad celular en un 50% para las líneas tumorales HeLa y CaSki es de 1.7 $\mu\text{g/ml}$.
- El MeDDTC-SO a la concentración de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ no presentó un efecto citotóxico en las células HeLa y CaSki ni en células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.
- MeDDTC-SO induce una disminución en el número de células que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular en cultivos de células HeLa y CaSki.
- El compuesto MeDDTC-SO induce a las células HeLa y CaSki a una muerte celular por apoptosis a través de la participación de la caspasa 3 y la fragmentación de DNA.
- MeDDTC-SO a la concentración de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ no afecta el potencial proliferativo de células no tumorales (fibroblastos de cérvix y células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana).

REFERENCIAS

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter. 2004. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York.pp1294.
2. Alonso P., Lazcano E. y M. Hernández. 2000. *Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control*. Médica Panamericana. México. pp254.
3. Anthony C. y G.Thibodeau. 1991. *Anatomía Fisiología 10Ed*. Nueva Editorial Interamericana. México.pp.724.
4. Atalan E. 2001. Diet, smoking and reproductive history as risk factor for cervical cancer. *Revista Médica Chilena*.129 (6):597-603.
5. Bowen I. y S. Bowen.1990.*Programmed cell death in tumor and tissues*. Chapman and Hall. London pp.268.
6. Brar S., Grigg C., Wilson S., Holder D., Dreau D., Austin C., Foster M., Ghio J., Whorton R., Stowell W., Whittall B., Whittle R., White P. y T.Kennedy.2004 Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Molecular Cancer*. 3: 1049-1060.
7. Burgués J., Pontones J., Vera C., Jiménez J. y M. Ozonas. 2005 .Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en la Resistencia a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*. 29(9):844-859.
8. Caballero B. y J. Morán. 2002. Mecanismos Moleculares de la Regulación de la Muerte Apoptótica. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología celular. UNAM. 2 (4):2435-2440.
9. Callem.J-C.2000.*Biología Celular: de las moléculas a los organismos*.CECSA.México.pp488.
10. Cameron R.1995.*Oncología Práctica*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. pp769.
11. Cobby J.; Mayersohn M. y S. Sellian. 1997. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *Pharmacology*. 202:724:731.
12. Coto C. 2007. Inhibición de la Apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. *Química Viva*. 6(1):9-17.
13. Chen D., Peng F., Ciu Q., Daniel K., Orlu S, Liu J. y Q. Dou. 2005. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Bioscience* .10:2932-2939.
14. Chen Di; Qiuzhi C., Huanjie Y. y D. Ping.2006.Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binging Agent, Induces Apoptosis cell death in

- Breast Cancer Cultures and Xenografts via inhibition of the proteasome Activity. *Association for Cancer* .66(21):10425-10433.
15. Cho H., Lee T., Park J., Park K., Choe J., Sin D., Park Y., Moon Y., Lee K., Yeo J., Han S., Cho Y., Choi M., Park N., Lee Y. & Y. Chang. 2007. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *Journal of Biochemistry*. 40 (6):1069-1076.
 16. Cohen G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 326:1-16
 17. Cuello M., Cato S., Sadarangani A., Saez C., Gejman R. y S. Kipkowitz. 2006. Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroideas ováricas en la apoptosis inducida por el ligando Trail en cánceres ginecológicos. *Boletín Universidad, Católica de Chile*. 31 (1):5-15.
 18. Curtis H. y N. Barnes. 2005. *Biología*. 6ª Ed. Editorial medica Panamericana. México. pp. 1491.
 19. Daniel K., Chen D., Orlu S., Cui Q., Miller F. y Q. Dou. 2005: Cloroquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Rev*. 7: 897-908.
 20. Darnell J. y L. Baltimore. 1993. *Molecular Cell Biology*. Second Edition. Scientific American Books. USA. pp 920.
 21. Dazhi C., González R., Buckmeier J., Kahlon R., Tohidian N. y F. Meyskens. 2002. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells. *International Journal of Cancer*. 1 (3):197-204.
 22. Della Ragione F., Cucciolla V., Borriello A., Della Pietra V., Manna C., Galletti P. y V. Zappa. 2000. Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Academic Press*. 268(3):942-946.
 23. De Villiers E. 2003. Relationship between steroid hormone contraceptives and hpv, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *International Journal of Cancer*. 103:705–708.
 24. Diaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S. y A. Stutzin. 2005. Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*. 12:1449–1456.
 25. Franco El., Franco ED., y E. Ferenczy A. 2001. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*. 165(6): 739-743.
 26. Garret M. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science*. 81:515-522.
 27. Gasión J., Pontones J., Vera C., Jiménez J. y M. Ozonas. 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*. 29: 846-859.
 28. Goldsby R. 2004. *Inmunología*. 5ª Ed. Mc Graw Hill. México. pp 967.

29. Gorey K., Holowarty E. y G. Fehringer.1997.A International comparison of cancer survival: Toronto, Ontario and Detroit, Michigan, metropolitan areas. *Public Health*. 87:1156-1163.
30. Gourley M. y J. Williamson .2006.Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Drugs Aging*. 17:249-255.
31. Guang-Yaw L., Norbet F., Helmut B. y L. Jen-Kun.1998.Induction of apoptosis by Thiuramdisulfides, the Reactive Metabolites of Dithiocarbamate, through coordinative Modulation of NFkB, c-fos/c-jun, and p53 proteins. *Molecular Carcinogenesis*. 22:235-246.
32. Hu P., Jin L. y T. Baillie. 1997. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. *Journal Pharmacology*. 281: 611-617.
33. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2008. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer: datos nacionales. México DF. Consultada el 12 de abril de 2009.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>
34. Jacobson M., Weil M. y M. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Journal Cancer*. 88: 347-354.
35. Janie P., Richard S. Hotchkiss and Mike Bray. 2007. Prevention of immune cell apoptosis is potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerging Infectious Diseases*.13:191-198.
36. Jhonson T.1994.Negative regulators of cell proliferation. *Pharmacology Therapy*.62:247-265.
37. Kanno S., Matsukawa E., Miura A., Shouji A., Asou K. y M. Ishikawa. 2003. Diethyldithiocarbamate-Induce cytotoxicity and apoptosis in leukemia cell lines. *Biological & Pharmaceutical*. 26(7):964-968.
38. Karp G. 1998. Biología celular, 2 ed. Mc Graw Hill, México. pp: 950.
39. Lacruz C., Di Martino B. y E. Álvarez. 2003. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (VPH) en las lesiones escamosas del cérvix uterino. *Revista Española de Patología*. 36: 79-84.
40. Lodish H., Berk A., Zipurski S., Matsudaira P., Baltimore D. J.Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company. New York. pp 973.
41. López M.2008.Síntesis de algunos sulfóxidos y sulfonas como potenciales inhibidores de la Botaina Aldehído Deshidrogenasa de *Pseudomonas Aeruginosa*. Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
42. Lorincz A., Reid R. y A. Jenson.1992.Human papillomavirus infection of cervix: relative risks association of 15 common anogenital tipos. *Rev, Gynecol*.79:328-335.

43. Longworth M. y L. Laimins. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 68: 362-372.
44. Lundwall L. y F. Bakeland. 1991. Disulfiram treatment of alcoholism. *J. Nerv. Ment. Dis.* 153:381-394.
45. Malaguarnera L., Pilastro M., DiMarco R., Scifo C., Renis M., Mazzarino M. y A. Messina. 2003. Cell death in human acute myelogenous leukemic cells induced by pyrrolidine dithiocarbamate. *Apoptosis* 8: 539-545.
46. Marikovsky M., Ziv V., Nevo N., Harris-Cerruti C. y O. Mahler. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *Journal Immunology*. 170: 2993-3001.
47. Mathews C. y K. van Holde. 1998. *Bioquímica*. Mc Graw Hill Interamericana. España. pp 1283.
48. Morgan S. y C. Darling. 1995. *Cultivo de células animales*. Acribia, Zaragoza. pp: 159.
49. Muños N. & X. Bosh. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica. México*. 39:174-282.
50. Novikoff A. 1978. *Estructura y Dinámica Celular*. 2ª Ed. Interamericana. México. pp
51. Pardo F. 1998. *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. Científico-Médico. España. pp. 335.
52. Parkin D., Pisani P. y J. Ferlay. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eight teen major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 54:594-606.
53. Peralta O., Bahena M., Díaz C. y V. Madrid. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública México*. 39: 451-452.
54. Pike M., Mays D., Macomber D. & J. Lipsky. 2001. Metabolism of a Disulfiram metabolite, S-methyl-N,N-diethyldithiocarbamate, by flavin mono oxygenase in human renal microsomes. *Metabolites*. 29:127-132.
55. Putcha V., Harris C., Moulder K., Easton R., Thompson B., y E. Johnson. 2002. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice Girish. *Journal of Cell Biology*. 3:441-453.
56. Rosso E., Faggiano F., Zanetti R. y G. Costa. 1997. Social Class and cancer survival in Turin, Italy. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 51:30-34.
57. Ryan C. y G. Wilding. 2000. Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Cancer*. 17:249-255.
58. Sánchez-Torres L. y F. Vargas. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Mex*. 41 (1):49-62.

59. Shen J., Lipsky J. y S. Naylor. 2000. Role of Disulfiram in the In Vitro Inhibition of Rat Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Biochemistry and Pharmacology*. 60: 947-953.
60. Sofuoglu M. y T. Kosten. 2005. Novel approaches to the treatment of cocaine addiction. *Drugs* 19: 13-25.
61. Sonnenschein, C. y A. Soto. 1999. The society of cell: cancer and control of cell proliferation. Bios Scientific Publishers. New York. pp. 154.
62. Suárez A., Prieto M. y E. 2001. Programa Nacional de Cáncer Cérvico-uterino. *Ginecología y obstetricia*. 66(6):480-491.
63. Thomlinson A., Johnson K., Lam-Halt J., May D., Lipsky J. y S. Naylor. 1997. Inhibition of human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase by the Disulfiram Metabolite S-Methyl-N-N-diethylthiocarbamyl Sulfoxide. *Biochemical*. 59:1253-1260.
64. Ting-Jun F., Li-Hui H., Ri-Shan C. y L. Jin. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica*. 37: 719-727.
65. Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. y G. Borges. 2005. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública México*; 47:342-350.
66. Torrella A. y N. Garcia. 2004. Inmunoterapia en melanoma. *Oncología*. 27 (3):102-107.
67. Walboomers J., Jacobs M., Manos *et al.* 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal Pathology*. 189:12-19.
68. Wickstroem M., Danielsson K., Richardson L., Gullbo J., Nygren P., Isaksson A., Larsson R. y H. Loevborg. 2007. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*. 73 (1):25-33.
69. Yocota J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3):497-503.
70. Zhaoyu J. y W. El-Deiry. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 4:139-163.
71. Zentella A., López-Marure B., Gómez E., Paredes E. y Ma De J. Ibarra. 1995. El ciclo celular y su regulación: la interacción entre las proteínas cinasas CDKs y la familia de las ciclinas. *Boletín de Educación Bioquímica*. 15 (1):4-12.
72. Zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. *Biochemical Biophysical Acta*. 1288:55-78.

APÉNDICE

RPMI 1640

Componente	mg/L
L-Arginina (base libre)	200
L-Asparagina	50
Ácido L-Aspártico	20
L-Cistina	50
Ácido L-Glutámico	20
L-Glutamina	300
Glicina	10
L-Histidina (base libre)	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina HCl	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina	20
L-Triptófano	5
L-Tirosina	20
L-Valina	20
Biotina	0.2
D-Ca pantotenato	0.25
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
I-Inositol	35
Nicotinamida	1
Riboflavina	0.2
Tiamina HCl	1
Vitamina B12	0.005
Piridoxina HCl	1

Ácido P-Aminobenzoico	1
KCl	400
MgSO ₄ 7 H ₂ O	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	2200
Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	1512
CaNO ₃ 4 H ₂ O	100
D-Glucosa	2000
Glutation reducido	1
CO ₂ fase de gas	5%

VERSENO

EDTA (Sigma Chem. USA)	0.4 g
NaCl (Sigma Chem. USA)	8 g
KCl (Sigma Chem. USA)	0.4 g
Tris (Sigma Chem. USA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)

Mg Cl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.1 g
Ca Cl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.1 g
Na Cl (Sigma Chem. USA)	8 g
K Cl (Sigma Chem. USA)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma Chem. USA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma Chem. USA)	0.2 g

El MgCl₂ y CaCl₂ se disuelve en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 N y se

afora a 1000 ml. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22 μm y se almacena a 4 °C.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacene a 4 °C.

Solución cristal violeta (0.1 %)

Para prepara 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH = 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra usando papel Whatman núm. 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (Sigma Chem. USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma Chem. USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma Chem. USA)	1 g

Solución de ácido acético (10 %)

A 90 ml de agua bidestilada se le agrega 10 ml de ácido acético glacial (J. T. Baker)

Desactivación del suero fetal bovino (SFB)

El SFB es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56° C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico.