



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER.

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA
(UMIEZ) LAB 2, P. B.

**Efecto antiproliferativo, citotóxico inductor de muerte del
Disulfiram en líneas celulares 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:

JOSÉ CARLOS RAYA ENRÍQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. Luis Sánchez Sánchez



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"La duda es la madre del descubrimiento." (Ambrose Bierce)

"Hay dos formas de ver la vida: una es creer que no existen milagros, la otra es creer que todo es un milagro." (Albert Einstein)

"Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad que es la madre de la ciencia." (Juan Aguilar M.)

"La ignorancia puede ser curada, pero la estupidez puede ser eterna." (Matt Artson)

Dedicado a mis padres por su apoyo durante mis estudios, a mi madre por su cuidado y su apoyo, a mi padre por su apoyo incondicional y sus consejos certeros y oportunos, gracias padres siempre estuvieron hay para mí y al fin después de tantos errores y aciertos, de tantos sacrificios, al final podemos darnos este lujo de estar aquí, al final de este camino. Gracias por estar conmigo apoyándome.

Dedicado a mis hermanas, ustedes niñas locas, Ana Laura, Adriana, Beatriz. Que estuvieron junto a mí siempre, que fuimos felices con mis momentos de dicha y me aguantaron en mis momentos de amargura siempre con una sonrisa y nunca con una doble cara, con su cariño incondicional. Gracias por ser unas grandes hermanas siempre sepan que estoy aquí para ustedes como ustedes estuvieron para mí.

A mi familia que estuvo siempre hay para apoyarme en todas mis aventuras gracias por estar hay siempre. A ti abuela Maru que siempre me has dado ánimo para seguir en mi camino sin perderlo, a mis primos, siempre con ustedes es una gran

aventura, a toda mi familia que no cambiaría por nada en el mundo.

A ti niña especial, que has estado junto a mi todo este tiempo que hemos tenido descabros pero al fin logramos librarnos de ellos gracias por estar hay en esta parte importante de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio a todos los de licenciatura, a mis profesores por impartirme este gran conocimiento y enseñanza que me dieron para poder llegar a ser en un momento un gran ser humano.

Agradecimientos

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por confiar en mí y apoyarme durante mi formación académica, así como todos sus consejos para poder lograr este logro tan importante en mi vida.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por dedicarme parte de su tiempo, consejos y pláticas interesantes.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por ser muy estricto, platicar conmigo y sobre todo por sus consejos durante todo este tiempo.

A la Biol. Reynalda Roldán Pérez, por sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.

Ésta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto PAPIIME: PE206812

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	11
❖ La célula	11
❖ Proliferación Celular	11
❖ Ciclo Celular	12
▪ Control del Ciclo Celular	13
❖ Muerte Celular	15
▪ Necrosis	16
▪ Apoptosis	16
○ Vía Extrínseca	18
○ Vía Intrínseca	18
○ Caspasas	19
○ Reguladores de la Apoptosis	19
❖ Estrés Oxidativo	20
❖ Cáncer	21
❖ Cáncer cervicouterino (CaCU)	23
▪ Factores de Riesgo del CaCU	23
❖ Tratamientos	25
❖ Agentes antiproliferativos	27
❖ Disulfiram (DSF)	28

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS PARTICULARES	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
METODOLOGÍA	34
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
APÉNDICE	65

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En el 2008 se le atribuyeron alrededor de 7.6 millones de muertes a nivel mundial. Uno de los cánceres que más afecta a las mujeres mexicanas es el cáncer cervicouterino, el cual está entre las principales causas de muerte por carcinomas. No obstante el éxito de las terapias que actualmente se aplican para este padecimiento, éstas son relativamente ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, la mayoría de los fármacos son de acción citotóxica y poco selectivos, causando efectos colaterales graves que deterioran la calidad de vida del paciente, generando la necesidad de buscar nuevas estrategias para combatir este mal. Dentro de las nuevas estrategias está la revaloración de la actividad de fármacos conocidos. Existen muchos fármacos con estas características, sin embargo su evaluación como agentes anticancerígenos es pobre y se desconoce si son capaces de discriminar entre células tumorales y no tumorales. Un ejemplo de estos compuestos es el Disulfiram (DSF), un fármaco que por más de medio siglo se ha utilizado para el tratamiento del alcoholismo y actualmente se le ha encontrado propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales como son de mama, próstata, linfomas, glioblastomas, entre otros. En este trabajo se utilizó como modelo de estudio a las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, provenientes de cáncer cervicouterino y a células no tumorales (Fibroblastos de cérvix humano y células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana), se evaluó el efecto antiproliferativo del DSF, encontrando una actividad antiproliferativa dependiente de la dosis con una IC_{50} de 67.5 ng/ml para CaSki, 69.5 ng/ml para HeLa y 80 ng/ml para ViBo. Además se ha reportado con actividad citotóxica en líneas celulares de melanomas humana, para determinar si el DSF cuenta con una actividad citotóxica en líneas celulares de CaCU se evaluó, su actividad mediante la incorporación del yoduro de propidio (IP) y la detección de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos tumorales tratados con el DSF, mostró que en la línea celular HeLa, el DSF indujo a las células a una muerte necrótica, mientras que en las células CaSki y ViBo la inducción a este tipo de muerte no fue muy alta.

La detección de la caspasa 3 activa en las células CaSki y ViBo tratadas con el DSF sugiere que el DSF indujo a estas células a una muerte por apoptosis. La nula detección de especies reactivas de oxígeno provenientes del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células tratadas con el DSF mostró que el DSF no induce la generación de este tipo de especies reactivas en las líneas celulares de CaCU, concluyendo que en la muerte celular inducida por el DSF no participan especies reactivas provenientes del peróxido de hidrógeno. Para determinar la acción selectiva del DSF, su potencial antiproliferativo fue evaluado en células fibroblásticas provenientes de cérvix humano con una concentración de 80 ng/ml, así como en células linfocíticas de sangre periférica humana con una concentración de 70 ng/ml, obteniendo que el DSF no afecta el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, mientras que en las células linfocíticas el DSF afectó el potencial proliferativo en un 15.73 % a las 72 h, indicando que el DSF presenta una actividad antiproliferativa de acción selectiva. En base a estos resultados preliminares obtenidos, el DSF puede ser considerado un digno candidato para ser evaluado en modelos *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México y es de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (INEGI, 2008). Los factores de riesgo son diversos, como el inicio de una vida sexual temprana, tener o haber tenido varias parejas sexuales, consumo de tabaco, alcohol, entre otros. El cáncer cérvicouterino, está asociado en más de un 90 % con el virus del papiloma humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 corresponden en más del 60% de los casos de esta enfermedad (López y Lizano, 2005). Los tratamientos, como la cirugía, la radiación y las quimioterapias actualmente utilizadas, son eficientes en etapas tempranas de la enfermedad, sin embargo, éstas afectan significativamente la calidad de vida de los pacientes y resultan ineficientes cuando la enfermedad está en estadios avanzados (metástasis). Además, su mecanismo de acción no es selectivo, afectando tanto a las células tumorales como sanas.

En los últimos años, el interés por valorar la actividad anticancerígena de ciertos fármacos para su uso como agentes terapéuticos ha aumentado. Entre tales compuestos se tiene al Disulfiram (DSF), compuesto perteneciente a la familia de los Ditiocarbamatos, utilizado en el tratamiento del alcoholismo. Recientemente, se le ha reportado con actividad antitumoral e inductor de apoptosis en diferentes líneas celulares murinas, como carcinoma pulmonar y melanoma, entre otras (Marikovsky *et al*, 2003). Además ha mostrado reducir la angiogénesis e inhibir a la ADN topoisomerasa (Yakisich *et al*, 2001). También, cuando el DSF forma un complejo con el cadmio, inhibe el proteosoma en cáncer de próstata llevando a muerte apoptótica (Li *et al*, 2008). El Disulfiram también se ha reportado como antioxidante (Kuhnlein, 1980) por que inhibe la formación de especies reactivas de H_2O_2 . No obstante estos estudios, existen pocos estudios sobre la actividad del Disulfiram en líneas provenientes de cáncer cervicouterino (CaCU), por lo que es relevante su evaluación sobre este tipo de cáncer.

MARCO TEÓRICO

La célula.

Todas las criaturas vivas están formadas por células (Alberts *et al*, 2002). En la jerarquía de la organización biológica, la célula es el conjunto de materia más simple que puede vivir (Niel y Jane, 2007). Todas las células tienen características básicas comunes. La región de la célula que se extiende entre la membrana plasmática y el núcleo es el citoplasma, que está compuesto del citosol y los orgánulos (Lodish *et al*, 2005). Todas las células contienen cromosomas en los que se encuentran el ADN (Niel y Jane, 2007).

Las células presentan un citoesqueleto, el cual es una red de filamentos proteínicos que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona el marco estructural de la célula, determinando la forma celular y la organización general del citoplasma. La existencia del núcleo es la característica principal que diferencia las células eucariontes de las células procariontes (Cooper, 2002). Al igual que nosotros cada célula puede crecer y reproducirse, dependiendo de los requerimientos del organismo (Lodish *et al*, 2005).

Proliferación celular.

La proliferación celular participa en numerosos procesos fisiológicos y patológicos como: el crecimiento, la cicatrización, la reparación, además cuando hay una desregulación puede llevar al desarrollo de tumores. De acuerdo con la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “las células solo provienen de células”. La capacidad de autorreplicarse probablemente sea la característica fundamental de la célula (Cooper, 2002).

Las células se reproducen duplicando su contenido y luego dividiéndose en dos (Alberts *et al*, 2002) para ello las células precisan recibir estímulos como factores de crecimiento, los cuales son capaces de estimular el crecimiento y diferenciación celular y cuando se privan de estos, las células detienen su proliferación (Martínez-Carpio y Navarro, 2003). Las células se reproducen por una serie

ordenada de etapas a través de las cuales pasan desde una división celular a la siguiente, constituyendo el ciclo celular (Rang *et al*, 2008).

Ciclo celular.

El ciclo celular es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (Burgués *et al*, 2005).

La reproducción celular tiene una secuencia ordenada de pasos, que se inicia una vez que se forma una célula hija por mitosis y termina cuando la célula finaliza su propia división celular (Starr y Taggart, 2004). La división celular está constituida por una serie ordenada de acontecimiento macromoleculares los que finalizan en la producción de dos células hijas, en el cual cada una contienen cromosomas idénticos a los de la madre (Lodish *et al*, 2005).

La división celular consiste en cuatro procesos coordinados los cuales son: el crecimiento celular, la replicación del ADN, la distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y la división celular. Por su parte el ciclo celular consiste en cuatro fases diferenciadas (Cooper, 2002). Las cuales son: G1, S, G2 (interfase) y M (mitosis) (Watson, 2008; Passager, 2010). Las fases del ciclo celular, varían considerablemente en duración total, desde unos minutos en algunas células, a varias semanas o meses en otras (Lehninger, 2005).

En la mayoría de las células, la interfase es la etapa más prolongada del ciclo. Esta etapa del ciclo celular es donde la célula aumenta su tamaño, incrementa el número de sus componentes citoplasmáticos, y duplica su ADN (Starr y Taggart, 2004). En los cuales las etapas G1, S y G2 tiene patrones de biosíntesis distintos. La mayoría de las células permanecen en G1 cuando sintetizan casi todas las proteínas, carbohidratos y lípidos que exportan. Por ello la célula en esta fase es metabólicamente activa (Rang *et al*, 2008).

Las células en G1 pueden, detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, a menudo llamado G0 donde pueden permanecer durante días semanas o incluso años antes de volver a proliferar (Alberts *et al*, 2002).

Aunque el crecimiento celular suele ser un proceso continuo, el ADN solo se sintetiza durante la fase S del ciclo (Cooper, 2002), donde la célula duplican su ADN y otras proteínas asociadas a él como las histonas. Además, la duplicación de los cromosomas tiene lugar en esta fase del ciclo (Cooper, 2002).

Tras finalizar la síntesis del ADN la célula entra a la fase G2, en donde se incrementa el tamaño de la célula y se sintetizan las proteínas que intervendrán posteriormente en la mitosis (Starr y Taggart, 2004).

La fase M del ciclo, corresponde a la mitosis (Rang *et al*, 2008). La mitosis es la etapa más llamativa del ciclo, en la cual la envoltura del núcleo se degrada, el ADN se condensa formando cromosomas y los microtúbulos se reorganizan formando el huso mitótico que finalmente separa los cromosomas y termina en la división celular (Cooper, 2002). El resultado final de la mitosis es generar dos células hijas, con la misma cantidad de cromosomas y ADN que la célula madre.

Para que el ciclo celular se ponga en marcha debe de haber factores de crecimiento que actúen sobre una célula e induce su división. La acción de un factor de crecimiento consiste en estimular la síntesis de reguladores del ciclo celular, que están codificados por los genes de respuesta retardada (Rang *et al*, 2008).

Control del ciclo celular.

La progresión de las células a través del ciclo celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular (Cooper, 2002).

Uno de los puntos de regulación principales del ciclo celular, se encuentra al final de la fase G1 y controla el paso de G1 a S. Este punto de control es un punto

decisivo en el que la célula determina si hay suficientes nutrientes disponibles para avanzar a la siguiente fase del ciclo. Una vez que pasan este punto las células quedan determinadas a entrar en la fase S.

Otro punto de control se encuentra al inicio de G2 el cual impide la iniciación de la mitosis antes del término de la fase S, asegurando así que el ADN replicado incompletamente no se transmita a las células hijas. También es importante asegurar que el genoma sólo se replica una vez en cada ciclo celular. Así, una vez que un segmento de ADN ha sido replicado durante la fase S, deben existir mecanismos de control que impidan la reiniciación de la replicación del ADN hasta que se haya completado el ciclo celular y la célula haya pasado por la mitosis. Si el ADN está dañado, el ciclo se detiene en uno de estos dos puntos y inician mecanismos de reparación del ADN (Rang *et al*, 2008; Guerrero *et al*, 2003).

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los cuales se encuentran las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Varela, 2002) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina) (Peralta *et al*, 1997). Que a su vez están reguladas por los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular (Cooper, 2002). Este es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, que induce y coordina los procesos en los cuales se duplican y dividen los contenidos de la célula (Alberts *et al*, 2002).

Cada CDK se encuentra en estado inactivo hasta que se une a una ciclina, cuya unión permite a la CDK fosforilar la proteína o las proteínas necesarias para una fase determinada del ciclo. Existen 8 grupos principales de ciclinas. Las más importantes para el control del ciclo celular son los A, B, D y E. Cada ciclina se asocia a una o varias CDK específicas y las activa. La ciclina A activa a las CDK 1 y 2, la ciclina B a la CDK 1, la ciclina D a las CDK 4 y 6 y la ciclina E a las CDK 2 (Rang *et al*, 2008).

El complejo CDK-Ciclina fosforila diversas proteínas, activando algunas e inhibiendo otras, para coordinar sus actividades. La ciclina determina que

proteínas se fosforilan. Una vez que se ha complementado la fosforilación, la ciclina es degradada por el sistema ubiquitina/proteasa, que comprende varias enzimas que actúan sucesivamente añadiendo pequeñas moléculas de ubiquitina a la ciclina (Rang *et al*, 2008).

Además de se sabe que las células sintetizan proteínas inhibidoras de los complejos CDK-Ciclinas, que colaboran al control del ciclo celular. Estas proteínas se han agrupado en dos: las proteínas INK4 (inhibidoras de cinasa 4) y las CIP (proteínas inhibidoras de CDK) (Campbell, 2004). Las INK4, se unen e inhiben sólo los complejos CDK 4-ciclina D y CDK 6-ciclina D. Las CIP se unen e inhiben a todos los complejos que tengan CDK 1, 2, 4 y 6, como son: p21, p27 y p53.

Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjuntos inhibidores de CDK (CKI), y algunos factores de transcripción (como el p53) tienen la función de impedir la proliferación celular. Por su acción normal, a los genes que codifican estas proteínas se les denominaron “genes supresores de tumores” (Alberts *et al*, 2002).

Durante la replicación del ADN y la división celular pueden ocurrir múltiples errores (Passager, 2010). La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y la pérdida de control termina por producir cáncer (Lodish *et al*, 2005).

Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-Ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige (Peralta *et al*, 1997). Cuando el daño no puede ser reparado la célula inicia mecanismos de muerte celular.

Muerte celular.

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo. En la actualidad se conocen de manera general dos formas de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (Sánchez-Torres y Doisdado, 2003). Por necrosis, las células mueren cuando son lesionadas por agresión mecánica o

tóxica. Por apoptosis mueren las células cuando tiene un daño irreparable en el ADN llevando a una muerte celular programada.

Existen diferencias entre la apoptosis y la necrosis; morfológicamente en la apoptosis se produce fragmentación de ADN y se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular y en la necrosis se pierde la integridad de la membrana. Bioquímicamente, la apoptosis es dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (Burgués *et al*, 2005).

Necrosis.

La necrosis fue descrita en 1858 por Virchow, y puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo (Sánchez-Torres, 2003). Dentro de los factores desencadenantes pueden citarse la isquemia, la hipertermia o hipotermia severas, el trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos (Sánchez-Torres, 2003).

Típicamente, las células que atraviesan este proceso se dilatan, estallan y liberan sus contenidos intracelulares, lo cual puede dañar a células circundantes, que a su vez, suele causar inflamación (Lodish *et al*, 2005). La necrosis es un fenómeno pasivo; no está programado genéticamente. Las células que experimentan este tipo de muerte cesan la producción de proteínas y ATP. Estructuralmente, los organelos de las células se hinchan y se vuelven no funcionales durante las etapas iniciales (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

En la necrosis existe un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, que se traduce en entrada de agua e iones acompañada de disminución de la capacidad para bombear iones, lo que lleva a hinchazón y posibilidad de ruptura de la membrana celular (Repetto y Repetto, 2009).

Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso esencial requerido en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de tejidos (Zimmermann y Green,

2001). Además de que es importante durante la embriogénesis, la regulación del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis tisular (García *et al*, 2009; Iannolo *et al*, 2007).

La apoptosis es una muerte celular, controlada genéticamente, que elimina células no necesarias o dañadas. Se origina por una lesión irreparable del ADN, lo cual lleva a una muerte celular sin respuesta inflamatoria (Repetto y Repetto, 2009). El fallecimiento de las células mediante la muerte celular programada está marcado por una secuencia bien definida de cambios morfológicos, denominados en forma colectiva apoptosis (Lodish *et al*, 2005).

Los primeros signos visibles de la apoptosis son la condensación de la cromatina y la disminución del tamaño celular (Passager, 2010). Al mismo tiempo de presentar las siguientes características: las células mueren “limpiamente” sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, se colapsa el citoesqueleto, el ADN se fragmenta, en sus mitocondrias se generan poros los cuales liberan a el citocromo C (Cascales, 2003), además de que el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo, organelos, finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada (Kolber *et al*, 1990), impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células (Elinos-Báez *et al*, 2003). Con ayuda del fosfolípido fosfatidilserina, un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana celular, el cual cuando se expone en la cara externa de la membrana en la muerte celular programada, éste se une a receptores de las células fagocíticas que engullen los cuerpos apoptóticos, las células fagocíticas segregan citocinas que inhiben la inflamación (Cascales, 2003).

El proceso de apoptosis puede dividirse en una fase de iniciación durante la cual las caspasas se hacen catalíticamente activas, y la fase de ejecución, donde las enzimas actúan produciendo muerte celular (Kumar *et al*, 2005).

La iniciación de la apoptosis puede ser inducida por señales externas a la célula, o por señales originales en la misma célula (Anaya *et al*, 2005), dos vías se pueden identificar: la vía intrínseca, que es controlada por permeabilización de la membrana mitocondrial, y la vía extrínseca, en la que un receptor de muerte desencadena la cascada de la apoptosis (Iannolo *et al*, 2007).

Vía extrínseca de la apoptosis.

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores (Rojas *et al*, 2009). La unión de un ligando de muerte trimérico a un receptor de muerte, que se encuentra en la célula, determina que los dominios de muerte citoplasmáticos del receptor de muerte se trimericen. Esto recluta adaptadores, que se unen por sus dominios de muerte a los dominios de muerte del receptor de muerte. Los adaptadores, a su vez, reclutan procaspasas iniciadoras, lo que induce su autoactivación para formar las correspondientes caspasas iniciadoras heterodiméricas. Después, las caspasas de iniciación activan, en forma proteolítica, las procaspasas efectoras para originar caspasas efectoras heterodiméricas, que catalizan las escisiones proteolíticas y determinan la apoptosis (Voet, 2006; Wilson *et al*, 2007).

Vía intrínseca de la apoptosis.

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN (Rojas *et al*, 2009).

Esta vía de apoptosis da como resultado una permeabilidad en la membrana mitocondrial, liberando moléculas proapoptóticas al citoplasma sin intervención de los receptores de muerte (Kumar *et al*, 2005) y la liberación de citocromo C en el citoplasma (Iannolo *et al*, 2007), en donde se une y activa una proteína adaptadora llamada Apaf-1, activando la caspasa 9 y formando un complejo denominado “apoptosoma” (Iannolo *et al*, 2007), y posteriormente activando a caspasa 3 la cual es una caspasa efectora (Bernhardi, 2004).

Ambas vías concluyen en la activación de las caspasas 8, 9 y 10 que activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Anaya *et al*, 2005).

Caspasas.

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato.

Las caspasas, son un grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cistein-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Las cuales desempeñan papeles críticos en la iniciación y ejecución de la apoptosis (Guo *et al*, 2002).

La interacción entre las moléculas adaptadoras y el predominio de las caspasas iniciadoras 2, 8 ó 10 desencadenan la autoactivación mediada por el secuestro de estas caspasas (Yang *et al*, 1998; Guo *et al*, 2002).

Las procaspasas (30-50 kD) contienen tres dominios: un prodominio N- terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9, -10, y el grupo *efector* o *ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes -3, -6 y -9 (Cascales, 2003).

Reguladores de la apoptosis.

Más de 20 proteínas de la familia de proteínas Bcl-2 funcionan normalmente para regular la apoptosis: las dos principales proteínas antiapoptóticas son Bcl-2 y Bcl-x. Cuando las células se ven privadas de señales de supervivencia o sometidas a estrés, Bcl-2 y Bcl-x se pierden de la membrana mitocondrial y son sustituidas por miembros proapoptóticos de la familia. Al disminuir los niveles de Bcl-2/Bcl-x, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con lo que se produce una fuga de varias proteínas que pueden activar caspasas (Kumar *et al*, 2005). Los inhibidores de la apoptosis (IAP's) pueden actuar como inhibidores de los 2

efectores de muerte, caspasa 3 y 7, y son capaces de suprimir la activación de las caspasas iniciadoras 2, 8 y 9 (Zimmermann y Green, 2001).

Se ha encontrado una correlación positiva entre las especies reactivas de oxígeno con niveles de citocromo c y las caspasas 3 y 9 en las células, induciendo así un incremento en la apoptosis (Wang *et al*, 2003).

Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes que conduce a la lesión celular, en combinación con la depleción de ATP y la reducción de los niveles de glutatión en la célula. El cual está característicamente asociado con la necrosis. De la misma manera puede inducir apoptosis (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

Estos factores generalmente causan la muerte al sobrepasar los mecanismos regulatorios y homeostáticos, o al comprometer la integridad estructural de la célula (Bernhardi, 2004).

Las fuentes de energía como la glucosa se metabolizan en el citoplasma inicialmente. Los productos se incorporan a las mitocondrias, que prosiguen con el catabolismo a través de vías metabólicas como el ciclo de la oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos. El resultado final de estas vías es la producción de dos donantes de electrones muy energéticos, el NADH y el FADH₂ (Conde de la rosa *et al*, 2008).

Los electrones de estos donantes se transfieren a través de una cadena de transporte electrónico hasta el O₂, que se ve reducido para formar agua. Como resultado, se producen moléculas muy inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO), que tienen electrones capaces de reaccionar con varios sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

Las especies reactivas de oxígeno generan necrosis por modificación del ADN, lípidos y proteínas en las células. Pueden inducir la peroxidación lipídica, lo que

resulta en la desestabilización de las membranas dentro y alrededor de la célula. Por ejemplo, la peroxidación de lípidos de la membrana que rodea la mitocondria interfiere con la generación de ATP en la mitocondria, lo que contribuye a la depleción de ATP. Del mismo modo, la interacción de los radicales de oxígeno con proteínas podría interferir con las funciones de las proteínas (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

Cuando los mecanismos de control del ciclo celular se ven desregulados en una célula, así como los mecanismos de muerte celular se ven alterados, la célula y sus descendientes pueden iniciar una división descontrolada, que con el tiempo dará a lugar una enfermedad conocida como cáncer (SECC, 2012).

Cáncer.

El cáncer es una enfermedad compleja, que surge ante las alteraciones genéticas que interfieren con las funciones celulares encargadas de regular la proliferación, apoptosis y envejecimiento (Grillo-Ardila *et al*, 2008).

El cáncer, es una enfermedad cuya existencia es conocida desde hace mucho tiempo, pero ha comenzado a tener importancia a lo largo del siglo XX por la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona (Varela, 2002).

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas (alteración en p53) y epigenéticas (metilación del ADN, acetilación de histonas y metilación de histonas), que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular (Meza-Junco *et al*, 2006).

Ésta se da cuando las células normales se transforman en cancerígenas, es decir, adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente e invadir tejidos y otros órganos. Este proceso se denomina carcinogénesis.

La carcinogénesis dura años y pasa por diferentes fases. Existen sustancias responsables de producir esta transformación los cuales se llaman agentes carcinógenos. Un ejemplo de ellos son la radiación ultravioleta del sol, el asbesto o el virus del papiloma humano (SECC, 2012).

Una célula normal pasa a convertirse en cancerosa como consecuencia de alteraciones en los genes que regulan la división celular, en genes responsables de mantener y reparar el ADN, entre otros (Meza-Junco *et al*, 2006). Este daño puede dar un aumento de los genes que estimulan la división de las células o una pérdida de función de los genes que frenan la división celular (Macarulla *et al*, 2009; Cooper, 2002).

Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: ellas y su progeñie se reproducen a pesar de las restricciones normales e invaden y colonizan otros territorios reservados para otro tipo de células, este proceso es conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (Alberts *et al*, 2002). Esto es el resultado de un defecto adquirido del ADN celular que provoca una desregulación en el proceso de crecimiento celular (González-Merlo y González, 2000).

Las principales categorías del cáncer son:

Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.

Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.

Linfoma y mieloma: cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.

Cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal (SECC, 2012; Alison, 2001).

El cáncer cervicouterino (CaCU) es del tipo carcinoma, las células cancerosas se ubican en los tejidos del cuello uterino, se desarrolla en el cérvix en la porción inferior estrecha del útero.

Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino es un tipo frecuente de cáncer en mujeres, y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. Por lo general, es un cáncer que crece lentamente, que puede no tener síntomas. La causa del cáncer de cuello uterino es casi siempre por infección con el virus del papiloma humano (VPH).

En el 2005 se registraron más de 500 000 casos nuevos de cáncer cervicouterino, de los cuales el 90% correspondía a países en desarrollo. Y en el 2008 las defunciones por esta enfermedad superaron las 250 000 defunciones (López y Lizano, 2006; OMS, 2012).

En el año 2008, la incidencia de cáncer cervicouterino en México fue de 10.06 casos por cada 100 mil mujeres de 15 años o más (INEGI, 2008).

Factores de riesgo del cáncer cervicouterino.

- Inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años.
- Infección por virus del papiloma humano.
- Mujeres de 25 a 64 años de edad.
- Múltiples parejas sexuales (del hombre y de la mujer).
- Antecedentes de haber padecido enfermedades de transmisión sexual.
- Tabaquismo.
- Desnutrición.
- Deficiencia de antioxidantes.
- Pacientes con inmunodeficiencias.
- Nunca haberse practicado el estudio citológico.

La causa subyacente primaria del cáncer cervicouterino es la infección por una o más cepas oncógenas del virus del papiloma humano (VPH), un virus corriente que se transmite por vía sexual. La relación entre el cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano, fue propuesta a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen y continúa siendo hoy explorada por diversos estudios (López y Lizano, 2006).

Se ha comprobado que más del 99.7% de los carcinomas cervicouterinos contienen ADN del VPH, correspondiendo al tipo 16 la mayor prevalencia al hallarse en aproximadamente la mitad de los casos, seguido por el tipo 18 involucrado en 12% de los mismos.

Actualmente se ha podido establecer un modelo de carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano con base en los hallazgos epidemiológicos y moleculares (Burd, 2003).

Los mecanismos conocidos implican una interacción de los productos genéticos de VPH que controlan estrechamente una intrincada red de oncogenes y antioncogenes celulares que regulan la proliferación celular y la síntesis del ADN.

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (López y Lizano, 2006). Los genes tempranos son responsables de la replicación del ADN, regulación transcripcional de la célula infectada. Los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside viral (Serman, 2002).

Existen más de 80 tipos distintos de VPH, de los cuales, al menos 25 afectan al tracto genital femenino y de acuerdo a su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en: alto (tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 66, 68, 70) y bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44), siendo el VPH 16 el responsable hasta en el 50% de todos los cánceres cervicales (Grillo-Ardila *et al*, 2008; Burd, 2003). Se incluyeron en el grupo de alto riesgo algunos tipos de VPH que son

menos frecuentes en los cánceres, pero se encuentran a menudo en lesiones escamosas intraepiteliales (Burd, 2003).

La mayoría de los cánceres de cuello uterino surgen en la unión escamoso-cilíndrica entre el epitelio columnar del endocérvix y el epitelio escamoso del exocérvix. En este sitio, hay continuos cambios metaplásicos. El mayor riesgo de infección por VPH coincide con la mayor actividad metaplásica. La mayor actividad metaplásica se producen en la pubertad y en el primer embarazo y desciende después de la menopausia (Burd, 2003).

El virus infecta las células basales, para basales o de reserva, las cuales se pueden dividir y diferenciar en epitelio escamoso, glandular o neuroendocrino; en cuanto a las células con diferenciación escamosa, su maduración se programa y ordena a través del engrosamiento del epitelio, tanto morfológica como molecularmente; por ello, si el VPH infecta dichas células pueden ocurrir diferentes secuencias de eventos (De Ruiz y Lazcano, 2005).

Tratamientos contra el cáncer.

Se utiliza varios tratamientos contra el cáncer: la cirugía, radioterapia y quimioterapia.

La cirugía es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas.

Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, se realiza otros tratamientos.

La radioterapia utiliza partículas similares a los rayos X de alta energía capaces de penetrar al cuerpo. A través de una máquina, llamada acelerador lineal, se genera y dirigen esas partículas hacia el lugar concreto donde se tengan que aplicar. Las demás zonas del cuerpo se protegen para no recibir la radiación.

Los tratamientos, como la radiación y la cirugía se consideran tratamientos locales. Estos actúan solamente en un área, como un seno, pulmón o próstata, y usualmente van dirigidos directamente al tumor. A diferencia de la cirugía o la radiación, la quimioterapia casi siempre se usa como tratamiento sistemático. Esto significa que los medicamentos viajan a través de todo el cuerpo para llegar hasta las células del cáncer. La quimioterapia actúa sobre las células que se dividen con gran rapidez, que es lo que suelen hacer las cancerosas. Pero también existen otras células, que no son cancerosas y que también se dividen de forma rápida.

Algunos medicamentos quimioterápicos actúan interrumpiendo la fase donde la célula cancerosa se divide y esto hace que el tiempo de crecimiento sea mayor y que la célula muera (Maraculla *et al*, 2009).

Los quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de CaCU son la hidroxiurea que su mecanismo de acción es la inhibición reversible de la enzima reductasa ribonucleasa e induce un bloqueo del ciclo celular a nivel G1-S. El cisplatino el cual trabaja inhibiendo la síntesis del ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN. El 5-fluorouracilo (5-FU) el cual es un antimetabolito que inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto interfiere con la síntesis del ARN y ADN. El carboplatino y el cisplatino tienen un mecanismo de muerte celular muy similar. La mitomicina C (MMC) es un agente natural con actividad antitumoral derivado de la quinona del *Streptomyces caespitosus*, es considerada como el prototipo de droga bioeductiva y es inactiva hasta se reduce por la enzima DTD. Esta reducción permite romper fragmentos de ADN inhibiendo su replicación. Epirrubicina es un análogo de las antraciclinas. Topotecan e irinotecan (CTP-11) son análogos sintéticos de la camptotecina los cuales son alcaloides citotóxicos con un blanco específico intracelular, la topoisomerasa I, una enzima nuclear que reduce el superenrollamiento del ADN durante la replicación, recombinación, transcripción y reparación del ADN, entre otros (Jiménez *et al*, 2007; Cetina *et al*, 2006).

La vacunación contra VPH podría tener gran valor en países en desarrollo, en los cuales ocurre el 80% de los nuevos casos de cáncer cervicouterino mundiales

anuales, y donde los programas de screening con Papanicolaou han sido inefectivos por largo tiempo (Serman, 2002).

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 estomago, la piel, el sistema inmune; son dañados y se desencadenan graves consecuencias en el paciente.

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

Agentes antiproliferativos.

Actualmente se ha encontrado que compuestos con aplicación para determinadas patologías no tumorales, presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis. Un ejemplo es el ácido zolodróico, un fármaco que se utiliza para el reforzamiento de huesos y que actualmente se le ha encontrado efecto apoptótico en mesotelioma (Okamoto *et al*, 2013). Otro ejemplo es el ácido acetilsalicílico además de ser un antiinflamatorio tiene actividad de prevención para el cáncer de colon (Markowitz, 2007). O el diclofenaco una droga antiinflamatoria que se le ha encontrado actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de colon (Smirnova *et al*, 2012). En la búsqueda de este tipo de fármacos se ha encontrado el Disulfiram una droga que se utiliza para el tratamiento del alcoholismo a el cual se le ha encontrado actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer, como melanoma (Cen *et al*, 2002), carcinoma pulmonar (Marikovsky *et al*, 2003) entre otros.

Disulfiram (DSF).

Los Ditiocarbamatos son una clase de metalquelante, con varias aplicaciones en medicina como, el tratamiento de infecciones por bacterias u hongos además de actuar como antioxidantes (Khan *et al*, 2007).

El Disulfiram 1-(dietiltiocarbamoildisulfanil)- N,N-dietil-metanotioamida (DSF) es un miembro de la familia de los ditiocarbamatos (Shen *et al*, 2000) que comprenden una amplia familia de moléculas que poseen un grupo funcional $R_1R_2NC(S)SR_3$ lo que le da la capacidad reaccionar con metales y formar complejos con sus grupos sulfhídrico (Li *et al*, 2008), además de ser un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa (Cho *et al*, 2007), es una de las dos drogas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del alcoholismo (Chen *et al*, 2006, Shen *et al*, 2000).

Este fármaco interfiere con el metabolismo del etanol, lo que resulta en una elevación de los niveles sanguíneos de acetaldehído y causa diversos síntomas incómodos (Kuhnlein, 1980).

El DSF ha sido propuesto como agente antitumoral basado en la capacidad de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer de colon (Guo *et al*. 2010), melanomas (Cen *et al*, 2004; Cen *et al*, 2002) y cáncer de próstata (Lin *et al*, 2010), así como el disulfiram activa a caspasa 3 en cáncer de mama (Chen *et al*, 2006), además de ser un reductor del crecimiento de células glía, carcinoma pulmonar y melanoma (Marikovsky *et al*, 2003). Asimismo ha mostrado reducir la angiogénesis e inhibir a la ADN topoisomerasa (Yakishich *et al*, 2001). También ha sido estudiado para inhibir la metástasis inhabilitando las metaloproteasas en líneas celulares de osteosarcoma (Cho *et al*, 2007), y líneas de adenocarcinoma de vejiga humana (Shiah *et al*, 2003).

El Disulfiram puede formar un complejo con el cadmio el cual inhibe el proteosoma en cáncer de próstata, llevando a las células a una muerte apoptótica (Li *et al*, 2008). El Disulfiram también se ha reportado como antioxidante por la inhibición de la formación de especies reactivas de H_2O_2 (Kuhnlein, 1980).

El Disulfiram para el caso del CaCU solo tiene dos artículos, uno de ellos utiliza a la línea celular CaSki solo para determinar la inhibición de las metaloproteasas 2 y 9 en el cual el DSF las inactiva (Cho *et al*, 2007). En el otro artículo manejan a la línea celular HeLa, en el cual, observan que el Disulfiram genera una muerte apoptótica con la activación de caspasa 3 y caspasa 7 (Wickström *et al*, 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día las terapias contra el cáncer (radioterapia, quimioterapia y cirugía), presentan efectos secundarios que no son benéficos para los pacientes. Además, el efecto antitumoral de la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de esta patología, está basado en su acción citotóxica, con nula o baja acción selectiva (afectan a todas las células en general), estos tratamientos son ineficaces en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que surge la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas. Por ello es importante valorar la actividad antiproliferativa y citotóxica de compuestos con la intención de encontrar mejores drogas terapéuticas contra el cáncer, en particular, compuestos que ya están establecidos, como el Disulfiram, con el fin de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico que presenta éste compuesto en el CaCU. Es por ello que el presente trabajo tiene como propósito evaluar si el Disulfiram presenta actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica en líneas celulares de CaCU.

JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer cérvico uterino representa la tercera causa de muerte por tumores malignos en mujeres (INEGI, 2012). Se asocia con la presencia de VPH en un 99.7% de los casos (Doorbar, 2006), donde el tipo 16 y 18 se consideran los de mayor incidencia y por tanto de alto riesgo (Lewis, 2004). Pese a los resultados obtenidos en la investigación de la biología del carcinoma de cérvix, éste ha mantenido su incidencia en la población mexicana.

Estudios recientes han generado un fuerte interés por compuestos y sus análogos o derivados a los que se les han descrito alguna actividad biológica, entre las que destacan, la actividad antitumoral, antioxidante y antibacterial entre otras. Dentro de estos compuestos se encuentran el DSF y sus metabolitos, de los cuales se tienen pocos estudios relacionados al CaCU, por lo que es necesario generar información de la actividad antitumoral de estos compuestos en células provenientes de cáncer cervicouterino y su posible selectividad respecto a células no tumorales, para el estudio de su posible aplicación clínica.

HIPÓTESIS

Se sabe que el Disulfiram posee propiedades antiproliferativas, antioxidante e inductor de apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer de mama y próstata, generando la posibilidad que el Disulfiram presente efecto antiproliferativo, antioxidante e inductor de apoptosis en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si el Disulfiram ejerce un efecto antiproliferativo, antioxidante, citotóxico e inductor de apoptosis en líneas celulares de CaCU CaSki, HeLa, ViBo y en células no tumorales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar líneas celulares de CaCU CaSki, HeLa y ViBo.
- Cultivar células linfocíticas de sangre periférica, células fibroblásticas de cérvix humano.
- Determinar la concentración en la cual el Disulfiram disminuye en un 50% (IC_{50}) la proliferación celular de las líneas celulares de CaCU.
- Determinar la actividad citotóxica del Disulfiram en líneas celulares de CaCU y células no tumorales.
- Evaluar si el DSF induce una muerte apoptótica, por la expresión de la caspasa 3 activa en las líneas celulares de CaCU CaSki, HeLa y ViBo por citometría de flujo.
- Determinar si el Disulfiram induce la generación de especies reactivas de oxígeno del tipo H_2O_2 en las líneas celulares de CaCU HeLa, CaSki y ViBo.

METODOLOGÍA

- **Cultivo de células tumorales CaSki, HeLa y ViBo.**

Células provenientes de CaCU CaSki, HeLa y ViBo, se sembraron en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) al 5 % de suero neonato de ternera (SNT) (Gibco, USA) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuaire, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío.

- **Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.**

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCU del hospital general de la zona 25 del IMSS. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) 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 5 ml de RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) 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%.

- **Preparación de Disulfiram.**

Se partió de una concentración de 1000 microgramos de Disulfiram (Sigma-Aldrich, USA) disueltos en 100 μ l de DMSO.

Para los ensayos de dosis respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 500 a 3.9 ng/ml para la obtención de una IC₅₀.

Para ello se partió de un primer stock (1000 μ g/ml) del cual se tomo 10 μ l y se llevo a un volumen de 100 μ l, el cual fue el segundo stock (100 μ g/ml) del cual se tomo 10 μ l y se llevo a un volumen de 100 μ l, el cual fue el tercer stock (10 μ g/ml) del cual se tomo 10 μ l y se llevo a un volumen de 1 ml de medio RPMI-1640 al 5 % SNT en tubos cónicos de plástico de 1.5 ml para se tuviera una concentración de 1 μ g/ml (1000 ng/ml).

Para los ensayos, la concentración utilizada fue tomada del cuarto stock 1 μ g/ml (1000 ng/ml), con cada ensayo se preparaba un nuevo stock ya que se perdía efectividad a las 24 horas.

- **Determinación de la proliferación celular a través de la técnica del colorante cristal violeta.**

Para la determinación de proliferación celular 7500 células provenientes de CaCU, fueron sembradas en cajas de plástico de 96 pozos, con 100 μ l de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) al 5 % de SNT, por 24 hrs. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adiciono el Disulfiram en RPMI fresco (5 % de SNT) a partir de una dilución seriada (concentraciones que fueron desde 500 a 3.9 ng/ml). El ensayo control contempló la cantidad de vehículo (DMSO) utilizado en la concentración máxima que fue probada. El cultivo con el compuesto se mantuvo por 24 h. más, dando un tiempo total de 48 h. La

determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta, para ello, se retiró el medio de cultivo, se dejó secar al aire. Inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA), por 15 minutos, después del tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar al aire, posteriormente se procedió a teñir las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua corriente y cuando se dejó de ver la coloración del agua se lavó con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue solubilizado en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 %, por 20 minutos en agitación, para finalmente fuera medida la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Imagen Tecan Spectra).

Para calcular las IC_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010, para la obtención de las curvas dosis respuesta, que mostraron el efecto del Disulfiram sobre la población celular. Posteriormente se realizaron ensayos puntuales con las IC_{50} calculadas.

- **Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad de LDH.**

Para determinar la citotoxicidad basado en la actividad de LDH, 7500 células provenientes de CaCU fueron sembradas en placa de 96 pozos, con medio RPMI-1640 al 5 % de SNT, por 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó nuevo con los siguientes controles: Control (células con RPMI-1640 al 5 % de SNT), Positivo (células que fueron permeadas con Tritón X-100 al 1 % una hora antes de sacar el experimento), vehículo (DMSO), para el tratamiento con DSF; se trataron las células con la concentración de la IC_{50} ; cada uno por triplicado. El cultivo se mantuvo por 24 h más, dando un tiempo total de 48 h. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm (conservando el sobrenadante), de los cuales se colectaron 50 μ l y se transfirieron a otra placa de 96 pozos, para adicionarle 50 μ l de un kit para la determinación de LDH (LDH-Cytotoxicity Assay Kit) por pozo y este fue incubado por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para que finalmente fuera

medida la absorbancia a 490 nm usando un espectrofotómetro (Imagen Tecan Spectra).

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados por el programa Microsoft Office Excel 2010. Obteniendo gráficos, que mostraron el efecto citotóxico del compuesto sobre la población celular. Los datos son presentados como valores relativos al control positivo, el cual se considera como el 100 %.

- **Proliferación de linfocitos humanos con Carboxifluoresceína (CSFE).**

En tubos vacutainer con EDTA, se colectó 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), que contenían 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, 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 dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1 ml 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 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml 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 de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, e incubaron durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron 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 5 ml 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 marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 µl de carboxifluoresceína (12 µM por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.5 ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml, a una densidad de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 µl/ml de fitohemaglutinina (Micro-Lab S. A., Méx). Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500 µl de PBS dos veces por separado, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FASCSDiva versión 6.1.2.

- **Determinación de la integridad de la membrana celular por la incorporación de Ioduro de Propidio (IP) por citometría de flujo.**

Se sembraron 30 000 células por pozo provenientes de CaCU en placas de cultivo de plástico de 48 pozos (Corning, USA), con 500 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) al 5 % de suero neonato de ternera (SNT) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera a punto de rocío.

Para la determinación de la incorporación de ioduro de propidio se contó con los siguientes controles: negativo, positivo, control; en los cuales a las células se mantuvieron en condiciones de cultivo; DMSO a las células se le trató con la mayor concentración de DMSO utilizada en el tratamiento con DSF; para el

tratamiento con DSF; se trataron las células con la concentración de la IC₅₀. Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron cosechadas y colectadas en tubos para citómetro. Para control positivo, las células se permearon con 500 µl de etanol al 70 %. Posteriormente será agregado a cada muestra 1 ml de RPMI-1640 suplementado al 5 % de SFB. Un minuto antes de leer la muestra en citómetro (marca FACSAria II) se le colocó a cada muestra 3 µl de IP (J.T. Baker, MEX) a cada muestra exceptuando al control negativo.

- **Determinación de muerte apoptótica por la expresión de caspasa-3-activa en las líneas tumorales por citometría de flujo.**

Se sembraron 30 000 células por pozo en placas de cultivo de plástico de 48 pozos procedentes de líneas de CaCU en las condiciones antes descritas. Para el tratamiento con DSF; se trataron las células con la concentración de la IC₅₀ se incubaron por 24 horas. A continuación, se realizó la detección de la caspasa-3 por citometría de flujo; para esto, las células fueron cosechadas y fijadas con etanol al 70% por 5 min en el refrigerador a 4 °C, al término del tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 2 veces con PBS. Sucesivamente se adicionó el anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana, 1:250 en PBS y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C, 1:500 (J.T. Baker, MEX) en PBS y se dejó incubar en la oscuridad durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas las muestras 3 veces con PBS y llevadas a un volumen de 500 µl por muestra. Finalmente el botón celular fue resuspendido para leer en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

- **Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por citometría de flujo.**

Se sembraron 30 000 células por pozo provenientes de CaCU en placas de cultivo de plástico de 48 pozos (Corning, USA), con 500 µl de medio RPMI-1640

(Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grunenthal, MEX) al 5 % de suero neonato de ternera (SNT) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera a saturación húmeda.

Para la determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno se contó con los siguientes controles: negativo, positivo, control y DMSO; en los cuales a las células se mantuvieron en condiciones de cultivo; para DMSO las células se les trataron con la mayor concentración de DMSO utilizada; para el tratamiento con DSF; a las células se les trataron con la concentración de la IC₅₀ a diferentes tiempos (½, 1, 2, 3, 4 y 5 horas), las células fueron cosechadas y lavadas con PBS complementado al 5 % de SFB, recuperadas por condición en tubos para citómetro y fue completado a un volumen de 1 ml. Posteriormente se le agregó 1 µl del reactivo DCF (2 µM) (2´7´ diclorofluoresceína diacetato) (Sigma-Aldrich, USA) disuelto en etanol y se dejó incubar por 30 min exceptuando al control negativo al cual solo se le agregó PBS con SFB al 5 % . Después del tiempo requerido, al control positivo se le agregó 102 µl de H₂O₂ al 30% y se dejó incubar por 10 min.

- **Análisis estadístico.**

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa GraphPad InStat 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

A continuación se presentan los resultados obtenidos del DSF sobre líneas tumorales de CaCU, así como el efecto del DSF en células no tumorales.

Actividad antiproliferativa del DSF en células CaSki, HeLa y ViBo.

Con la finalidad de evaluar si el DSF tiene un efecto antiproliferativo en líneas celulares de CaCU así como determinar la concentración requerida del compuesto para que induzca un decremento del 50% del número celular, cultivos de células de CaCU CaSki, HeLa y ViBo fueron tratados con diferentes concentraciones de DSF.

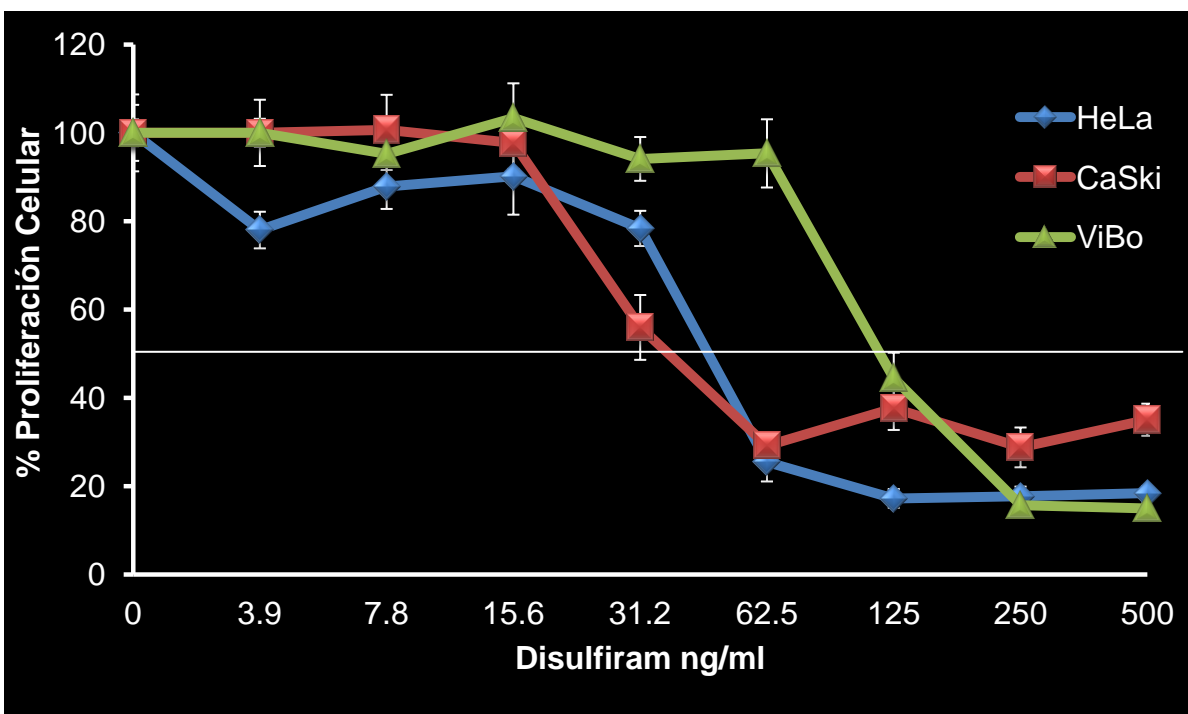


Fig. 1 Efecto del DSF sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. 7500 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de DSF por 24 horas, posteriormente el número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos en la Figura 1 sugieren que el efecto antiproliferativo del DSF es dependiente de la dosis, para calcular la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}) de se

realizó una linealización de la recta y la ecuación de la recta obteniendo una IC_{50} de 67.5 ng/ml para CaSki, 69.5 ng/ml para HeLa y de 80 ng/ml para ViBo.

Confirmación de las IC_{50} en las líneas celulares de CaCU.

Para la confirmación de las IC_{50} , las tres líneas fueron tratadas con las concentraciones de IC_{50} calculadas para cada línea celular (Fig.2).

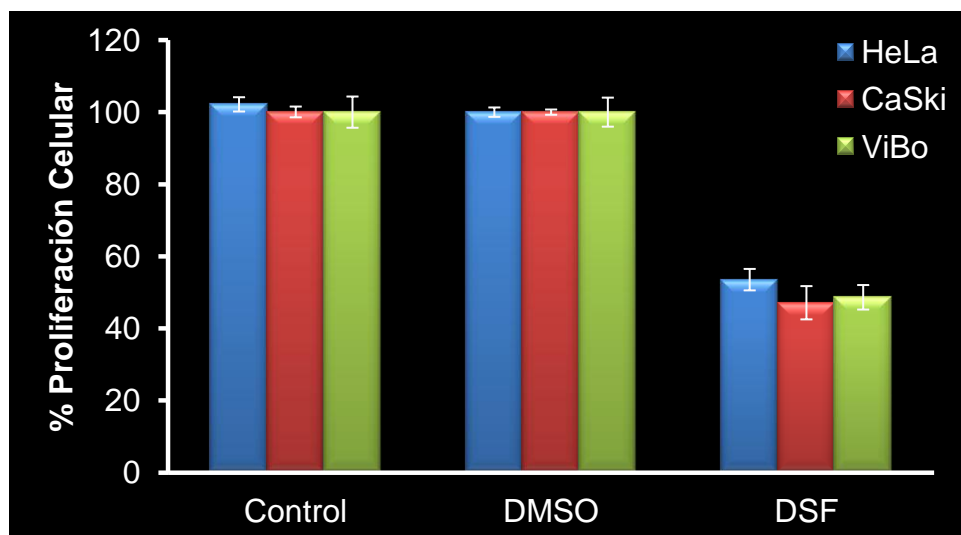


Fig. 2. Efecto de las IC_{50} del DSF sobre las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. 7500 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con la concentración de IC_{50} de DSF de cada línea celular por 24 horas. La proliferación celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. La gráfica es representativa de por lo menos seis experimentos con tres repeticiones cada uno.

Los resultados obtenidos en la Figura 2 confirman las IC_{50} calculadas del DSF para las tres líneas tumorales induciendo un efecto antiproliferativo del 50 %.

Actividad Citotóxica del DSF en células CaSki, HeLa y ViBo.

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica. Con el propósito de determinar si el Disulfiram presenta una actividad citotóxica (necrótica) sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de su IC_{50} y la actividad citotóxica

(necrótica) fue evaluada mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos de las células estimuladas (Fig. 3 y Tabla1).

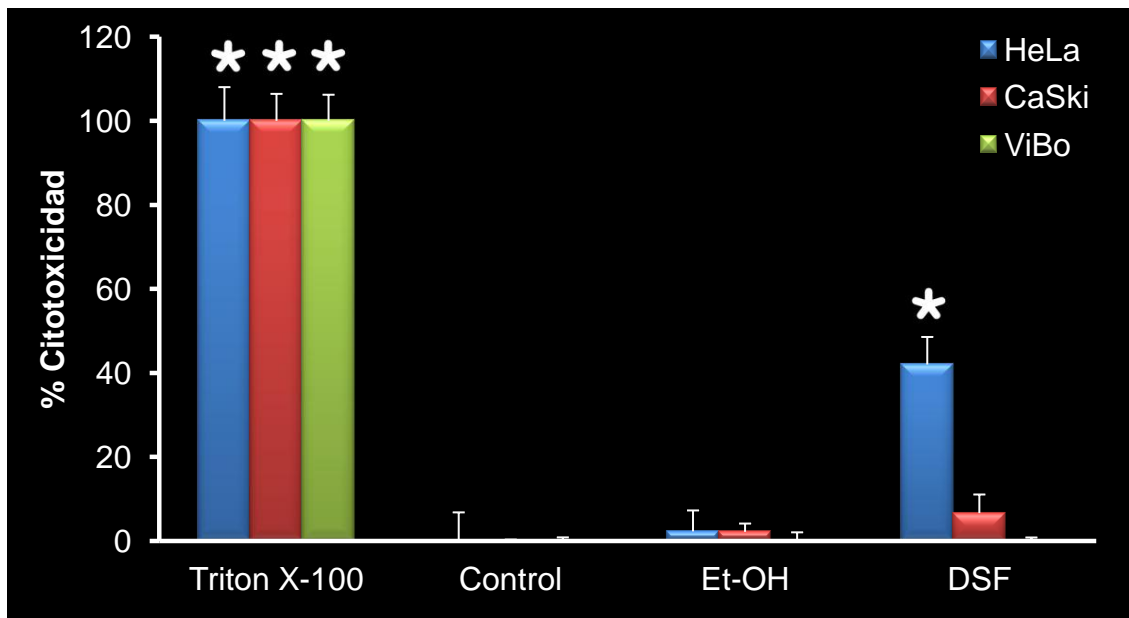


Fig. 3 Efecto citotóxico del Disulfiram sobre las líneas de CaCU, HeLa, CaSki y ViBo. Cultivos de líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo fueron sembradas en placa de 96 pozos y estimuladas con las concentraciones de IC₅₀ respectiva de cada línea. El efecto citotóxico fue evaluado por la actividad de la LDH. (*.p<0.05 vs Et-OH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey). La gráfica es representativa de por lo menos dos experimentos con tres repeticiones cada uno.

% citotoxicidad (liberación LDH al medio)	
Línea celular	DSF
HeLa	39.72
CaSki	4.45
ViBo	0

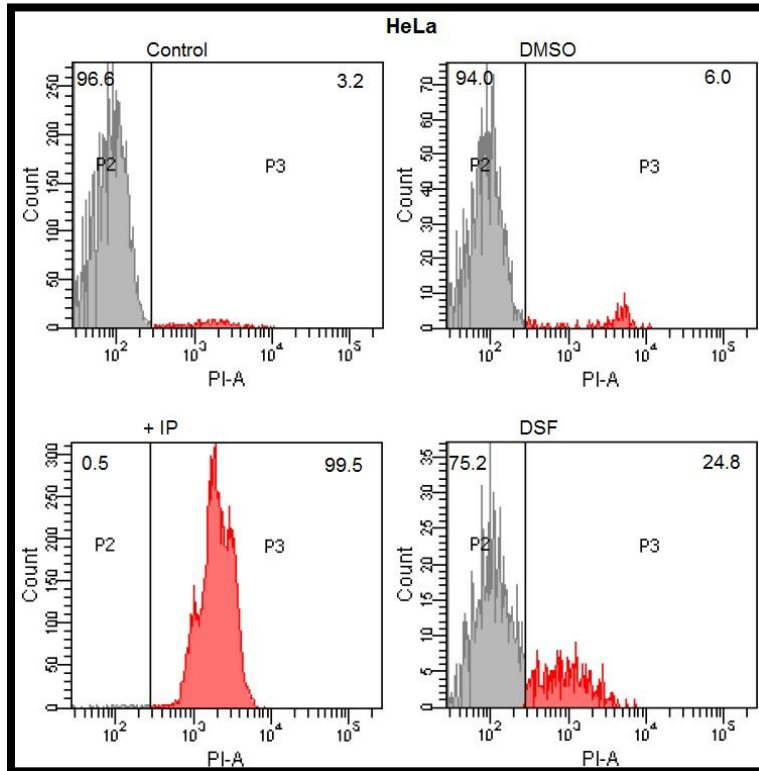
Los resultados mostrados son restando el Et-OH.

Tabla 1: Determinación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de células tumorales tratadas con el DSF.

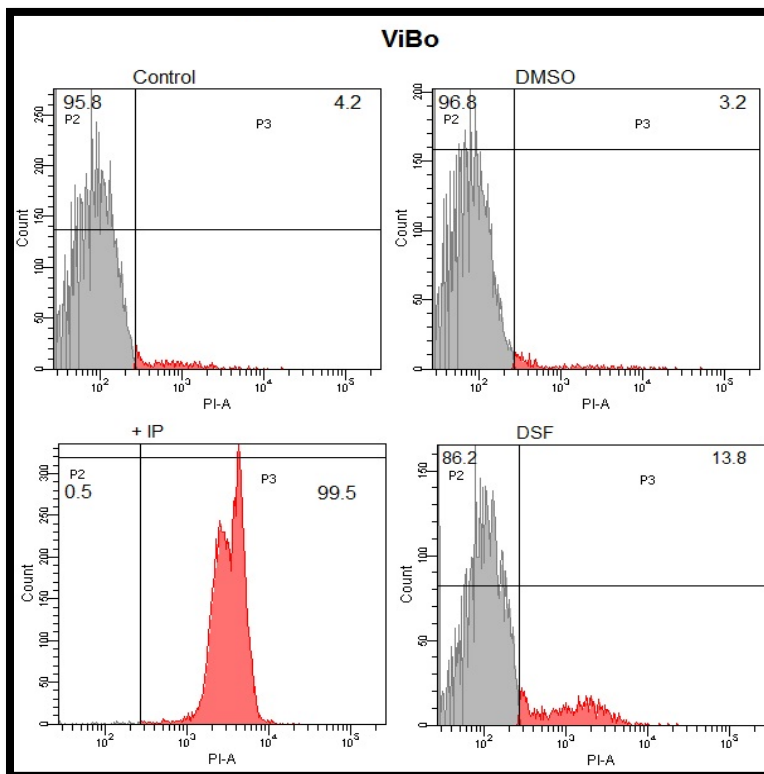
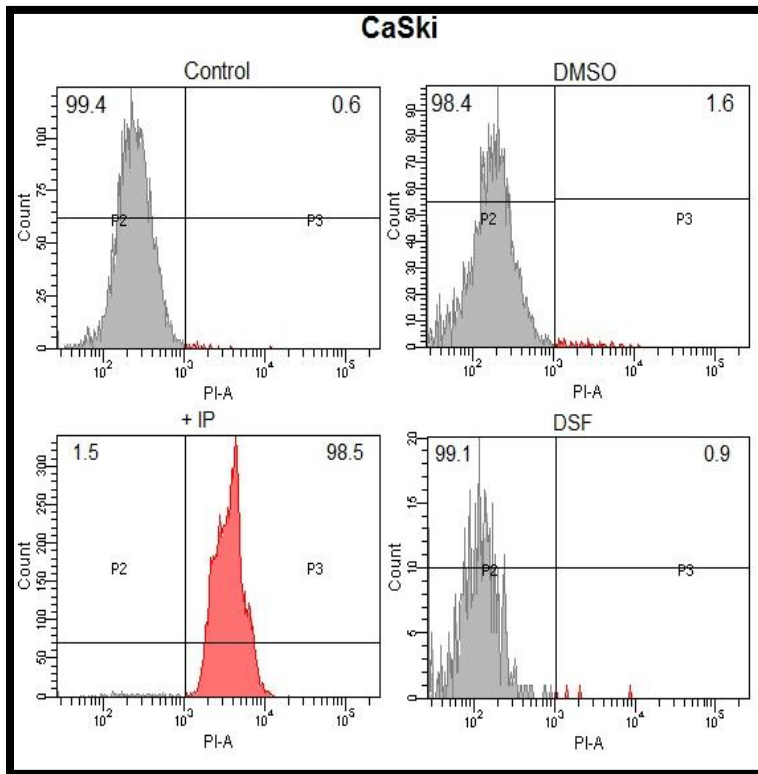
Los resultados obtenidos en la figura 3 y tabla 1, indican que el DSF induce a las células HeLa a una muerte necrótica, mientras que en las células CaSki la

inducción a este tipo de muerte no es significativa y en ViBo el DSF no induce este tipo de muerte.

Con la intención de confirmar la actividad citotóxica (necrótica) presente en el Disulfiram, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el DSF y la integridad de la membrana celular fue evaluada mediante la incorporación del Ioduro de Propidio (IP), cuantificado por Citometría de flujo (Fig.4, Tabla 2).



Continúa.....



Continúa.....

Fig. 4 Efecto citotóxico del Disulfiram sobre líneas de CaCU. Cultivos de líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo fueron sembradas en placa de 48 pozos y estimuladas con las concentraciones de IC₅₀ respectivas de cada línea y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la incorporación de Ioduro de propidio y cuantificado por citometría de flujo.

% de Ioduro de Propidio incorporado	
Línea Celular	DSF
HeLa	18.8
CaSki	0
ViBo	10.6

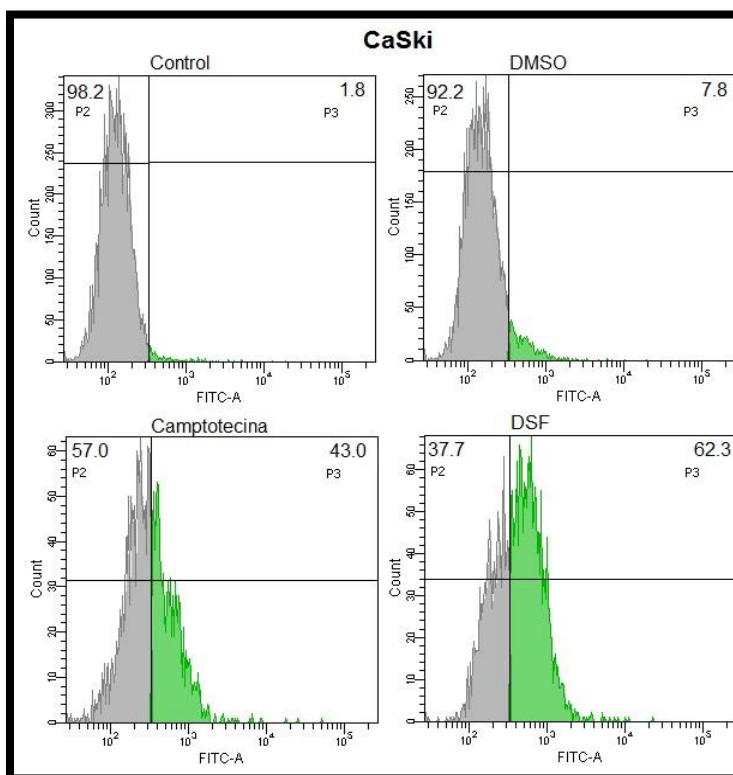
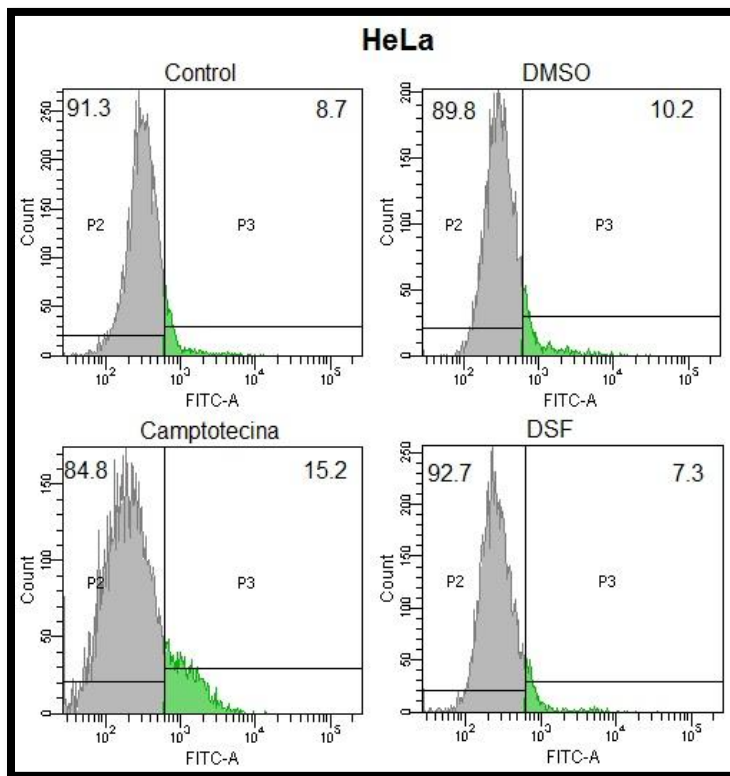
Los resultados mostrados son restando el DMSO.

Tabla 2: Determinación de la incorporación de IP en células tumorales tratadas con el DSF.

Los resultados obtenidos en la figura 4, tabla 2, confirman que el DSF promueve la incorporación del IP a las células HeLa, induciéndolas a una muerte necrótica, en ViBo la inducción a este tipo de muerte es leve, mientras que en las células CaSki no generan una inducción de este tipo de muerte.

Efecto apoptótico.

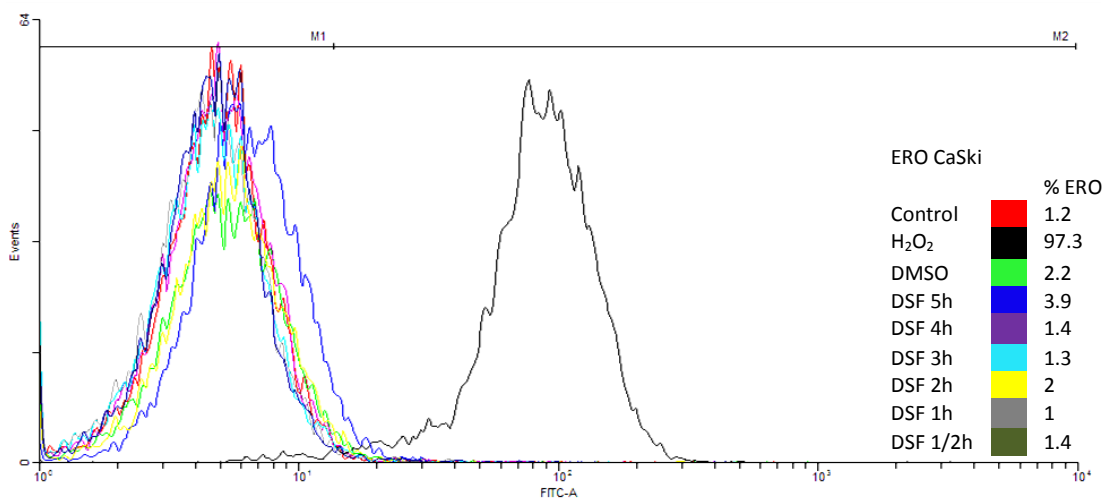
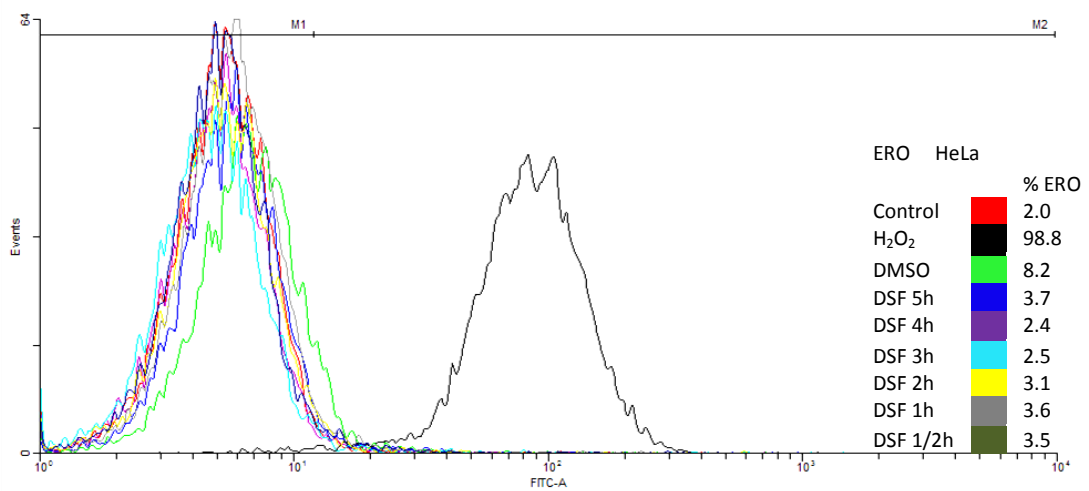
Con el propósito de establecer si el DSF es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las IC₅₀ calculadas para cada línea y la detección de la caspasa 3 activa fue evaluada por citometría de flujo (Fig. 5, Tabla 3).



Continúa.....

Estrés oxidativo.

Se sabe que un estrés oxidativo puede generar tanto la necrosis como la apoptosis. Con el propósito de determinar si la muerte celular generada por el Disulfiram induce un estrés oxidativo en las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, éstas fueron sembradas y tratadas con las IC_{50} obtenidas para cada línea y la generación de ERO provenientes de H_2O_2 fueron cuantificadas por citometría de flujo.



Continúa.....

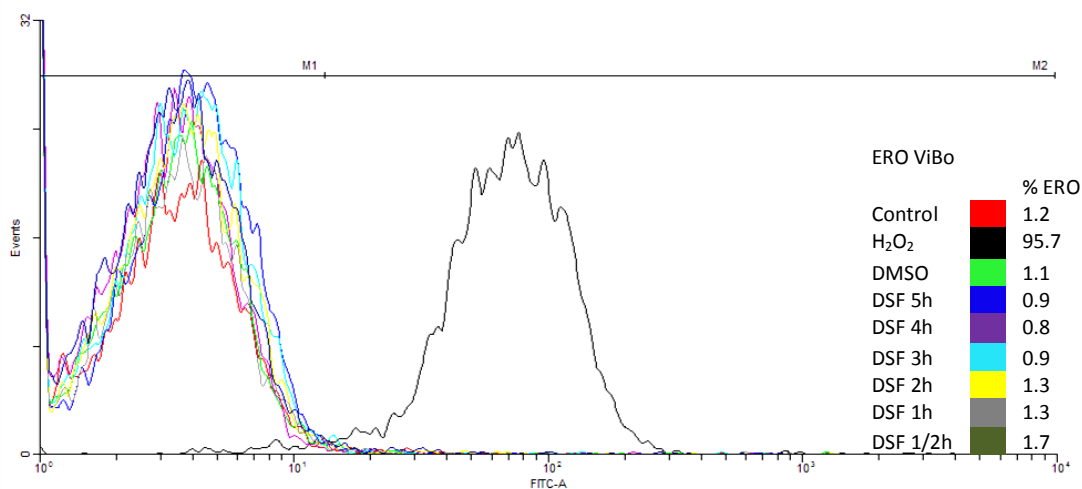


Fig. 6 Estrés oxidativo en líneas celulares inducido por el Disulfiram. Las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas en base al tiempo de 5 horas a media hora con las IC₅₀ obtenidas. Datos obtenidos con el citómetro de flujo marca FACSAria II y translocados con el programa WinMDI versión 2.8 para Windows. Los histogramas representan un experimento representativo de dos ensayos independientes.

Como se puede apreciar en la Figura 6, las células de las líneas tumorales que fueron tratadas con el Disulfiram, no generaron ERO del tipo H₂O₂, sugiriendo que la actividad necrótica y apoptótica presente en el DSF no es causada por este tipo de especies reactivas.

Efecto antiproliferativo del Disulfiram en células no tumorales.

Los datos obtenidos muestran que el Disulfiram ejerce una actividad antiproliferativa en las diferentes líneas celulares de CaCU, para determinar si el compuesto tiene una acción selectiva, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con el DSF y la proliferación y la actividad de la LDH fueron evaluados.

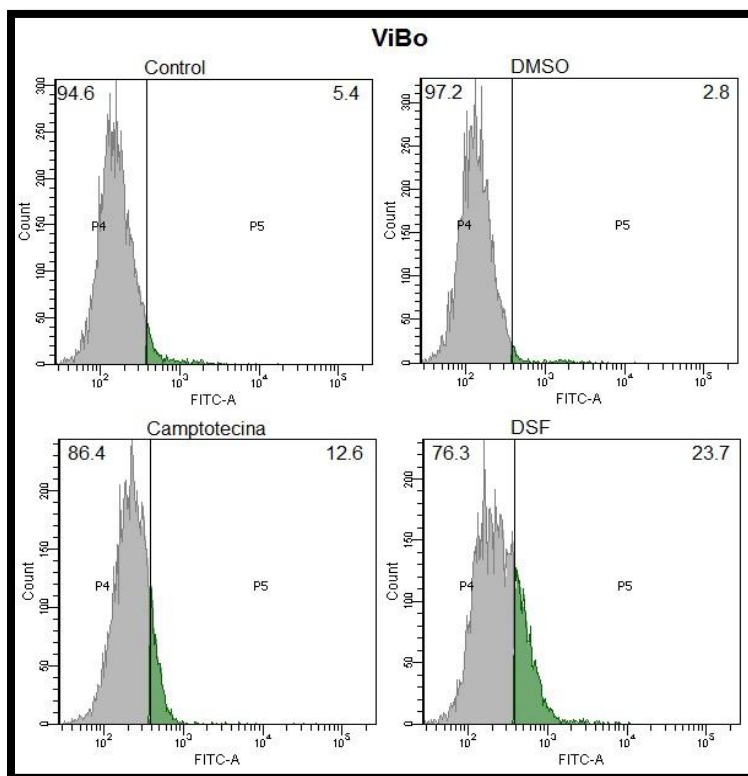


Fig. 5. Efecto del DSF en la expresión de la caspasa 3 activa en células tumorales estimuladas con Disulfiram. Las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con las IC_{50} obtenidas. Los histogramas representan un experimento de un mínimo de dos ensayos independientes.

Activación de Caspasa 3 en Células Tumorales	
Línea Celular	Disulfiram
HeLa	0
CaSki	54.5
ViBo	20.9

Los resultados mostrados son restando el DMSO.

Tabla 3: Determinación de la activación de caspasa 3 en células tumorales tratadas con el DSF.

Los resultados obtenidos en la Figura 5 y tabla 3, se aprecia que las células CaSki y ViBo, expresan la caspasa 3 activa, sugiriendo que el Disulfiram induce la expresión de esta caspasa como parte de su mecanismo para inducir muerte apoptótica, el DSF no induce a esta línea tumoral a expresar la caspasa 3 activa.

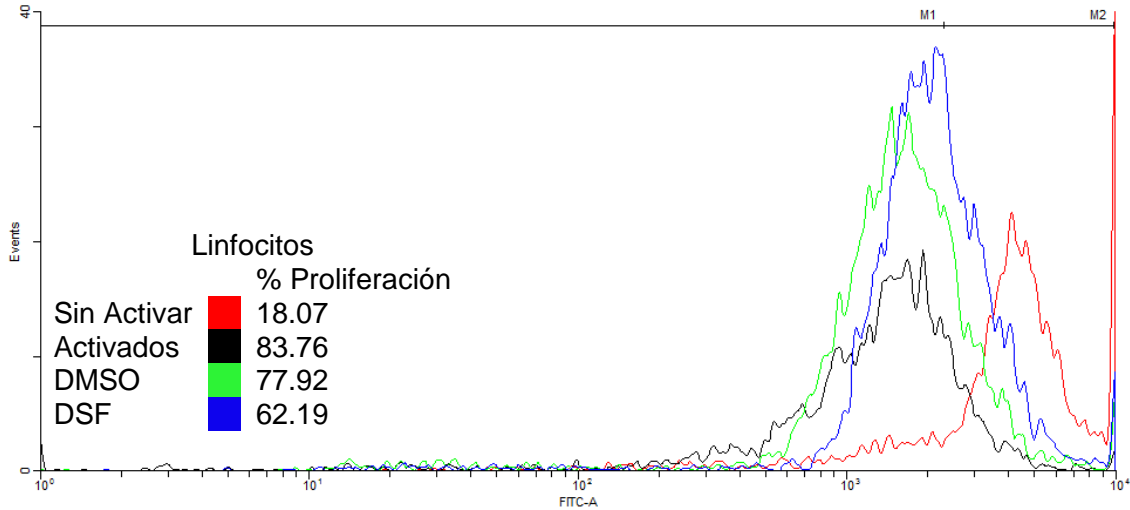


Fig. 7 Efecto del DSF en el potencial proliferativo de cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica. Cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica fueron sembrados en placa de 96 pozos y estimulada con 70 ng/ml de DSF. Datos obtenidos con el citrometro de flujo marca FACSAria II y translocados con el programa WinMDI versión 2.8 para Windows

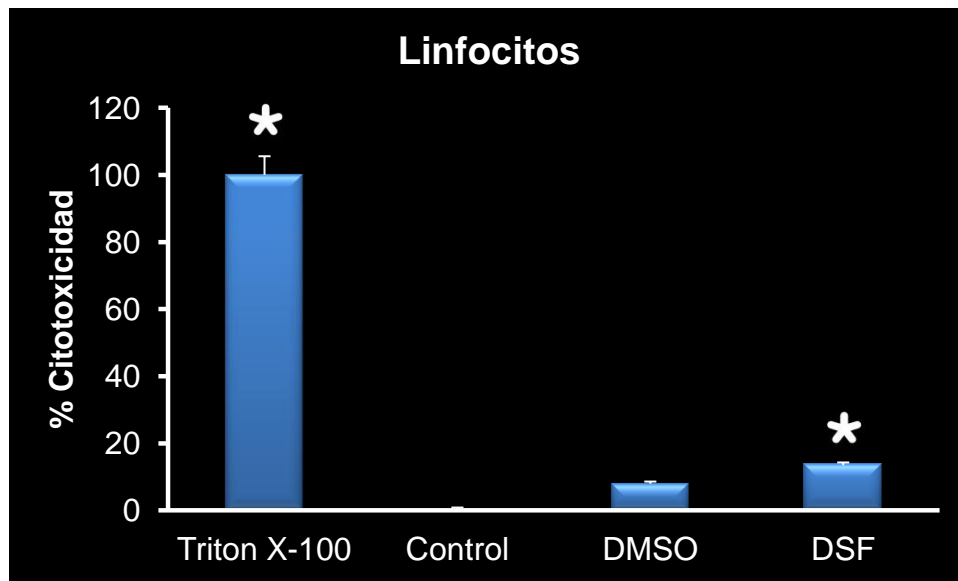


Fig. 8 Efecto citotóxico del Disulfiram sobre cultivos de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron sembrados en placa de 96 pozos y estimuladas con la concentración de 70 ng/ml de DSF. Posteriormente el efecto citotóxico fue evaluado mediante el kit de detección de LDH. (*.p<0.05 vs DMSO, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey). La gráfica es representativa de dos experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Efecto del DSF sobre la proliferación y citotoxicidad en linfocitos humanos de sangre periférica		
Línea celular	% Decremento proliferación Celular	% liberación LDH
Linfocitos humanos	15.73	5.45
Los resultados mostrados son restando el DMSO.		

Tabla 4: Determinación el efecto del DSF en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica en su potencial proliferativo; así como determinación del efecto citotóxico del DSF en linfocitos humanos.

Los resultados mostrados en la figura 7 y 8 indican que el DSF afecta en un 15.73 % el potencial proliferativo de células linfocíticas, induciendo una muerte necrótica del 5.45 %.

Con el fin de concluir si el DSF presenta una acción selectiva, cultivos de células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, fueron tratadas con 80 ng/ml de DSF y el número celular fue determinado por la técnica de cristal violeta (Fig. 9).

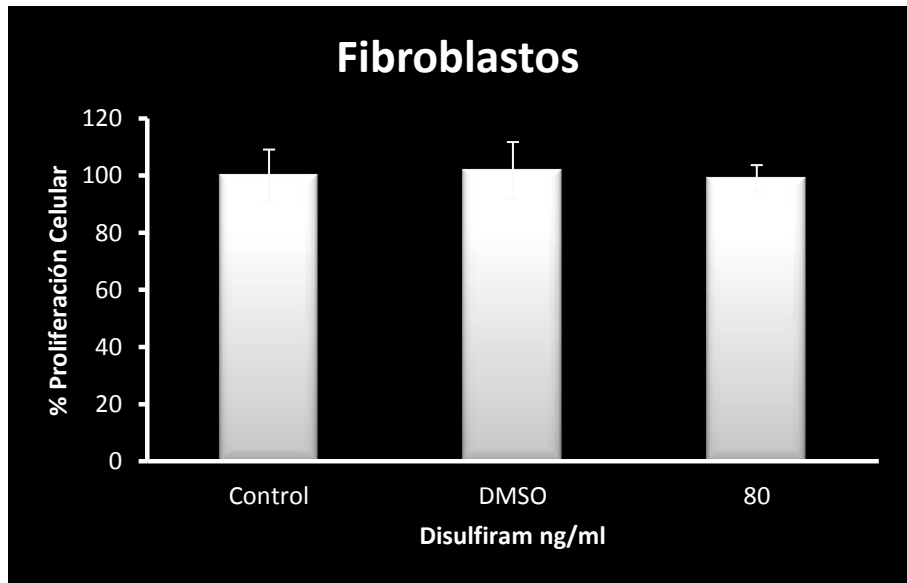


Fig. 9. Efecto del Disulfiram sobre el porcentaje del número celular de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano. 7,500 células fibroblásticas fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI-164 al 10% de SFB y fueron tratadas con una concentración de 80 ng/ml de Disulfiram, por 56 hrs. La densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta.

Como se puede apreciar en la figura 9, el Disulfiram no afecta el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, indicando que el DSF presenta una actividad antiproliferativa, con acción selectiva entre células tumorales y células fibroblásticas cervicales.

DISCUSIÓN.

Se ha reportado que el Disulfiram cuenta con propiedades antiproliferativas en diversas líneas celulares a diferentes concentraciones, como en la línea comercial de melanoma humana A-375, con una IC_{50} de 168 nM (Cen *et al*, 2002), o la línea tumoral de próstata DU-145 con una IC_{50} de 26 nM (Lin *et al*, 2010), entre otras. Con respecto a las líneas celulares de cáncer cervicouterino, nuestros resultados establecen que la actividad antiproliferativa del DSF actúa de manera similar a lo descrito en otras líneas tumorales. Sin embargo, cabe resaltar que las IC_{50} obtenidas para las líneas celulares de CaCU mostraron ser muy similares (234 nM (69.5 ng/ml), 227 nM (67.5 ng/ml) y 269 nM (80 ng/ml) para HeLa, CaSki y ViBo respectivamente), indicando que estas células presentan sensibilidad al DSF, no así para las células de mama que son más resistentes al DSF cuyo rango de IC_{50} está entre 110 a 476 nM (Yip *et al*, 2011).

Con respecto a la actividad citotóxica del DSF, se ha descrito que el Disulfiram presenta citotoxicidad, provocando a las células a una muerte necrótica (Cen *et al*, 2002). En algunos trabajos se reportan la inducción de muerte necrótica líneas celulares de cáncer de melanoma humana (Cen *et al*, 2002), mientras que en otros el DSF induce apoptosis, como se describe en algunas líneas celulares de cáncer de próstata (Lin *et al*, 2010). Con respecto al cáncer de cérvix, nuestros resultados sugieren que el DSF induce una muerte necrótica en la línea celular HeLa, mientras que en las células CaSki y ViBo primordialmente el DSF induce una muerte apoptótica. No obstante estos resultados, Wickström en 2007 reportó que el Disulfiram genera una activación de caspasa 3 y 7 en células HeLa, con una concentración de 400 nM (Wickström *et al*, 2007), lo cual es relativamente contradictorio con el resultado obtenido para la línea celular HeLa, e indica que la respuesta al DSF en esta línea celular no es claro o que la inducción de la apoptosis y/o necrosis podría ser dependiente de la dosis.

En cuanto a la muerte por apoptosis, el Disulfiram ha sido descrito con capacidad de inducir apoptosis en diferentes células cancerígenas; como en líneas celulares provenientes de leucemia mieloide humana (Navrátilová *et al*, 2009), o en líneas

celulares de melanoma humano en la cual con la administración de Disulfiram hay un decremento en su número celular y una translocación de la fosfatidilserina en la membrana celular, con lo cual se concluye una muerte apoptótica (Cen *et al*, 2004). Con respecto a las células de CaCU, al igual que lo descrito en otras líneas tumorales, nuestros resultados indican que el DSF induce muerte por apoptosis en las células tumorales, con la participación de la caspasa 3. Sin embargo, el hecho de que nuestros resultados mostraran que el DSF induce a las células HeLa a una muerte necrótica, implica que el DSF podría inducir a las células tumorales a una muerte necrótica o a una muerte apoptótica esto podría deberse a la sensibilidad de la línea celular. Por otro lado, el mecanismo de acción del DSF aún no está claro, sin embargo su actividad antiproliferativa y apoptótica se ha relacionado con la Inhibición del factor de transcripción NFκB en líneas celulares de cáncer de mama resistentes al quimioterapéutico Gemcitabina (Guo *et al*, 2010). Estos datos sugieren que el Disulfiram tiene múltiples tipos de acción en la célula para poder generar una muerte celular. Además, es conocido que la muerte celular está relacionada con la inducción de estrés oxidativo, generando la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Al respecto, nuestros resultados mostraron que el DSF no indujo a las células a generar especies reactivas provenientes de H₂O₂, indicando que la muerte celular inducida por el DSF en las células tumorales de CaCU no es debida a las especies reactivas provenientes de H₂O₂. Sin embargo, en líneas celulares de glioblastoma agregando una mezcla Disulfiram/cobre generan un aumento de producción de ERO en las células (Liu *et al*, 2012), del mismo modo actúan en líneas celulares de cáncer de mama (Yip *et al*, 2011).

No obstante estos resultados, se ha descrito que el DSF genera una muerte celular en células de melanoma metastásico por un aumento del ion superóxido (Cen *et al*, 2002), sugiriendo que la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del DSF es debida a la generación de radicales libres provenientes del ion superóxido, además que en estas mismas líneas de melanoma el Disulfiram neutraliza el H₂O₂ generado por las mismas células. Ha habido una larga historia de búsqueda de fármacos que induzcan la formación de radicales libres para

luchar contra el cáncer con poco éxito. Una de las razones principales es que, además de la activación de las vías pro-apoptóticas, la generación de radicales libres también desencadena la expresión de proteínas antiapoptóticas como NF- κ B, que neutralizan los efectos proapoptóticos de ERO (Glorie *et al*, 2006).

Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados sobre el efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Disulfiram, se han realizado en líneas celulares establecidas o provenientes de tumores extirpados de pacientes con esta enfermedad, y únicamente existen dos trabajos en células melanocíticas no tumorales, en los cuales, el Disulfiram no induce muerte celular (Cen *et al*, 2004; Cen *et al*, 2002). Por ello, para poder determinar si algún compuesto tiene o no acción selectiva se necesita hacer pruebas con células no tumorales y determinar si el compuesto genera un daño celular en dichas células, en el caso del Disulfiram, el efecto antiproliferativo fue comparado en células fibroblásticas provenientes de cérvix humano y en linfocitos de sangre periférica humana, demostrando que a una concentración de 80 ng/ml, el DSF no afectó el potencial proliferativo de estas células en un tiempo de 56 h. En contraparte, mientras que en un lapso de 24 h el DSF abate en un 50 % el número celular en los cultivos de células tumorales, a una concentración de 70 ng/ml el DSF solo abate un 15.73 % la proliferación de linfocitos en un tiempo de 72 h, mostrando que las células linfocíticas son menos sensibles a la actividad antiproliferativa del DSF, tanto en concentración así como en el tiempo.

Sin embargo se ha demostrado que el DSF al ser ingerido es rápidamente metabolizado y convertido en diversos metabolitos, los cuales, se ha reportado que son los responsables de la actividad del DSF (Lipsky *et al*, 2001). Sin embargo al ser evaluado el Disulfiram junto con uno de sus metabolitos principales el DDC, en líneas celulares de melanoma humana metastásica (Cen *et al*, 2002), se reporta que el Disulfiram tiene una actividad antiproliferativa mayor en esta línea que su metabolito lo que sugiere que aunque el Disulfiram sea metabolizado dentro del organismo, este es necesario para obtener su máxima actividad.

Dado los resultados obtenidos, es conveniente determinar los mecanismos moleculares que se dan en la muerte celular generada por el Disulfiram, así como, determinar el efecto del mismo en más líneas celulares de cáncer cervicouterino infectadas con VPH 16 y 18. Además sería conveniente evaluar el efecto del compuesto sobre células epiteliales no tumorales de cérvix así como evaluar su efecto en modelos *in vivo*.

CONCLUSIONES.

- El Disulfiram reduce la proliferación celular en un 50% en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo con una concentración de 69.5 ng/ml, 67.5 ng/ml y 80 ng/ml respectivamente para cada línea celular.
- El Disulfiram induce una liberación de LDH en células HeLa, CaSki de 34.51 %, 4.45 % respectivamente, además de que no induce la liberación de la LDH en la línea ViBo.
- El Disulfiram induce la pérdida de la integridad de membrana celular en HeLa y ViBo, asimismo no induce una pérdida de la integridad de membrana celular en CaSki.
- El Disulfiram induce activación de caspasa 3 en las células, CaSki y ViBo, además de que no induce la activación de la caspasa 3 en las células HeLa.
- El Disulfiram no generan la producción de especies reactivas de oxígeno en líneas celulares de CaCU.
- El compuesto disminuye en un 15.73 % el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica.
- El Disulfiram induce muerte por necrosis en cultivos de linfocitos humanos en un 5.45 %.
- El Disulfiram no afecta el potencial proliferativo de células no tumorales de cérvix.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Raberts K. & Watson J. 2002. Biología molecular de la célula. Omega. Barcelona. p 926.
2. Alison M. 2001. Cáncer. Encyclopedia of Life Sciences. *Nature Publishing Group*. Imperial College School of Medicine. Londres, Reino Unido.
3. Anaya J. M., Shoenfeld Y., Correa P. A., García-Carrasco M., Cervera R. 2005. Autoinmunidad enfermedad autoinmune. Corporación Para Investigaciones Biológicas. Medellín. p 533.
4. Bernhardi M. R. 2004. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. 42(2): 281-292
5. Burd E. M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(1): 1-17.
6. Burgués G. J. P., Pontones M. J. L., Vera D. C. D., Jiménez C. J. F., Ozonas M. M. 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 (9): 846-859
7. Campbell M., Farrell S. 2004. Bioquímica. Thomson. México. p 272.
8. Cascales A. M. 2003. Bases Moleculares de la Apoptosis. Real Academia Nacional de Farmacia. 69 (1): 36-64.
9. Cen D., Brayton D., Shahandeh B., Meyskens F., Farmer P. 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *Medicinal Chemistry*. 47: 6914-6920.
10. Cen D., Gonzalez R. I., Buckmeier J. A., Kahlon R. S., Tohidian N. B., Meyskens F. L. 2002. Disulfiram Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells: A Redox-related Process. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1: 197-204.
11. Cetina L., Wegman T., García-Arias A., Candelaria M., Dueñas-González A. 2006. Raiosensibilizantes en cáncer cervicouterino. *Cancerología*. 1: 4-29.
12. Chen D., Cindy C. Q., Yang H., Ping D. Q. 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer research*. 66(21): 10425-10433.

13. Cho H., Lee T., Park J., Park K., Choe J., Sin D., Park Y., Moon Y., Lee K., Yoe J., Han S., Cho Y., Choi M., Park N., Lee Y., Chang Y. 2007. Disulfiram Suppresses Invasive Ability of Osteosarcoma Cells Via the Inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *Biochemistry and Molecular Biology*. 40(6): 1069-176.
14. Conde de la rosa L., Moshage H., Nieto N. 2008. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Revista española de enfermedades digestivas*. 100(3):156-163.
15. Cooper G. M. 2002. La célula. Marbán. Madrid. p 685.
16. De Ruiz A. y Lazcano E. 2005. Cáncer Cérvicouterino: Diagnostico, Prevención Y Control. Medica Panamericana. México D.F. p 386.
17. Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *The biochemical Society*, 110: 525-541.
18. Elinos-Báez C. M., Maldonado V., Meléndez-Zajgla J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Medica de México*. 139(1): 492-500.
19. García R. R., Ayala R. P., Acosta V. N. 2009. Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. *Revista Ciencias de la salud*. 7(1): 83-94.
20. Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. 2006. NK-kappaB activation by reactive oxygen species:fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 72: 1493-1505.
21. González-Merlo J., González B. J. 2000. Ginecología Oncológica. Masson. Barcelona. p 65.
22. Grillo-Ardila C. F., Martinez-Velasquez M. Y., Morales-López B. 2008. Virus del Papiloma Humano: Aspectos Moleculares y Cáncer de Cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 59(4): 310-315.
23. Guerrero I., Rodríguez W., Amorín E., Mejía R., Chang A. 2003. Oncoproteínas virales, apoptosis y proliferación celular en la carcinogénesis de pulmón: E6-E7, p53, BCL-2, BAX y PCNA. *Acta cancerológica*. 32(1): 22-27
24. Guo X., Xu B., Pandey S., Goessl E., Brown J., Armesilla A., Darling J., Wang W., 2010. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Letters*. 290 (2010): 104-113.
25. Guo Y., Srinivasula S. M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E. S. 2002. Caspase-2 Induces Apoptosis by Apoptosis Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(16): 13430-13437.

26. Iannolo G., Conticello C., Memeo L., De Maria R. 2007. Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 66(2008): 42-51.
27. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2008). Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer: datos nacionales. México DF. Consultada el 26 de julio del 2012.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2825&ep=82>
28. Jiménez F. C., Martínez R. V., Gutiérrez V. M. 2007. Tratamiento nutricional en pacientes con cáncer cervicouterino. *Cancerologia*. 2: 327-336.
29. Khan S., Smita S., Mathur T., Upadhyay D., Rattan A. 2007. Antifungal Potential of Disulfiram. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 48: 109-113.
30. Kolber M. A., Broschat K. O., Landa-Gonzalez B. 1990. Cytochalasin B induces Cellular DNA fragmentation. *The FASEB journal*. 4: 3021-3027.
31. Kuhnlein U. 1980. Disulfiram inhibits DNA breakage by hydroxyl radical-producing agents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 609 (1980): 75-83.
32. Kumar V., Abbas A., Fausto N. 2005. Patología estructural y funcional. Elsevier. Madrid. p 1451.
33. Lehninger A. L. 2005. Principios básicos de bioquímica. Omega. Barcelona. p 1007.
34. Lewis M. 2004. Análisis de la Situación del cáncer cérvico-Uterino en América Latina y el Caribe. Washington, Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud.
35. Li L., Yang H., Chen D., Cui C., Ping D. Q. 2008. Disulfiram promotes the conversion of carcinogenic cadmium to a proteasome inhibitor with pro-apoptotic activity in human cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 229: 206-214.
36. Lin J., Haffner M., Zhang Y., Lee B., Brennen W., Britton J., Kachhap S., Shim J., Liu J., Nelson W., Yegnasubramanian S., Carducci M. 2010. Disulfiram is a DNA Demethylating Agent and Inhibits Prostate Cancer Cell Growth. *The Prostate*. 71 (2011): 333-343.
37. Lipsky J., Shen M., Naylor S. 2001. In vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by Disulfiram and metabolites. *Chemico-Biological Interactions*. 130: 81-91.
38. Lodish H. 2005. Biología Celular y Molecular. Medica Panamericana. Buenos Aires. p 1088.

39. López S., Lizano S. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-56.
40. Lui P., Brown S., Goktug T., Channathodiyil P., Kannappan V., Hugnot J-P., Guichet P-O., Bian X., Armesilla AL., Darling J., Wang W. 2012 Cytotoxic effect of Disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British Journal of Cancer*. 107: 1488-1497.
41. Macarulla M., Ramos F., Taberno J. 2009. Comprender el cáncer. AMAT. Barcelona. p 118.
42. Marikovsky M., Ziv V., Nevo N., Harris-Cerruti C., Mahler O. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J Immunol*. 170(6): 2993-3001.
43. Markowitz S. 2007. Aspirin and colon Cancer-Targeting Prevention. *The new England journal of medicine*. 356: 2195-2198.
44. Martínez-Carpio P., Navarro M. 2003. Factores de crecimiento, lesión celular, proteincinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: su relevancia en la patología molecular del cáncer humano. *Medicina clínica*. 120(7). 265-271.
45. Meza-Junco J., Montaña-Loza A., Aguayo-González A. 2006. Bases Moleculares del Cáncer. *Revista de investigación clínica*. 58(1): 56-70.
46. Nanji A. A., Hiller-Sturmhöfel S. 1997. Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health & Research World*. 21(4): 325-331
47. Navrátilová J., Jungová P., Vanhara P., Preisler J., Kanicky V., Smarda J. 2009. Copper ions regulate cytotoxicity of Disulfiram to myeloid leukemia cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 24:661-670.
48. Niel A. C., Jane B. R. 2007. Biología. Medica Panamericana. Buenos aires. p 1392.
49. Okamoto S., Jiang Y., Kawamura K., Shingyoji M., Fukamachi T., Tada Y., Takiguchi Y., Tatsumi K., Shimada H., Hiroshima K., Kobayashi H., Tagawa M. 2013. Zoledronic Acid Produces Combinatory Anti-Tumor Effects with Cisplatin on Mesothelioma by Increasing p53 Expression Levels. *Plos One*. 8(3): 1-9.
50. Organización Mundial de la salud. 2012. Estadística del día mundial contra el cáncer 2012. Consultado el día 21 de diciembre del 2012. <http://www.who.int/cancer/es/>
51. Passager E. 2010. Genética: texto y atlas. Medica Panamericana. Madrid. p 469.

52. Peralta Z., Bahena R., Diaz B., Madrid M. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*. 39: 1-23
53. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J. 2008. Farmacología. Elseiver. Barcelona. p 797.
54. Repetto J. M., Repetto K. G. 2009. Toxicología Fundamental. Diaz de santos. Sevilla. p 620.
55. Rojas M., Salmen S., Berrueta L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. 4(3): 92-106.
56. Sánchez-Torres L. E., Diosdado V. F. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México*. 41(1): 49-62
57. Serman F. 2002. Cáncer Cervicouterino: Epidemiología, Historia Natural y Rol del Virus Papiloma Humano. Perspectivas en Prevención y Tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 67(4): 318-323.
58. Shen J., Lipsky J., Naylor S. 2000. Role of Disulfiram in the In Vitro Inhibition of Rat Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Biochemistry and Pharmacology*. 60: 947-953.
59. Shiah S., Kao Y., Wu F. Y., Wu C. 2003. Inhibition of Invasion and Angiogenesis by Zinc-Chelating Agent Disulfiram. *Molecular Pharmacology*. 64(5): 1076-1084.
60. Smirnova A., Lazebnik L., Trubitsina I., Tkachenko E., Varvarina G., Drozdov V., Kim V., Baryshnikova A., Sokolova Z. 2012. Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksp Klin Gastroenterol*. 5: 66-69.
61. Sociedad española contra el cáncer (2012). Consultado el 12 de diciembre del 2012. <https://www.aecc.es/SobreElCancer/elcancer/Paginas/Elcancer.aspx>
62. Starr C., Taggart R. 2004. Biología: la unidad y diversidad de la vida. Thomson. México D.F. p 590.
63. Varela S. 2002. El cáncer: etiología, epidemiología, diagnóstico y prevención. Elseiver. Madrid. p 183.
64. Voet D. 2006. Bioquímica. Medica Panamericana. Buenos aires. p 1776.
65. Wang X., Sharma R., Sikka S., Thomas A., Falcone T., Agarwal A. 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 80(3): 531-535.

66. Watson J. D. 2008. *Biología molecular del gen*. Médica Panamericana. Buenos Aires. p 154.
67. Wickström M., Danielsson K., Rickardson L., Gullbo J., Nygren P., Isaksson A., Larsson R. & Löuborg H. 2007. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*. 71: 25-33.
68. Wilson T. R., MCLAughlin K. M., McEwan M., Sakai H., Rogers K. M. A., Redmond K. M., Johnston P. G., Longley D. B. 2007. c-FLIP: A Key of Colorectal Cancer Cell Death. *Cancer Res*. 67(12): 5754-5762.
69. Yakisich J., Sidén A., Eneroth P., Cruz M. 2001. Disulfiram is a Potent in Vitro Inhibitor of DNA Topoisomerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289: 586-590.
70. Yang X., Chang H. Y., and Baltimore D. (1998) Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: Requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Biochemistry*. 96(4): 1252-1257.
71. Yip NC., Fombon IS., Lui P., Brown S., Kannappan V., Armesilla AL., Xu B., Cassidy J., Darling J., Wang W. 2011. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFkB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *British Journal of Cancer*. 104: 1564-1574.
72. Zimmermann K., Green J. 2001. How cells die: Apoptosis pathways. *Allergy and Clinical Immunology*. 108 (4): 99-103.

APÉNDICE

RPMI-1640	
COMPONENTE	
mg/l	
AMINOÁCIDOS	
L-arginina	200
L-asparagina	50
Ácido L-aspártico	20
L-cistina	50
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	300
Glicina	10
L-histidina	15
L-hidroxi-L-prolina	20
L-iso-leucina	50
L-leucina	50
L-lisina HCl	40
L-metionina	15
L-fenilalanina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptofano	5
L-tirosina	20
L-valina	20
VITAMINAS	
Biotina	0.2
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
SALES	
KCl	400
MgSO ₄ 7 H ₂ O	100
NaCl	6 000
NaHCO ₃	2 200
Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	1 512
CaNO ₃ 4 H ₂ O	100
OTROS	
D-glucosa	2 000
Glutation reducido	1
CO ₂ fase de gas	5 %

VERSENO

EDTA (Sigma-Aldrich, USA)	0.40 g
NaCl (Sigma-Aldrich, USA)	8.00 g
KCl (Sigma-Aldrich, USA)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, 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 a una presión de 1.20 kg/cm² durante 15 minutos. Se almacena a 4 °C.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS)

NaCl (Sigma-Aldrich, USA)	8.00 g
KCl (Sigma-Aldrich, USA)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich, USA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich, USA)	0.20 g

Se disuelve el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el fosfato mono-ácido de sodio (Na₂HPO₄) y el fosfato di-ácido de potasio (KH₂PO₄) en 900 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 1 N y se afora a 1000 ml. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² durante 15 minutos 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-Aldrich, USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma-Aldrich, USA)	1.00 g

SOLUCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO (10 %)

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

DESACTIVACIÓN DE SUERO (SFB y SNT)

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.