



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA

“Efecto antiproliferativo y citotóxico del *S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido* en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MEJÍA MONTOYA MARÍA ELENA

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

Octubre 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **MEJÍA MONTOYA MARÍA ELENA**, con número de cuenta **089193204**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **28 de octubre** a las **14:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. ELIA ROLDÁN REYES

VOCAL M. en C. JOSÉ MISAEL VECENTE HERNÁNDEZ
VÁZQUEZ

SECRETARIO M. en C. LUIS SÁNCHEZ SANCHEZ

SUPLENTE M. en C. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Alvarez Barrera Lucila

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo y citotóxico del S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido en línea celulares provenientes de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 11 de septiembre de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

**DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION**

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A todos los profesores que me formaron con sus enseñanzas durante mi trayectoria académica en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A mis Hermanos

Les comparto la felicidad de lograr este sueño, por el apoyo que cada uno me brindo en su momento. Adela, José, Jesús †, Emilio, Concepción, Isabel y Diego.

Compañeros y amigos

Saraí, Iván, Viridiana, Esmeralda, Mauricio, y Claudia

A Moy y Javier por estar en el momento preciso.

JosK gracias por el apoyo incondicional que me has brindado hasta el último momento de esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS COMITE

M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme pertenecer al equipo de trabajo de este laboratorio y otorgarme todo lo necesario para la realización de este trabajo, por la confianza, comunicación y motivación que me brindo en todo momento, que me inspiraron aún más por mi pasión por la ciencia y llevar a término mi trabajo.

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez. Siempre he pensado que la “calidad y tiempo” son palabra mágicas, su dedicación a brindarme su tiempo, me guiaron durante la realización de este trabajo, por compartir su conocimiento para que mis dudas se despejaran en un entendimiento claro y seguir adelante en muchos momentos de titubeo. Entre los mejores maestros que he tenido y admiro.

Dr. Hugo López Muñoz. Porque en esta etapa de mi vida que con este trabajo culmina su enseñanza fue fundamental en mi aprendizaje, su entusiasmo de adquirir conocimiento y compartirlo ha sido un ejemplo para mí; porque con sus cuestionamientos aprendí a disipar muchas dudas. ¡Muchas gracias!

Dra. Elia Roldán Reyes. Por las observaciones y aportaciones para la mejora de este trabajo.

Dra. Lucila Álvarez Barrera. Por las observaciones y aportaciones para la mejora de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre y a mi padre † que sin darse cuenta forjaron en mí con sus enseñanzas la entereza y perseverancia de buscar mis sueños.

Por formar una mujer honesta, fuerte y decidida.

A mi familia

Edgar, Samantha y Daniel.

Samí y Dany siempre han sido mi inspiración, y este logro ha sido el motivo de mis ausencias, pero el instrumento para motivarlos a lograr sus sueños y metas.

La honestidad contigo mismo y la perseverancia te dará la confianza y motivación para lograr los sueños y metas que te propongas, y al final vivas la satisfacción de saber que son una realidad.

MMME.

Ésta tesis fue realizada con apoyo del proyecto PAPIIT: IN222114

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf-1	Del inglés: Apoptosis protease-activating factor-1
BADH	Del inglés: Betaine aldehyde dehydrogenase
Bcl-2	Del inglés: B cell leukemia 2
CaCu	Cáncer cervicouterino
CAD	Del inglés: Caspase activated Dnase
CDK	Del inglés: Cyclin-dependet kinases
CI ₅₀	Concentración de inhibición del 50 %
CSFE	Carboxifluoresceina
DAPI	Del inglés: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DSF	Bis (dietiltiocarbamoil) disulfuro
FADD	Del inglés: Fas-associated protein with death domain
FasL	Del inglés: Fas ligand
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MeDTC-SO	S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido
MeDTC-SO ₂	S-metil-N,N-dietiltiocarbamato dióxido
MePTC-SO	S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido
MePTC-SO ₂	S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido
MMP-2	Del inglés: Matrix metallopeptidase 2
MMP-9	Del inglés: Matrix metallopeptidase 9
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
PBS	Del inglés: Phopate buphered saline
PDTC	Pirrolidiltiocarbamato
RPMI-1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bobino
STN	Suero de ternera neonata
TNF	Del inglés: Tumor necrosis factor
TRAIL	Del inglés: TNF-related apoptosis-inducing ligand
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Cáncer	3
Cáncer y Ciclo celular.....	4
Puntos de control del ciclo celular	4
Muerte Celular	5
Apoptosis.....	6
Necrosis.....	7
Cáncer cervicouterino.....	9
Tratamientos.....	10
Disulfiram y sus metabolitos.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
Objetivos particulares:	18
PROCEDIMIENTO	19
Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino	19
Compuesto S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (MePTC-SO ₂)	19
Preparación del S-Metil-pirrolidil tiocarbamato-S-dióxido.....	19
Determinación de Cl ₅₀	20
Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos no tumorales.	21
Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.	21
Detección de cuerpos apoptóticos: Tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).	22
Evaluación de Proliferación de linfocitos humanos por marcaje con carboxifluoresceina (CSFE).	22
Procesamiento y obtención de células fibroblásticas de cérvix humano.....	24
Análisis estadístico.	25
RESULTADOS	26
ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
APÉNDICE	47

RESUMEN

En la actualidad el cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, a ésta patología se le atribuyen 7.6 millones de fallecimientos ocurridas en 2008 (OMS, 2013). Se ha observado que el 99.7 % de los casos de CaCu están relacionados con la infección por virus del papiloma humano (VPH). Los tratamientos que se utilizan en la actualidad son cirugía, radioterapia, quimioterapia y como parte de la prevención se han creado programas para realizar el examen de Papanicolaou y la aplicación de vacunas contra los VPH tipo 16 y 18. Desafortunadamente los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad no actúan específicamente sobre las células cancerosas. La toxicidad de estos medicamentos limita su efectividad, y muchos cánceres no se eliminan mediante aquellas dosis de quimioterapia que el paciente pueda tolerar, ya que estos tratamientos son altamente agresivos y muestran poca selectividad que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, además son ineficientes en etapas avanzadas de esta enfermedad. Por ello, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral continúa. Entre tales compuestos se tiene a los miembros de los Ditiocarbamatos como el Disulfiram (DSF), sus metabolitos y análogos como el Pirrolidilditiocarbamato (PDTC) (Della *et al.*, 2000), compuestos que actualmente son utilizados clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y principalmente en el tratamiento de adicciones como el abuso del alcohol y cocaína. Actualmente, se les ha reportado actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón así como leucemias (Wickström *et al.*, 2007).

De igual manera, se han sintetizado análogos de los metabolitos del Disulfiram y se ha estudiado su actividad citotóxica, sin embargo, su actividad anticancerígena y su acción selectiva no han sido evaluadas. En el caso particular del S-Metil-pirrolidilditiocarbamato-S-dióxido (MePTC-SO₂), análogo del metabolito del Disulfiram S-metil-N,N-dietilditiocarbamato dióxido (MeDTC-SO₂), en el presente trabajo se evaluó su efecto antiproliferativo e inductor de muerte celular en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino, así como en células no tumorales. Los resultados obtenidos muestran que el MePTC-SO₂ afectó el potencial proliferativo de las células tumorales de manera dependiente de la dosis con una CI₅₀ de 8.8, 11.7 y 24.1 µg/ml para las líneas de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones de MePTC-SO₂ afectaron de manera significativa el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana y de células fibroblásticas no tumorales de cérvix humano, sugiriendo que la actividad antiproliferativa presente en el MePTC-SO₂ no es selectiva. Al evaluar muerte celular por necrosis el efecto de MePTC-SO₂ sobre las líneas celulares de CaCu no alcanzó el 20 % de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos tratados; en cultivos de linfocitos no hubo presencia de enzima LDH a una concentración de 25 µg/ml. La muerte celular por apoptosis fue positiva al evaluar la presencia de caspasa 3 activa en las líneas celulares de CaCu en 27.6 %, 31.6 % y 37.2 % para HeLa, CaSki y ViBo respectivamente.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial la cual contiene diversas anomalías fenotípicas como la pérdida de la diferenciación, una alta tasa de proliferación, invasividad y con mayor frecuencia menor sensibilidad a los fármacos, por lo que la quimioterapia resulta poco eficiente, además de disminuir la calidad de vida del paciente (Alberts *et al.*, 2006).

El cáncer cervicouterino es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas (INEGI 2011). Su desarrollo se asocia a factores entre los que destacan: el nivel socioeconómico bajo, el inicio temprano de la actividad sexual, el antecedente de haber tenido más de una pareja sexual, embarazo a temprana edad, más de dos partos, el uso de anticonceptivos hormonales y el tabaquismo (Tirado *et al.*, 2005). El carcinoma de cérvix, en un 99%, es originado por la infección del virus del papiloma humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de casos de este cáncer (Muñoz y Bosch, 1997). El estudio de la biología del cáncer cervicouterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se manifiesta y desarrolla, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana (Alonso *et al.*, 2000).

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

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El cáncer se origina por el crecimiento celular incontrolado en alguna parte del cuerpo. La transformación de las células normales en células cancerosas surge como consecuencia del daño del ADN, dando lugar a células incapaces de controlar su crecimiento y división. Esta división celular incontrolada puede formar una masa o tumor visible en el órgano donde se origina, y que se denomina tumor primario. Además las células cancerosas tienen la capacidad de invadir tejidos vecinos a su lugar de origen, y la de diseminarse por el cuerpo mediante los sistemas circulatorio o linfático a zonas distantes y crecer en ellas, originando tumores secundarios (metástasis). Los distintos tipos de cáncer se comportan de manera diferente: velocidad de crecimiento, tendencia a la diseminación, respuesta a los tratamientos.

La masa resultante del tejido en crecimiento se denomina tumor o neoplasma (Alberts *et al.*, 2006). Los tumores se clasifican de acuerdo al tipo de células del que proceden:

- ◆ El primer grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- ◆ El segundo grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los más frecuentes son los carcinomas que constituyen el 90 % de los cánceres. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas y los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.
- ◆ En el tercer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras (Pardo, 1998).

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13 % de todas las muertes a nivel mundial, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. En México durante 2009, murieron 65 de cada 100 mil personas a consecuencia de tumores malignos (INEGI, 2011).

A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas, aproximadamente 13 % del total de fallecimientos, y estima que para el año 2030 aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013). Teniendo una mayor incidencia en mujeres el cáncer de mama, pulmón, colonrectal y cervicouterino (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2013).

Cáncer y Ciclo celular

La proliferación, es un proceso definido como el incremento del número de células o resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte (Sánchez, 2001). El ciclo celular está dividido en cuatro fases y en el siguiente orden secuencial: fases G₁, S, G₂ y M [Figura 1]. Las fases G₁ y G₂ (gap o intervalo) implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte la fase S (síntesis) consiste en la replicación del ADN para heredar a cada célula hija la misma carga genética. La fase M (mitosis) o de división celular, como su nombre lo indica, es la división de todo el material celular para originar dos células hijas (Alberts *et al.*, 2006).

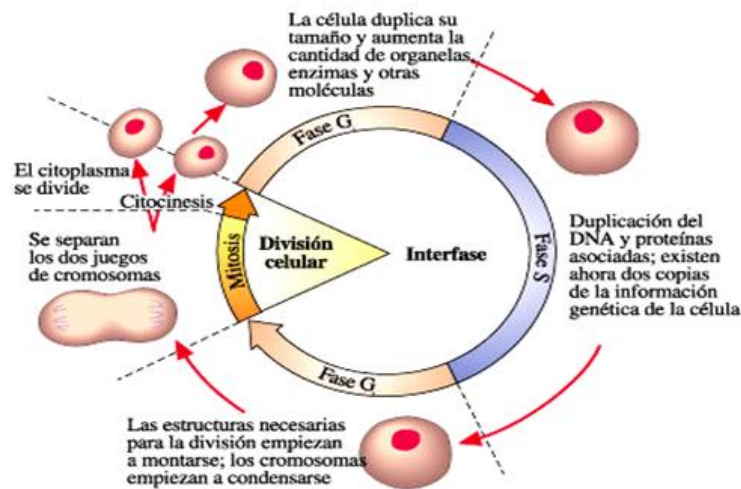


Figura 1. Esquema de las fases del ciclo celular (preujct.cl/biologia/curtis/libro/img/10-5).

Puntos de control del ciclo celular.

Los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. Estos puntos de control actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente. En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, entre otros elementos necesarios para el desarrollo de un ciclo celular típico normal (Lomanto *et al.*, 2003).

La célula progresa a través de su ciclo de división, G₁ > S > G₂ > M, en la presencia de señales de crecimiento y los complejos de CDK/ciclina activos específicos para cada fase del ciclo celular. El tránsito por estas cuatro fases del ciclo celular está dirigido por una red de interacción de proteínas altamente compleja y finamente

regulada. De entre estas proteínas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDK, cyclin-dependent kinases 1, 2, 4 y 6) y sus subunidades activadoras las cíclicas (A, B, D y E) (Kim y Zhao, 2005). La elucidación de estas redes de interacción nos ha llevado a entender actualmente muchos otros fenómenos celulares como el cáncer. No obstante la acumulación de una serie de alteraciones en el ADN (mutaciones puntuales, amplificaciones, deleciones, translocaciones, inserciones víricas e hipometilaciones) que afectan a un grupo particular de genes que regula positivamente cada una de las fases del ciclo celular (protooncogenes), así como aquellos que regulan negativamente la transición entre cada una de estas fases (antioncogenes) da lugar al fenotipo de células transformadas con las siguientes características: 1) diferenciación aberrante; 2) proliferación celular descontrolada; 3) supervivencia prolongada, y 4) tendencia a la invasión de tejidos adyacentes, alcanzar vasos sanguíneos para dispersarse y establecerse en tejidos u órganos alejados, formando sitios de crecimiento secundarios metastásicos. En conjunto, estos puntos citados anteriormente, describen las características de células tumorales que dan origen al cáncer de manera general (Karp, 2006).

Muerte Celular

Las células de un organismo no viven indefinidamente, hay un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular, proliferación y muerte celular garantizan la población adecuada en cada momento para el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Degterev y Yuan, 2008).

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. Existen diversos tipos de muerte celular, entre éstas, las más comunes y por ende las más estudiadas son denominadas apoptosis y necrosis [figura 2] (Degterev y Yuan, 2008).

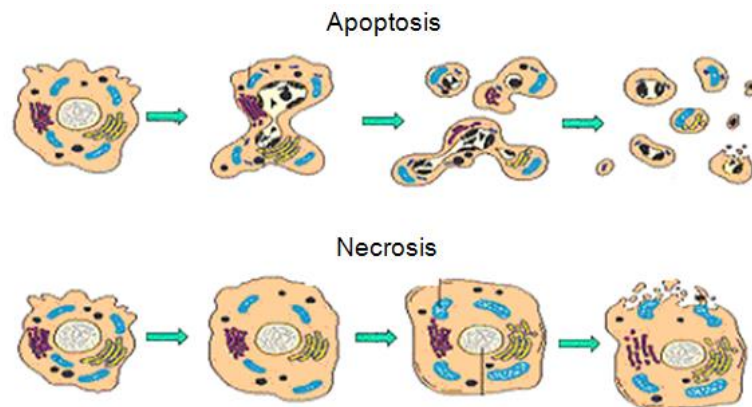


Figura 2. Esquema de dos tipos de muerte celular, (www.nature.com/html).

Apoptosis

La muerte celular por apoptosis o muerte celular programada, es un proceso controlado genéticamente en el que la célula se autodestruye (Klug *et al.*, 2006) Es el proceso donde la célula sufre una serie de cambios morfológicos. La apoptosis se origina por lesión o modificación irreparable del ADN nuclear o por pérdida de la integridad metabólica. El ADN de las células es seccionado a intervalos regulares por una endonucleasa de ADN específica de apoptosis como CAD (caspase activated Dnase), una “ADNasa” activada por caspasa. La adhesión celular y los contactos intercelulares disminuyen y se produce una pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular (por ejemplo, los microvilli). En la membrana plasmática, que inicialmente se mantiene íntegra, se producen cambios en la distribución de los fosfolípidos como la fosfatidilserina y se forman pequeñas evaginaciones citoplásmicas esféricas “blebs”, proceso conocido como el burbujeo o proyección de membrana.

El volumen celular disminuye y el citoplasma se condensa, en el núcleo la cromatina se condensa adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, con agregación de los poros nucleares y disolución de la lámina nuclear llegando a presentarse fragmentación del núcleo. Las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente, la célula colapsa, produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior; los cuerpos apoptóticos son retirados del espacio extracelular por células fagocitarias y, por tanto, no causa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación (Becker *et al.*, 2007; Lizarbe, 2007).

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una

cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de ácido aspártico seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa (Sánchez, 2001). Existen dos vías alternativas para activar a las caspasas:

En el caso de la vía extrínseca es iniciada por señales externas al activar a un receptor de muerte en la superficie celular, tras la unión de distintos ligandos (FasL, TNF o TRAIL) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1 o TRAILR1/R2, respectivamente). Este hecho provoca que, a través de proteínas adaptadoras que presentan dominios de muerte (como FADD), activa a la procaspasa 8 (Lizarbe, 2007). Finalmente, la caspasa 8 (caspasa iniciadora), puede activar a la caspasa 3, (caspasa ejecutora) iniciándose así el programa de muerte celular (Shen y Pervaiz, 2006).

La segunda vía, la intrínseca, es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, que inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas de estrés que utilizan esta segunda ruta de señalización, donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, el Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y el Segundo Activador de Caspasas Proveniente de Mitocondria SMAC/DIABLO (Porter y Urbano, 2006). El citocromo c liberado se une al Factor Activador de Proteasas de Apoptosis (Apaf-1) para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa 9 la cual es una caspasa iniciadora, y la caspasa 9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Velázquez *et al.*, 2004), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis.

Ambas vías, extrínseca e intrínseca, confluyen en la activación de la caspasa 3, donde se ha visto que una vez que sea activada la señal de muerte no es revertida, esta caspasa es una proteasa que se encuentra en el citoplasma y participa en la cascada efectora de muerte (Gogvadze y Orrenius, 2006).

Necrosis

Otro tipo de muerte celular es la necrosis, ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas tóxicas o por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune (Lizarbe, 2007). La necrosis comienza con la pérdida de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis. Como consecuencia de la lesión celular, el daño de la membrana plasmática conduce a la entrada de agua y de iones extracelulares. Los organelos intracelulares, como las mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y el núcleo, sufren alteraciones irreversibles que son causadas por la tumefacción celular y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (lisis celular). Como resultado final del daño en la membrana celular el contenido citoplasmático, incluidas las enzimas lisosómicas, quedan libres en el espacio extracelular [Figura 2]. Por lo

tanto, la muerte celular necrótica a menudo se asocia con una vasta lesión de tejidos vecinos y una respuesta inflamatoria intensa (Paniagua *et al.*, 2007).

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, es una molécula grande que está presente en el citoplasma y se libera al medio cuando hay pérdida de integridad de la membrana celular, por lo que al ser detectada extracelularmente se comprueba que la célula murió por necrosis (Karp, 2006).

La proliferación, diferenciación y supervivencia de las células en los organismos pluricelulares se regula cuidadosamente por mecanismos de muerte celular manteniendo el equilibrio del mismo (Cooper, 2002).

Cuando la muerte celular programada o apoptosis no se da de manera adecuada dentro de un organismo, y si además existe un descontrol del proceso de división celular ya sea por fallas en los puntos de regulación o por mutaciones en el material genético de la célula, se genera una enfermedad conocida como cáncer (Alberts *et al.*, 2006).

Cáncer cervicouterino

El desarrollo de cáncer cervicouterino (que proviene de la palabra en latín *cuello*) ilustra ésta naturaleza progresiva del cáncer. El cuello uterino es la parte inferior y estrecha del útero que conecta al útero con la vagina (Bolsover *et al.*, 2004). El cérvix normal se compone de diferentes tipos de células epiteliales. El ectocérvix, región que sobresale hacia el canal vaginal, está cubierto por epitelio estratificado. El endocérvix, que corresponde al canal cervical está recubierto de epitelio columnar.

Actualmente se ha observado que el 99.7% de los casos de cáncer cervicouterino están relacionados con la infección por virus del papiloma humano (VPH), la cual es una infección de transmisión sexual muy común, que puede producir lesiones en el útero o matriz (Doorbar, 2006). Es un virus que tiene un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular, de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, con un virión no envuelto que mide 45-55 nm de diámetro y una cápside proteica icosaédrica (Hidalgo, 2006). De acuerdo a su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en: virus de alto riesgo (tipos 16, 18, 45, 56), de riesgo moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y de bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44 (13,14)). Los tipos 16 y 18 son responsables de cerca de 70 a 76% de todas las lesiones precursoras y los cánceres invasores (Li *et al.*, 2011). La infección por virus del papiloma humano se acompaña, algunas veces, de alteraciones celulares llamadas histológicamente neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), que en la práctica clínica se definen como lesiones de bajo y alto grado. Estas lesiones, de acuerdo con la clasificación diagnóstica propuesta por la Organización Mundial de la Salud, se manifiestan por cambios característicos en el núcleo y el citoplasma celulares y se clasifican en NIC I, II y III, de acuerdo con el grado de afectación del grosor epitelial, que a su vez determina el tipo de células detectables en los estudios citológicos. La NIC-I es una lesión intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de esta manera un cáncer *in situ* . Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (Hernández, 2004).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), el cáncer cervicouterino es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer de mujeres mexicanas. México ocupa el segundo lugar de mortalidad entre los tumores malignos de la población femenina a nivel mundial (INEGI, 2011).

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2009) enlista como factores de riesgo para el cáncer cervicouterino:

- Inicio de práctica sexual antes de los 18 años
- Infección cérvico-vaginal por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo
- Múltiples parejas sexuales (del hombre y de la mujer).
- Antecedentes genéticos de cáncer y específicamente cáncer cervicouterino.

- Tabaquismo.
- Uso de anticonceptivos hormonales.
- Múltiples embarazos.

Tratamientos

Los tres métodos de tratamiento de cáncer cervicouterino de acuerdo con el estado de avance del cáncer en la mujer son: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

La cirugía, es el primer tratamiento utilizado para combatir al cáncer, se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis. Hay varios tipos de cirugías: la criocirugía, consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento; la cirugía con rayo láser, consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas y; la histerectomía, es una operación en la cual se extrae el útero y el cuello uterino.

Hay distintos tipos de histerectomía, según la extensión de la intervención y de los órganos afectados:

- Histerectomía total. Consiste en extirpar el útero y el cuello uterino, pero no los ovarios.
- Histerectomía total bilateral. Consiste en extirpar los dos ovarios y ambas trompas junto con el útero.
- También puede ser unilateral, cuando se extirpan el ovario y la trompa de un solo lado. Se practica a partir de la perimenopausia y si existen antecedentes familiares en patología ovárica.
- Histerectomía subtotal o parcial. Consiste en extirpar el cuerpo del útero sin afectar el cuello uterino. Sólo se aconseja cuando hay dificultades técnicas.
- Histerectomía radical. Consiste en extirpar el útero entero, las trompas, los ovarios, el tercio superior de la vagina y los ganglios linfáticos de la pelvis.

La radioterapia, utiliza ciertas longitudes de onda de alta energía para eliminar las células malignas, como rayos gamma o rayos X, se eliminan a todas las células que se encuentran proliferando incluyendo a las células tumorales como a las no tumorales.

La quimioterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer que usa medicamentos (fármacos) con la intención de destruir las células cancerosas. Las células cancerosas crecen y se dividen rápidamente y el tratamiento con quimioterapia tiene la intención de parar o retrasar el crecimiento de dichas células (Macarulla *et al.*, 2009).

Los tratamientos de radioterapia y quimioterapia afectan a células en estado de proliferación, ya que inducen daño directo sobre el ADN, deteniendo la progresión del ciclo celular, induciendo muerte celular o ambos.

Específicamente la quimioterapia afecta a células que en estado de proliferación, son más susceptibles de presentar daños en el ADN induciéndolas hacia una muerte celular, pero por otro lado se puede tener un efecto citostático donde la detención en alguna fase del ciclo celular, puede retardar el crecimiento tumoral e inducir la susceptibilidad al efecto de otros agentes quimioterapéuticos. Los quimioterapéuticos pueden tener un efecto citostático o inductor de muerte. Los citostáticos son fármacos capaces de inhibir el crecimiento desordenado de células, alteran la división celular principalmente en las fases G2 y Síntesis.

Cuando el daño ocasionado a la célula tumoral no se puede reparar la célula muere. El efecto citotóxico no se limita solo a las células malignas sino que, ejercen también su acción sobre los tejidos de proliferación rápida, como piel, mucosas, médula ósea e intestino entre otros. Los fármacos incluyen una serie de sustancias químicas, que se utilizan para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, como terapia única o asociados a otras medidas como son cirugía, radioterapia, inmunoterapia, u hormonoterapia.

Como ya se mencionó antes la quimioterapia afecta a células en estado de proliferación, tanto células normales como tumorales, no se trata de un tratamiento selectivo frente a células tumorales sino que también puede afectar a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente como: las células de la mucosa bucal, de la mucosa intestinal o las células de los folículos pilosos. Es por todo esto que durante el tratamiento con quimioterapia aparecen efectos secundarios como consecuencia del daño a células sanas, efectos que suelen ser reversibles, es decir, que van a mejorar o desaparecer, una vez finalizado el tratamiento con quimioterapia. Los efectos secundarios observados durante la aplicación de una quimioterapia son debidos a la pérdida de células normales. El efecto más notable se aprecia en el descenso del número de células blancas, así como de sus precursoras presentes en la médula ósea, por lo que el sistema inmune se abate permitiendo así, la presencia de enfermedades oportunistas. Los cultivos de linfocitos ofrecen grandes ventajas al ser indicadores extremadamente sensitivos de los efectos citotóxicos inducidos por quimioterapia, ya que se puede hacer seguimiento de alteraciones o daño en el ADN, transformación celular, muerte celular y afectación en el potencial proliferativo de estas células.

No obstante el éxito de los tratamientos contra el cáncer, éstos son eficientes en estadios tempranos de la enfermedad, sin embargo, son poco eficientes en los estadios terminales de esta patología. Este hecho ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer, destacando la búsqueda de compuestos sintéticos con actividad anticancerígena. Al respecto, ha llamado la atención los compuestos pertenecientes al grupo de los ditiocarbamatos por sus diferentes actividades biológicas, y sobre todo a que son compuestos con aplicación clínica.

Disulfiram y sus metabolitos

Los Ditiocarbamatos son una clase de quelantes de metales pesados, siendo una clase importante de compuestos que han recibido atención considerable en investigación clínica. Tales compuestos son de interés debido a sus numerosos efectos biológicos incluyendo la antioxidante, fungicida, bactericida, plaguicida y antiviral (Wynne *et al.*, 2003) y recientemente, se ha sugerido como posible tratamiento de la dependencia a la cocaína (Wickström *et al.*, 2007).

El disulfiram (DSF), un ditiocarbamato, se ha aprobado como un fármaco, y ha sido utilizado por décadas en el tratamiento del abuso del alcohol, ya que inhibe la enzima aldehído deshidrogenasa y recientemente se ha propuesto como un agente anticancerígeno al igual que sus metabolitos (Chen *et al.*, 2006). Los estudios muestran que el disulfiram tiene una baja toxicidad (Suneet *et al.*, 2004), con varios efectos en la síntesis de ADN y la proliferación celular (Yakisich *et al.*, 2001).

El DSF inhibe el crecimiento y la supervivencia clonogénica de líneas celulares prostáticas cancerosas en cultivo y se ha demostrado una tendencia a la reducción del crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata (Lin *et al.*, 2011).

El DSF como quelante puede portar iones de Cu, este complejo DSF-cobre inhibe potentemente la actividad proteosomal en líneas celulares cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF10DCIS). Además, cuando se administró a ratones con xenoinjertos de células MDA-MB-231, el DSF inhibió significativamente el crecimiento del tumor en un 74 % (Di Chen *et al.*, 2010).

También el DSF induce la apoptosis en células de melanoma humano metastásico (células 46A-C81, C81-61 y C83-2C) tratadas a una dosis de 25-50 ng/ml. Sin embargo la misma dosis de DSF resultó no significativa en melanocitos (Cen *et al.*, 2002).

Se reporta que el DSF inhibe la invasión, la angiogénesis y por lo tanto la metastásis, de las células tumorales, posiblemente a través de interacciones con las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y la inhibición de su actividad proteolítica a través de un mecanismo relacionado con zinc (Shine-Gwo *et al.*, 2003).

También el DSF inhibe la expresión de las MMP-2 y MMP-9, suprimiendo además la invasión de células de osteosarcoma humano (Hyun-Ji *et al.*, 2007).

No obstante en estos hallazgos, no es claro si la actividad biológica del Disulfiram es causada por sus metabolitos o por si mismo ya que éste es metabolizado una vez que entra a la célula [Figura 3]. Además, actualmente se han generado nuevos análogos o derivados de éste con el propósito de estudiar la actividad biológica con respecto a la estructura química del compuesto.

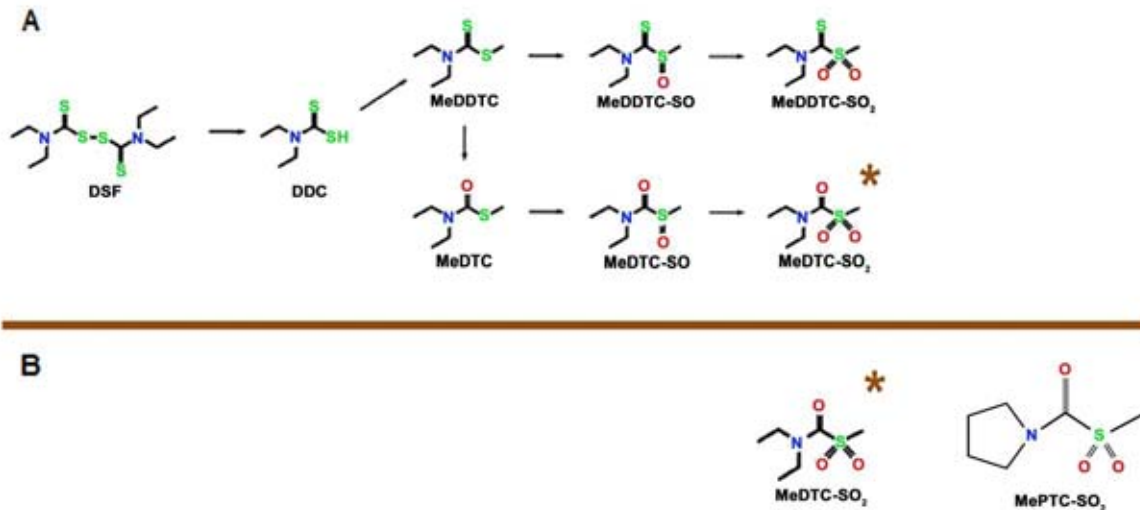


Figura 3. **A** muestra la vía metabólica del Disulfiram (DSF), donde son utilizadas las siguientes abreviaturas: **DSF**, bis(dietiltiocarbamoil)disulfuro; el cual se reduce a **DDC**, N,N-dietiltiocarbamato ácido; el cual sufre una reacción de metilación para formar el **MeDDTC**, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el **MeDTC**, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato y **MeDTC-SO**, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido, éste último es el precursor de **MeDTC-SO₂**, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfona; TMT, tiol metiltransferasa; TPMT, tiopurina metiltransferasa; CP-450, complejo citocromo P-450 (Zaldívar *et al.*, 2006). **B** muestra MePTC-SO₂ análogo sintético del metabolito del MeDTC-SO₂ (Imagen tomada y modificada de Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011).

De igual manera es conocido que el DSF y sus metabolitos (Della *et al.*, 2000) presentan actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón así como leucemias (Wickström *et al.*, 2007). Dada esta actividad anticancerígena del DSF y sus metabolitos se han sintetizado análogos de los metabolitos del DSF con el fin de evaluar su actividad citotóxica y antiproliferativa, además de determinar si poseen actividad selectiva, ésto es, que no afecte células de tejidos normales o cultivos primarios de células no tumorales. Tal es el caso del compuesto *S*-Metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-óxido (MePTC-SO) análogo del metabolito del DSF S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido (MeDTC-SO). El análogo MePTC-SO presenta efecto antiproliferativo e induce muerte celular por apoptosis en células de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa a una concentración de 25 µg/ml, además no presenta una actividad necrótica en células tumorales ni en células linfocíticas humanas, no afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano, sin embargo si afecta la proliferación de linfocitos en un 26 % (Camacho, 2010).

De manera particular el compuesto *S*-metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-dióxido (MePTC-SO₂) análogo sintético del metabolito del Disulfiram S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfona (MeDTC-SO₂), ha mostrado tener una mayor actividad en contra de la enzima BADH, blanco del disulfiram [figura 3]; al ser evaluado en cultivos *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* (bacteria oportunista, dependiente de la enzima betaina aldehído deshidrogenasa

“BADH”, para subsistir en los tejidos que infecta: de las vías urinarias, en ojo, en heridas causadas por quemaduras y los pulmones de individuos con fibrosis quística), mostró mayor actividad que el DSF y otros metabolitos de éste, al inhibir la enzima BADH además de presentar una mayor estabilidad molecular (López, 2009). Lo anterior sugiere un efecto mayor del MePTC-SO₂, del cual no se ha realizado evaluación de su actividad biológica sobre líneas celulares tumorales.

Los antecedentes mencionados indican que DSF y algunos de sus metabolitos presentan efectos antiproliferativos citotóxicos, antioxidante, inductores de apoptosis, actividad inhibidora de la enzima BADH, entre otras, en diferentes líneas celulares y modelos experimentales *in vivo*. Por ello el compuesto *S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido* (MePTC-SO₂) puede ser considerado como un candidato para evaluar su efecto antiproliferativo y citotóxico en células de CaCu, además de determinar si presenta actividad selectiva.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo una de las principales enfermedades a nivel mundial.

Existen diversas alternativas de tratamientos para combatir esta enfermedad. Sin embargo, éstos, resultan ser pocos selectivos, tóxicos, costosos e ineficientes en estadios avanzados, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

El disulfiram es un fármaco que se usa en el tratamiento de alcoholismo, sin embargo, recientemente se ha reportado que también posee actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular en líneas celulares provenientes de diversos cánceres. La actividad del DSF está directamente relacionada con sus metabolitos, los cuales son producto del procesamiento celular de este fármaco; los metabolitos del DSF, individualmente han mostrado tener actividades relacionadas a la detención de la proliferación e inducción de muerte celular, sin embargo, pueden tener una actividad necrótica exacerbada. De lo anterior se desprende la necesidad de buscar modificaciones que eliminen la actividad necrótica de estos metabolitos, potenciando así, una muerte celular apoptótica además de buscar una actividad selectiva dirigida hacia las células tumorales. En base a lo anterior se han generado derivados o análogos de metabolitos del DSF con la intención de potenciar las actividades que éstos presentan.

El compuesto *S*-metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-dióxido (MePTC-SO₂) es un análogo del metabolito MeDTC-SO₂, del cual no se tiene información de actividad antitumoral, inductora de muerte celular y selectividad sobre líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, por lo que es de interés su valoración con el fin de aportar información que permita establecer si éste tiene potencial antitumoral.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra como una de las principales causas de muerte (INEGI, 2011). A pesar de la aplicación de los tratamientos para combatir esta enfermedad y la implementación de programas de prevención (vacunas,) y programas de diagnóstico a tiempo, la incidencia del CaCu se sigue incrementando en el país.

La investigación de la biología del cáncer cervicouterino ha generado gran interés por explorar compuestos de origen sintético, así como sus derivados y análogos que presentan alguna actividad biológica, entre las que destacan, la actividad antitumoral, antioxidante y antibacterial. Buscando nuevos agentes terapéuticos alternativos que permitan una acción selectiva y efectiva en cualquier estadio de la enfermedad, preferentemente teniendo características de un fármaco ideal como: no ser necrótico, sin efecto en el sistema inmune, antioxidante, antimetástasico, y que induzcan a una muerte apoptótica a las células cancerígenas; sin efectos secundarios para uso como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento de CaCu.

HIPÓTESIS

Se ha descrito que compuestos pertenecientes a la familia de los ditiocarbamatos presentan propiedad antiproliferativa, necrótico o apoptótica en diferentes líneas celulares tumorales, y se sabe también que las modificaciones estructurales en diferentes tipos de moléculas pueden mejorar su actividad biológica, por lo que se espera que el *S-metil-pirrolididitiocarbamato-S-dióxido* (MePTC-SO₂) aumente la actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular, en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del *S-metil-pirroliditiocarbamato-S-dióxido* (MePTC-SO₂) en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, y comparar su efecto con células linfocíticas de sangre periférica humana no tumorales.

Objetivos particulares:

- ❖ Evaluar la actividad antiproliferativa de MePTC-SO₂ mediante la determinación de la concentración requerida para inducir un decremento del 50 % en el número celular (CI₅₀) en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.
- ❖ Evaluar el efecto necrótico del MePTC-SO₂ en cultivos de células de cáncer cervicouterino, HeLa, CaSki y ViBo, y de linfocitos humanos de sangre periférica humana, mediante la detección de la liberación de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH).
- ❖ Detectar si el compuesto MePTC-SO₂ induce muerte celular por apoptosis evaluando morfología nuclear mediante la tinción de DAPI; así como la cuantificación de caspasa 3 activa en células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.
- ❖ Evaluar el efecto antiproliferativo del MePTC-SO₂ sobre células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, así como en cultivos de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano para detectar actividad selectiva.

PROCEDIMIENTO

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de CaCu fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina 10⁶ U/l (Grunenthal, MEX), rojo fenol y suero de ternera neonata (STN) (GIBCO, USA) al 5 %, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO₂ y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70 % (Morgan y Darling, 1993).

Las líneas celulares de CaCu que se utilizaron en éste trabajo son: Hela, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2012). CaSki, células provenientes de carcinoma epidermoide cervicouterino, que fueron establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2012) y ViBo, células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Compuesto S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (MePTC-SO₂)

El compuesto MePTC-SO₂ fue proporcionado por el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza a cargo del Dr. Ignacio Regla. Este es un compuesto sólido, para llevar a cabo las pruebas biológicas, se realizó un stock del compuesto MePTC-SO₂ solubilizado en metanol frío 99.9 % de pureza (Baker, México).

Preparación del S-Metil-pirrolidil tiocarbamato-S-dióxido

La preparación del stock se realizó en baño de hielo. Se pesó 1 miligramo de MePTC-SO₂ y se solubilizó en 50 µl de metanol. Para obtener un stock con una concentración de 20 µg/µl.

Para los ensayos de curva dosis-respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 200 a 1.56 µg/ml para la determinación de la CI₅₀. Para esto se tomaron 20 µl de la solución de trabajo y se llevaron a 1 ml con medio RPMI-1640 al 5 % STN en tubos cónicos de plástico de 1.5 ml, para tener una concentración 400 µg/ml, del cual se tomaron 500 µl y llevaron a 1 ml con medio RPMI 5 % de STN para obtener una concentración de 200 µg/ml, de esta manera se continuaron las diluciones hasta obtener la concentración de 1.56 µg/ml, para cada concentración se completó el volumen a 1 ml.

Una vez obtenida la CI_{50} , para cada línea celular de CaCu, ésta concentración se tomó de manera puntual, para lo cual se realizó una dilución del compuesto a partir del stock. En un tubo cónico de plástico de 0.5 ml se agregaron 95 μ l de medio RPMI-1640 al 5 % STN, al cual se le adicionaron 5 μ l del stock.

Para la realización de cada determinación se utilizaron como control negativo, células sin tratamiento únicamente RPMI-1640 al 5 % de STN, y células tratadas con a concentraciones que van de 0.3 μ l/ml a 1.2 μ l/ml de metanol, siendo la cantidad empleada en la determinación de la CI_{50} en RPMI-1640 al 5 % de STN.

El metanol es altamente toxico, sin embargo se ha reportado que en concentraciones de 1 % en cultivos celulares de CaCu no afecta el potencial proliferativo ni induce la formación de cuerpos apoptóticos (Hernández, 2004), por lo que se planteó no exceder este parámetro.

Determinación de CI_{50} .

Para establecer la CI_{50} (concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular del cultivo) de las líneas tumorales provenientes de CaCu, se sembraron 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de STN, durante 24 horas.

Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se agregó RPMI-1640 al 5 % de STN con el compuesto MePTC-SO₂, a concentraciones de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml. En el ensayo se utilizó como control negativo células sin tratamiento y células tratadas con 1 % de metanol (concentración máxima empleada de metanol en la concentración de 200 μ g/ml). A las 24 horas se evaluó el número celular por la técnica tinción con cristal violeta, la cual consiste en: retirar el medio de cultivo de los pozos de la placa y agregar una solución de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1 % durante 15 min. A continuación la solución de glutaraldehído se retiró y se realizó un lavado con agua desionizada, la placa se dejó secar al aire. Una vez seca la caja se agregó el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico durante 20 min. Al término de éste tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Por último, el colorante incorporado en las células se solubilizó con una solución de ácido acético al 10 % en agitación durante 20 min, y finalmente la absorbancia se determinó a 590 nm en un lector de placas (SofMaxPro, USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010 y se procedió a elaborar una curva de concentración del compuesto contra porcentaje de proliferación celular, para obtener la ecuación lineal y su coeficiente de correlación y determinar así la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular de cultivos de las líneas tumorales de CaCu.

Para proceder en cada una de las evaluaciones posteriores se verifica que el efecto de MePTC-SO₂ sea del 50% para cada una de las tres líneas celulares de CaCu.

Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos no tumorales.

El ensayo de necrosis se realizó con el kit de LDH Nonradiative Cytotoxicity assay (Promega, USA). En una placa de 96 pozos (CORNING, USA) se sembraron 7,500 células/pozo en un volumen de 100 µl de RPMI-1640 al 5 % de STN y se incubó a 37 °C, 5 % CO₂, por 24 horas, posteriormente se agregó la CI₅₀ del MePTC-SO₂ correspondiente a cada línea celular en medio de cultivo fresco al 5 % de STN, a los controles se les realizó únicamente cambio de medio fresco por un lado y como control del vehículo se utilizó metanol a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Una hora antes de cumplir con las 24 h, al control positivo se le realizó un segundo cambio de medio por medio fresco al 1 % de tritón X-100, condición que se mantiene por 1 h. Cumplidas las 24 h se recuperó el medio de cultivo, de los distintos tratamientos y se centrifugó a 1500 rpm (Becton Dickinson, USA) durante 5 minutos. Después se transfirieron 40 µl de sobrenadante de cada pozo por tratamiento a una placa de 96 pozos, se añadió 40 µl de mezcla de reacción del kit Cyto Tox 96 (Nonradiative Cytotoxicity assay) a cada pozo y se incubaron durante 15 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se evaluó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotóxicidad} = \frac{(\text{muestra} - \text{control negativo})}{(\text{control positivo} - \text{control negativo})} * 100$$

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Se sembraron 5X10⁴ células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCu, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. Al paso de las 24 h se retiró el medio de cultivo y se agregó la CI₅₀ del MePTC-SO₂ en medio de cultivo fresco RPMI-1640 al 5 % de STN, al control testigo se les realizó únicamente cambio de medio fresco, al control positivo se agregó medio fresco con camptotecina (Hela:4 µg/ml, CaSki:10 µg/ml, y ViBo:4 µg/ml), y como control del vehículo se utilizó metanol a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Posteriormente se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo, el procedimiento se detalla de la siguiente manera: las células fueron cosechadas y fijadas

a las 24 horas de cultivo, con etanol 70 % en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 1:250 en PBS durante 24 h a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), y se mantuvo en oscuridad durante 3 horas, se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Detección de cuerpos apoptóticos: Tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm² (500,000 células/caja de cultivo), en un volumen de 0.5 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. A las 24 horas se trataron los cultivos con la CI₅₀ MePTC-SO₂ en medio de cultivo fresco al 5 % de STN, al controles testigo se le realizó únicamente cambio de medio fresco, al control positivo se le agrega medio fresco con camptotecina (Hela:4 µg/ml, CaSki:10 µg/ml, y ViBo:4 µg/ml), y como control del vehículo se utilizó metanol a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Después de 24 horas se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS durante 3 minutos cada uno en agitación suave. Posteriormente las células fueron fijadas durante 15 min con paraformaldehído al 2 % en PBS, el cual se preparó al momento. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y se permearon con una solución de tritón X-100 al 0.5 % en PBS durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron 3 veces con PBS para colocar un volumen aproximado de 10 µl por muestra del fluorocromo DAPI (Sigma-Aldrich, USA) dejando incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e inmediatamente se retiró el exceso de DAPI lavando 3 veces con PBS durante 3 minutos cada lavado, finalmente se procedió a montar las muestra en portaobjetos usando medio de montaje antifolding (Vectashield, USA), las muestras fueron selladas con resina de nitrocelulosa y almacenadas en congelación a -10°C para su posterior evaluación. Las preparaciones fueron observadas en microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP) y se tomaron fotografías de las muestras para su posterior análisis.

Evaluación de Proliferación de linfocitos humanos por marcaje con carboxifluoresceina (CFSE).

Se obtuvieron 20 ml de sangre heparinizada de personas aparentemente sanos en tubos vacutainer con EDTA. Se transfirieron 5 ml de sangre periférica a tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) con 5 ml de ficol Histopaque (Sigma-Aldrich, USA), y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, después

de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más. Terminada la centrifugación se obtienen 4 fases de las cuales se extrae el anillo de leucocitos, (nube blanca). Posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a un tubo estéril y se resuspendió en 10 ml de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y fueron resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (el total de células quedaron contenidas en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja de Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, fueron cosechadas 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 se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero y se determinó el número celular utilizando la cámara de Neubauer.

Para evaluar la proliferación por incorporación de carboxifluoresceína (CFSE) (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en PBS y se le agregó a la suspensión celular 10 µl de (CFSE) (12 µM por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS suplementado 5 % de SFB, y centrifugaron a 1500 rpm y 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 1.6 ml a una densidad de 2X10⁶ de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 µl/ml de fitohemaglutinina 10 µg/ml 1X10⁶ (Micro Lab S.A., Méx.).

Una vez marcadas y en presencia de fitohemaglutinina se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1X10⁶ de células/ml de medio total.

Para el tratamiento con MePTC-SO₂ se realizó una curva dosis-respuesta, con diluciones seriadas que van de 200 a 1.56 µg/ml para la obtención de la CI₅₀. En el ensayo se utilizó como control negativo células sin tratamiento y células tratadas con 1 % de metanol (concentración máxima empleada de metanol en la concentración de 200 µg/ml). Las células contenidas en cada tubo fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc. USA) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB con una cantidad de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 µl e incubadas 72 h hasta su evaluación. Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos recolectando los cultivos de cada pozo y centrifugando a 1,500 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno centrifugando por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se realizaron dos lavados resuspendiendo en 500 µl de PBS, y se agregó 500 µl de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaran los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2

Procesamiento y obtención de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido de cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez que se obtuvo la pieza quirúrgica, una porción de tejido fue transportada en medio de cultivo RPMI-1640 al 20 % de SFB a 4 °C y fue procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió seccionar el tejido en porciones pequeños (1-2 mm), para ser sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %. Esto consistió en colocar los trozos de tejido en un matraz Erlen Meyer de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37 °C en un baño con agitación durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, se vertió a través de una malla de nylon montada en un embudo, lo que permitió solo el paso de la tripsina con células, dejando el tejido no disgregado en la malla. A las células obtenidas del disgregado se le agregó 0.5 ml de SFB y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. El botón celular es sembrado en cajas de cultivo de plástico de 600 mm en 5 ml de medio de cultivo 10 % SFB. El tejido retenido en la malla es sometido a una segunda disgregación enzimática por 15 min más y para su cultivo se repitió el procedimiento anterior. Los cultivos son mantenidos en una incubadora (Scientific) al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo, después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio (totalmente), de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 %. En este momento se obtienen poblaciones fibroblásticas o epiteliales, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitieron mantener poblaciones de un solo tipo celular, fibroblastos. La resiembra consistió en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70 % de saturación, con ayuda de una solución de tripsina al 0.05 % e incubada por 1 a 3 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación (2000 rpm) dos veces y posteriormente fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo.

Para evaluar el efecto de compuesto MePTC-SO₂ en cultivos de células fibroblásticas, se sembraron 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100µl de medio de cultivo RPMI al 10 % de SFB, durante 24 horas. Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI al 10 % de SFB con el compuesto MePTC-SO₂, a concentraciones de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml. En el ensayo se utilizaron como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 1 % de metanol (concentración máxima empleada de metanol en la concentración de 200 µg/ml). A las 56 horas se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta, Una vez obtenidos los datos de absorbancia, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010 y se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular en células no tumorales de cérvix humano.

Para preparación de soluciones véase apéndice 1

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se muestrearon como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 3 repeticiones. Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) para la comparación entre medias, se utilizó el programa estadístico InStat3 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey, para determinar la diferencia entre pares de medias se utilizó una prueba de t-Student.

Los datos provenientes de citometría de flujo fueron analizados con el software winMDI 2.9 para lo cual se seleccionó el área correspondiente al control y se obtuvo la media geométrica, en base a eso se observó el desplazamiento de los tratamientos.

RESULTADOS

Con la intención de evaluar si el compuesto MePTC-SO₂ presenta actividad antitumoral, se realizaron pruebas *in vitro* evaluando, capacidad antiproliferativa e inductora de muerte celular en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo; así también se valoró su selectividad contra cultivos primarios de células fibroblásticas de cérvix y linfocitos de sangre periférica humana no tumorales.

Para iniciar con los ensayos de actividad del compuesto MePTC-SO₂, primero se realizaron pruebas de solubilidad y se determinó que el compuesto *S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido* (MePTC-SO₂) es soluble en metanol, se hicieron observaciones al microscopio sin encontrar presencia de cristales del compuesto en este solvente, de igual manera se determinó que no se presentará precipitación de cristales al agregar el compuesto MePTC-SO₂ en medio de cultivo RPMI 1640 al 5 % de STN.

Una vez comprobada la solubilidad del compuesto en el medio de cultivo, se determinó si cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con concentraciones de 1.56 a 200 µg/ml presentan una disminución en su número celular a las 24 h de tratamiento (Figura 4).

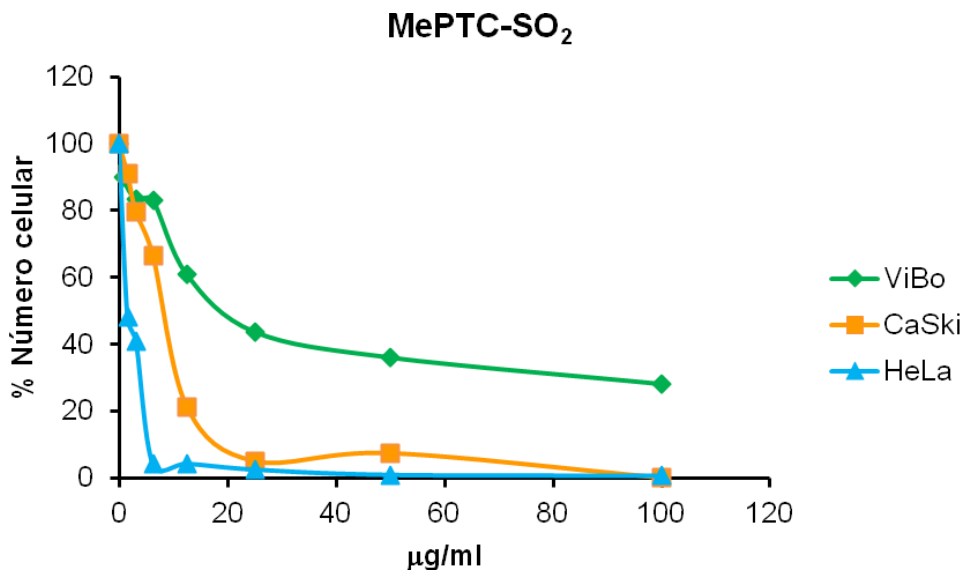


Figura 4. Actividad antiproliferativa de (MePTC-SO₂) sobre cultivos de líneas celulares de CaCu, Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 24 h. En cada condición se emplearon seis repeticiones. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de cristal violeta.

Como se puede apreciar en la figura 4, el compuesto MePTC-SO₂ afecta el número celular de cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, de una forma dependiente a la concentración, ya que al aumentar la concentración disminuye el número celular. Con las curvas de respuesta para cada línea celular se determinó la CI₅₀ para cada una de éstas [Cuadro 1]. Estas concentraciones calculadas fueron corroboradas por ensayos puntuales [Figura 5].

Concentración requerida para inducir un decremento del 50 % en el número celular

Línea celular	µg g/ml	nmol/ml
HeLa	8.8	49.71
CaSki	11.7	66.10
ViBo	24.1	136.15

El cuadro 1. Muestra el valor calculado (CI₅₀) siendo la concentración requerida para inducir un decremento del 50 % en el número celular en cultivos de las líneas celulares al aplicar el compuesto MePTC-SO₂.

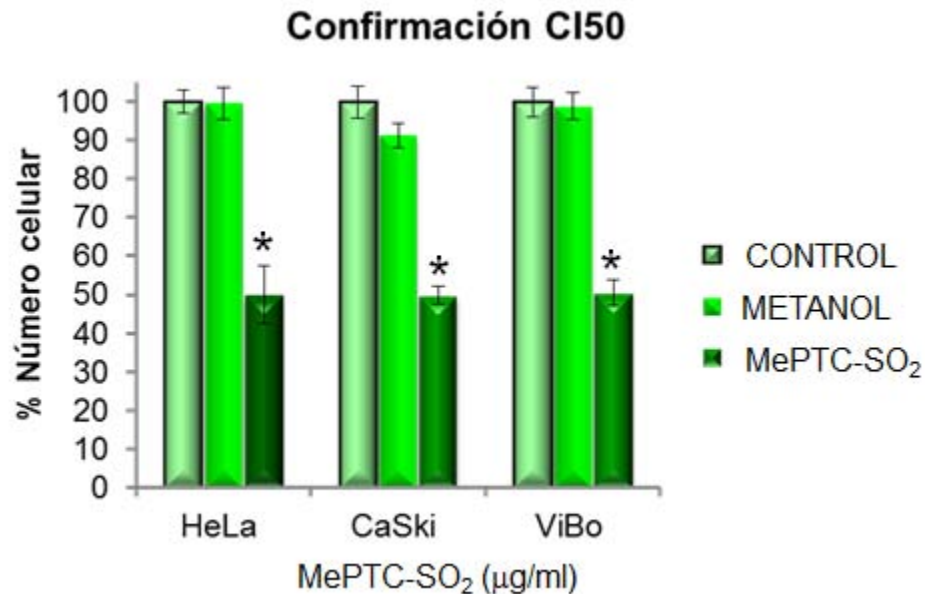


Figura 5. Confirmación de CI₅₀ en cultivos de líneas celulares de CaCu (HeLa, CaSki y ViBo), Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células/pozo) con las diferentes concentraciones de CI₅₀ de MePTC-SO₂ para cada línea celular durante 24 h. Para cada condición se emplearon 6 repeticiones. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de cristal violeta. * ($p < 0.05$) vs Control (t-Student).

Los cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo al ser tratados con las respectivas CI₅₀ presentaron afectaciones en la morfología celular. En la figura 6 se presenta la forma característica de las células en los cultivos control y metanol para las tres líneas celulares, se observan células adheridas y extendidas sobre la superficie de la caja de cultivo, en los tres casos se aprecia el contacto célula-célula, se observan islotes de crecimiento de distribución homogénea sobre la superficie de cultivo, sin embargo al aplicar el tratamiento con MePTC-SO₂ por 24 h, se observó efecto en la morfología de las células. En primera instancia se aprecia la disminución en el número celular, pérdida de contacto célula-célula, además la pérdida de adherencia en células redondas y brillantes, la condensación citoplasmática y la presencia de células pequeñas de contornos irregulares y opacas, indican que estas células experimentan un proceso de muerte.

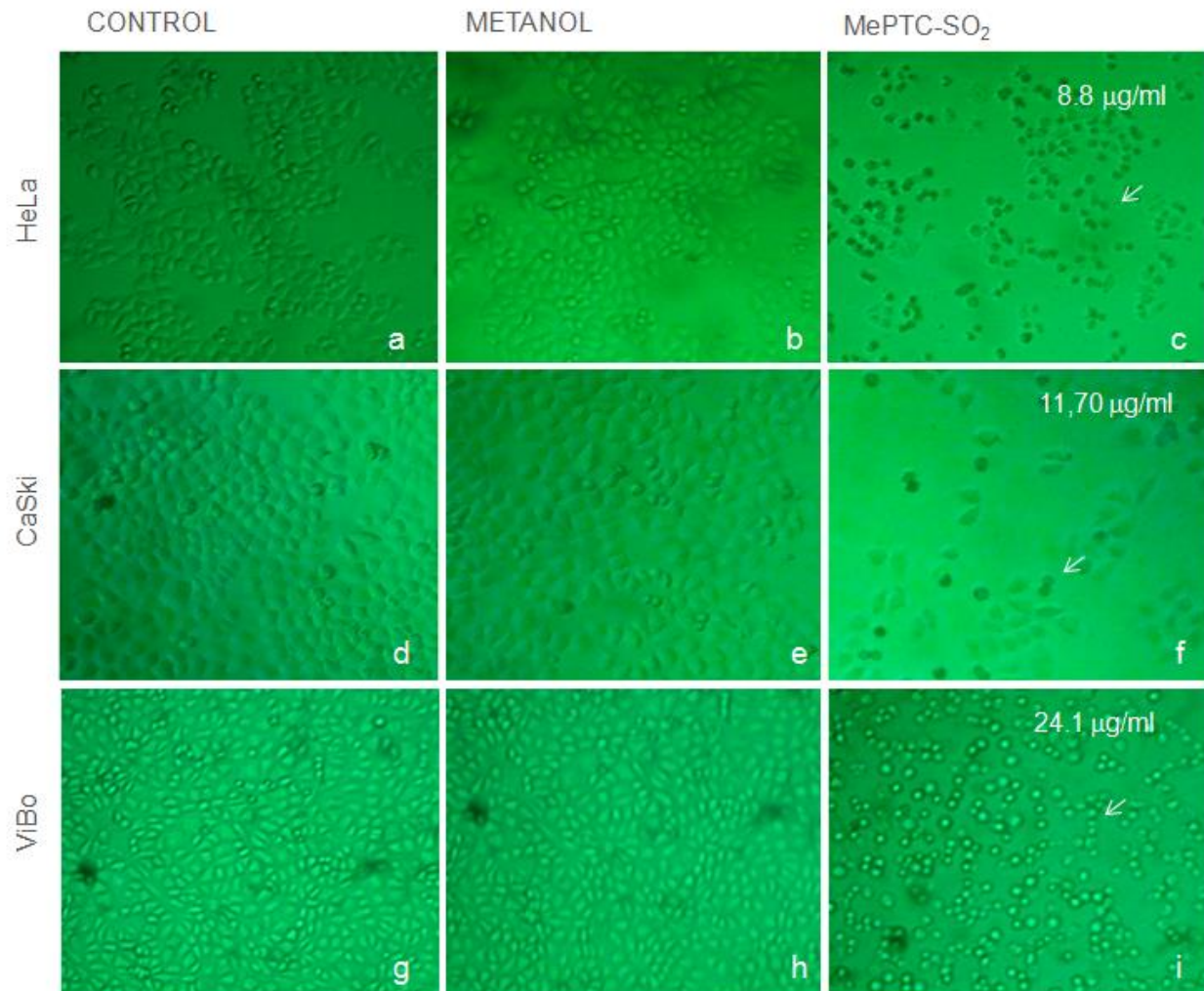


Figura 6. Efecto del MePTC-SO₂ en la morfología celular de cultivos de líneas celulares de CaCu, Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 24 h. Las flechas indican células con pérdida de adherencia. Los cultivos fueron observados en un microscopio invertido con un objetivo de 20X y fotografiadas con un acercamiento de 1.5.

Una vez demostrado que el MePTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo en las líneas de CaCu, es necesario saber el tipo de muerte que está sufriendo la célula, de manera general se conocen dos formas de muerte celular; la necrosis y la apoptosis.

Con la finalidad de establecer si el decremento celular observado en el cultivo celular de las líneas celulares de CaCu, se debe a un efecto del compuesto MePTC-SO₂ y ocasione muerte celular por necrosis, se evaluó la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadante del cultivo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo, las cuales fueron tratadas con las concentraciones 8.8 µg/ml, 11.7 µg/ml y 24.1 µg/ml respectivamente durante 24 h. Como se muestra en la figura 7 las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo a pesar de tener como resultados un porcentaje de LDH, no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos con respecto al control.

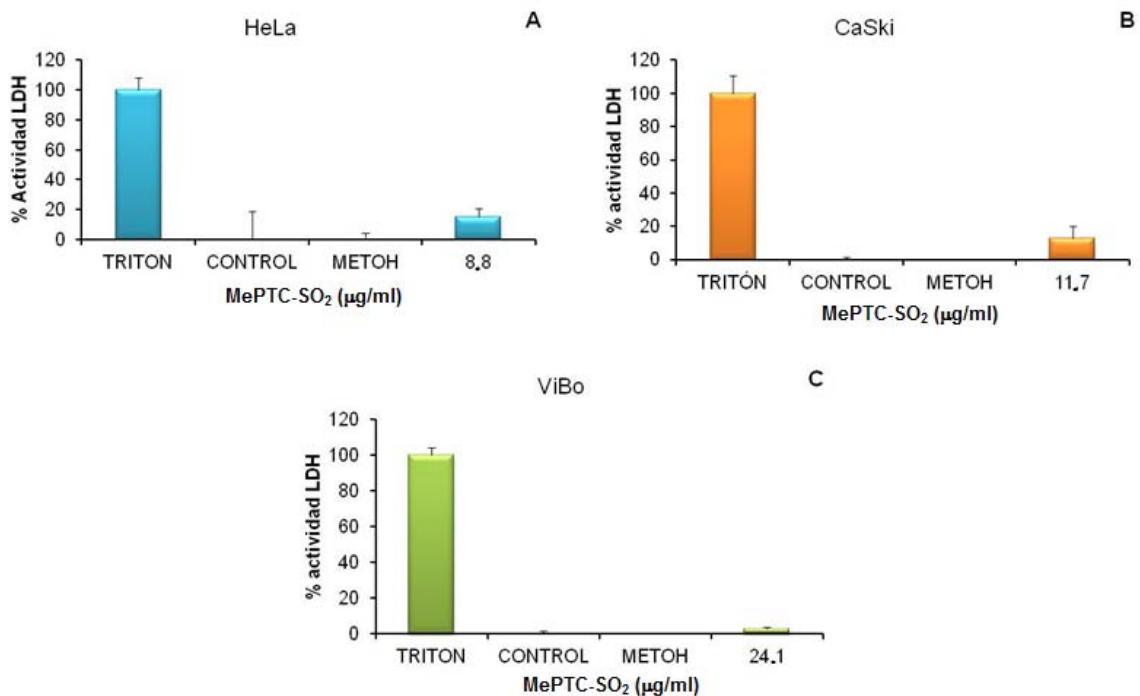


Figura 7. Los gráficos A (línea celular HeLa), B (línea celular CaSki), y C, (línea celular ViBo) muestran la determinación de la actividad citotóxica del MePTC-SO₂ en sobrenadante de cultivos en líneas celulares de CaCu, (HeLa, CaSki y Vibo), las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células/pozo) y tratadas con la CI₅₀ calculada de MePTC-SO₂ para cada línea celular durante 24 h. La muerte celular por necrosis fue medida por la actividad de LDH presente en los sobrenadantes y se expresa en porcentaje respecto al tratamiento con Tritón-X100. * (p < 0.05) vs Control (t- Student).

Para determinar si el compuesto MePTC-SO₂ induce muerte celular por apoptosis, cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con sus respectivas CI₅₀, fueron teñidas con el fluorocromo DAPI para observar en microscopio de epifluorescencia el efecto sobre la morfología nuclear (figura 8). Los cultivos tratados con MePTC-SO₂ presentaron células con formación de cuerpos apoptóticos (CA) observados por contraste de fases; la tinción con DAPI mostró la presencia de fragmentación nuclear (FN) así como condensación de cromatina (CC).

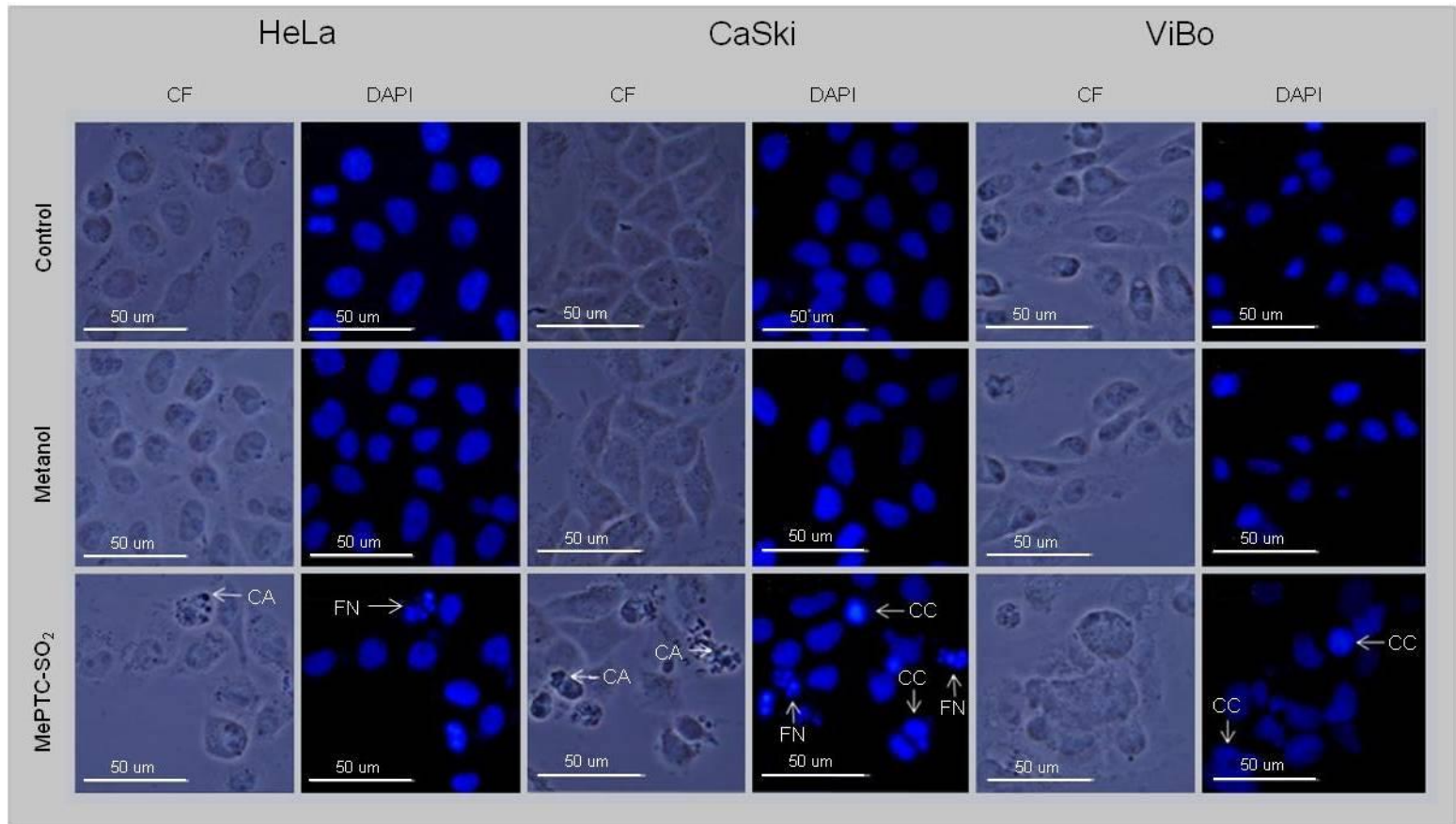


Figura 8. Efecto de MePTC-SO₂ en la morfología celular y nuclear en las líneas celulares de CaCu, (HeLa, CaSki y ViBo), Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm² (500,000 células/caja de cultivo), por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con 8.8 µg/ml, 11.7 µg/ml y 24.09 µg/ml, (IC₅₀) correspondiente a cada línea celular durante 24 h dando un tiempo total 48 h. Células sin tratamiento (control); células tratadas con 1 % de metanol; células tratadas con la CI₅₀ correspondiente a la línea celular de CaCu (MePTC-SO₂); CF: fotografías en contraste de fases permite observar características morfológicas de las células; observando formación de cuerpos apoptóticos; fotografías de epifluorescencia células teñidas con DAPI se observa fragmentación nuclear y condensación de cromatina. Las flechas indican: CA: cuerpos apoptóticos; CC: condensación de cromatina; FN: fragmentación nuclear

Los datos anteriores indican daño celular, en el cual se observa condensación del citoplasma, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos; lo cual es consistente con muerte celular por apoptosis, y para corroborarlo se realizó la determinación de caspasa 3 activa en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con sus respectivas CI₅₀ por 24 h. En los datos obtenidos (figura 9) se observa un incremento en la expresión de caspasa 3 activa en los cultivos tratados con MePTC-SO₂ hasta en un 37 %.

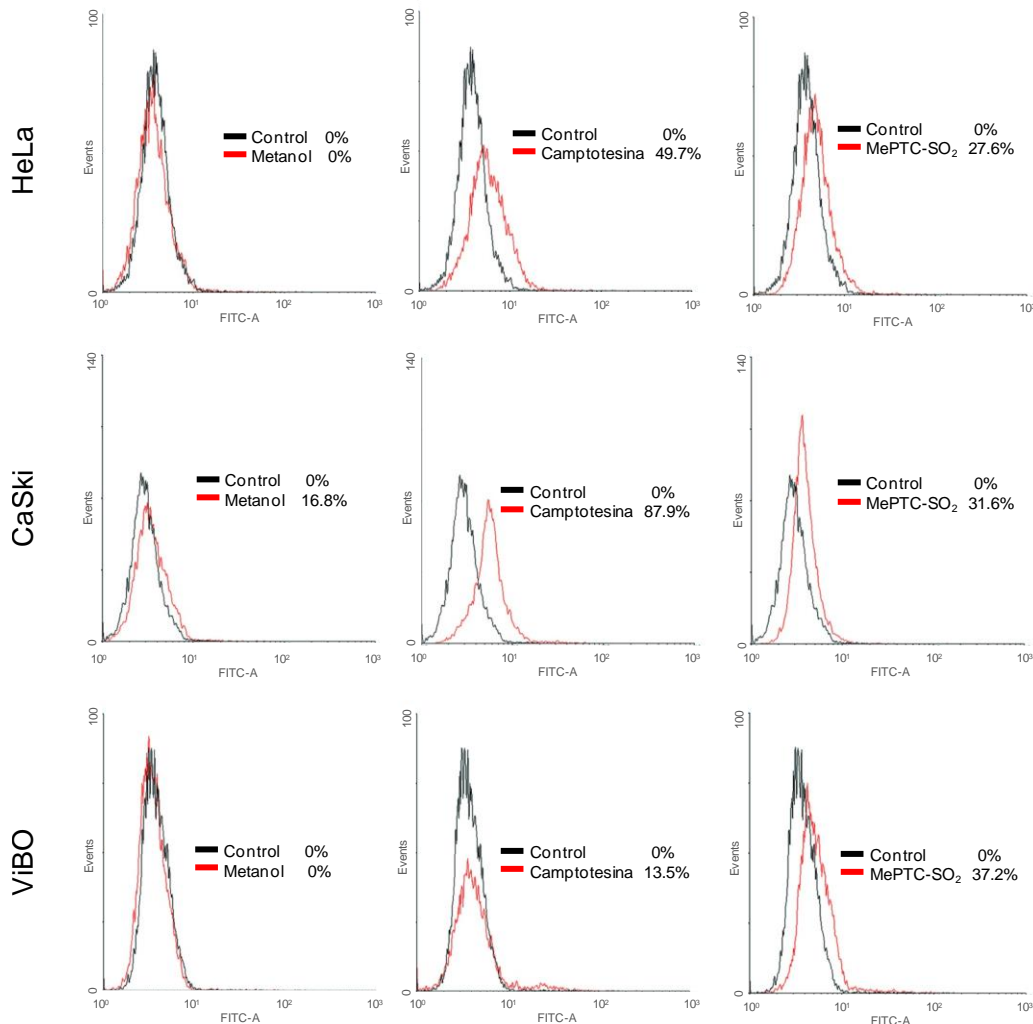


Figura 9. Evaluación de Caspasa 3 activa células en CaCu (HeLa, CaSki y ViBo), Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (50,000 células/pozo y tratadas con 8.8 µg/ml, 11.7 µg/ml y 24.1 µg/ml, (CI₅₀) correspondiente a cada línea celular. Control: células sin tratamiento; camptotesina: control positivo (máxima expresión de Caspasa 3 activa en el ensayo); Metanol: células tratadas con 1 % de metanol; (MePTC-SO₂): células tratadas con la CI₅₀ correspondiente a la línea celular de CaCu. Los cultivos fueron cosechados, fijados e incubados con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, para finalmente ser evaluadas por citometría de flujo.

Con la intención de determinar si el MePTC-SO₂ afecta a las células linfocíticas provenientes de sangre periférica, cultivos de estas células fueron tratadas con las concentraciones de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 y 25 µg/ml de MePTC-SO₂, rango establecido dentro del cual se encuentran la concentraciones que corresponden a las CI₅₀ calculadas de las células tumorales, se evaluaron los cambios morfológicos de la células y su potencial proliferativo por citometría de flujo. En la figura 10 se muestra que el tratamiento con MePTC-SO₂ a las concentraciones de 6.25 a 25 µg/ml no permite la formación de colonias de activación, lo cual repercute en el potencial proliferativo de estas células, tal como se muestra en la figura 11, donde los datos de proliferación indican que hay un descenso hasta de 64.3 puntos porcentuales en cultivos tratados con MePTC-SO₂.

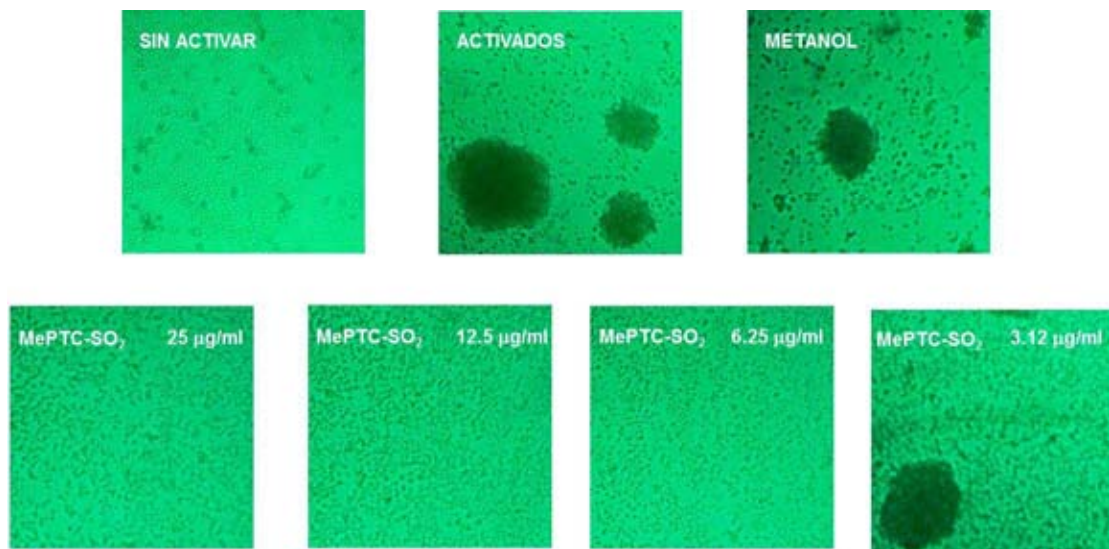


Figura 10. Efecto del MePTC-SO₂ en la morfología celular de cultivos células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (200,000 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 72 h; Control sin activar: marcadas con CFSE pero sin fitohemaglutinina; Control activados: células marcadas con CFSE y activadas con fitohemaglutinina; Metanol: células tratadas con 1 % de metanol; los cultivos fueron observados en un microscopio invertido con un objetivo de 20X y fotografiadas con una cámara fotográfica digital marca SONY con acercamiento de 1.5 veces.

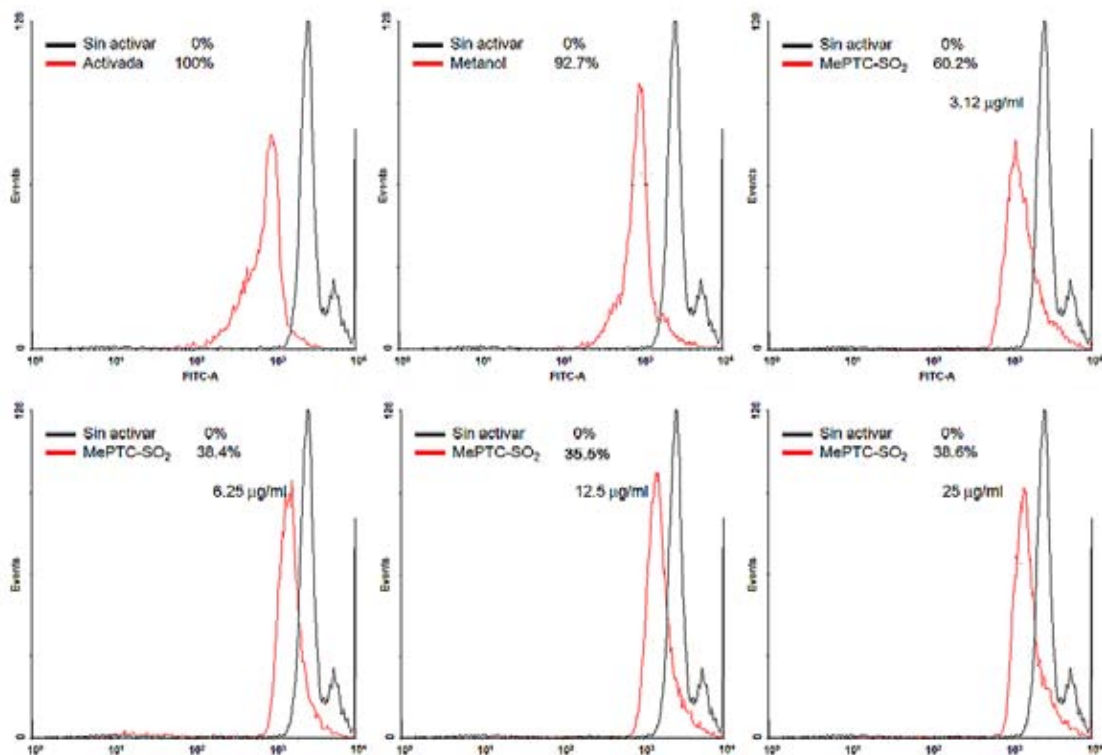


Figura 11. Efecto del MePTC-SO₂ sobre el potencial proliferativo de cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (200,000 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 72 h; Control sin activar: marcadas con CFSE pero sin fitohemaglutinina; Control activados: células marcadas con CFSE y activadas con fitohemaglutinina; Metanol: células tratadas con 1 % de metanol; posteriormente fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 2 % y fueron evaluadas por citometría de flujo.

Dado que el compuesto MePTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas, se procedió a determinar si existe un efecto de muerte celular necrótica en estas células (figura 12), encontrándose que en el rango de 3.12 a 25 µg/ml no se presenta actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de estas células.

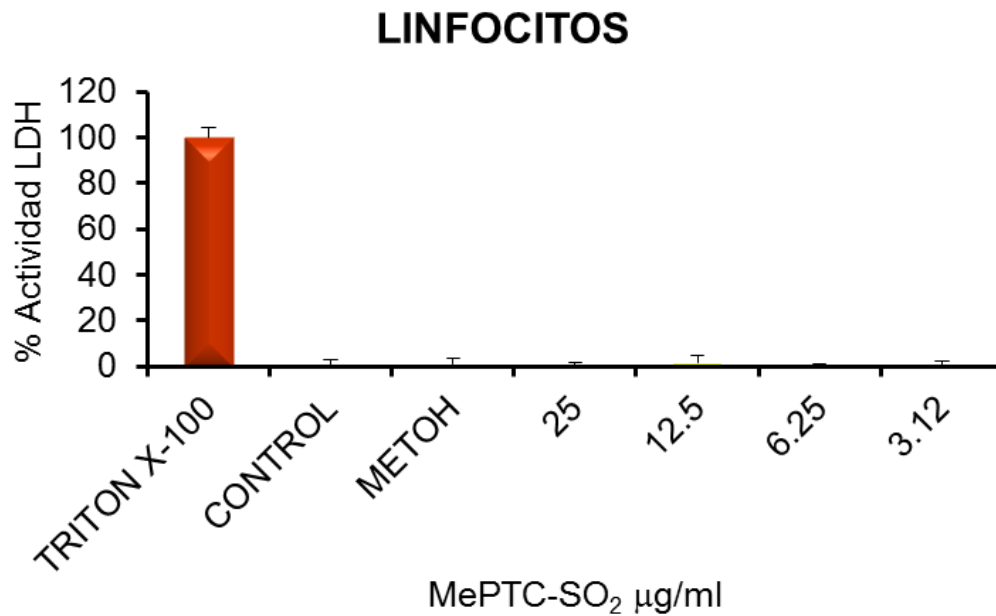


Figura 12. Efecto del MePTC-SO₂ sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (200,000 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 72 h. Los sobrenadantes se colectaron y se les determinó actividad de la enzima LDH. El control tritón X-100 se tomó como el 100 % de actividad. ($p < 0.05$) vs Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Con el propósito de establecer si el MePTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células fibroblásticas de cérvix humano, fueron tratadas con 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 y 25 µg/ml de MePTC-SO₂ rango establecido dentro del cual se encuentran la concentraciones que corresponden a las CI₅₀ calculadas de las células tumorales, el número celular fue determinado por la técnica de tinción de cristal violeta. Los datos mostrados en la Figura 13 muestran que el compuesto MePTC-SO₂ induce una disminución del número celular de cultivos de células fibroblásticas, desde la concentración de 3.12 µg/ml con un 24 % de decremento hasta la concentración de 25 µg/ml con un decremento del 86.5 %, al calcular la CI₅₀ para estas células se determinó en 8.22 µg/ml, la cual está muy cercana a la de las células HeLa.

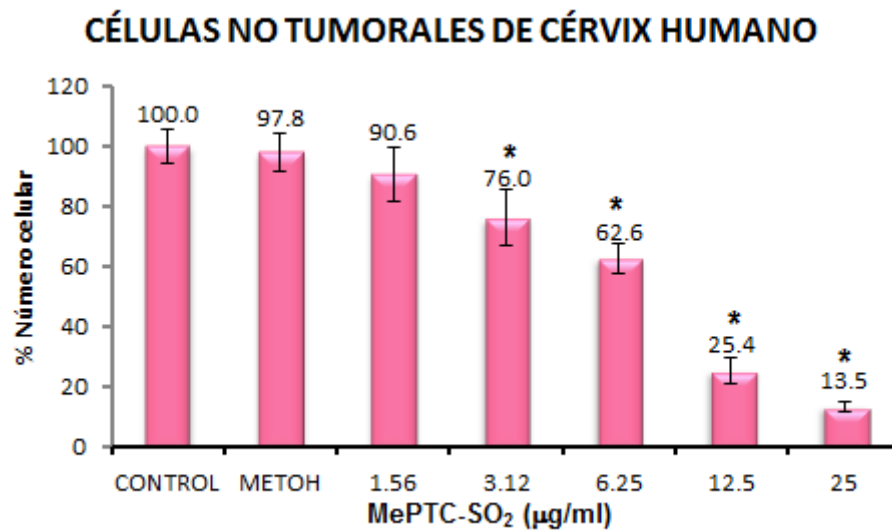


Figura 13. Curva dosis-respuesta donde se observa el efecto del MePTC-SO₂ sobre el potencial proliferativo en cultivo de células no tumorales de cérvix humano. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células/pozo) con las diferentes concentraciones de MePTC-SO₂ durante 56 h. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de cristal violeta. *(p < 0.05) vs Control (ANDEVA seguida de prueba de Tukey)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la actualidad el cáncer cervicouterino se encuentra como una de las principales causas de muerte (INEGI, 2011). Existen diversas alternativas de tratamientos para combatir esta enfermedad, entre otros la quimioterapia, pero resultan ser pocos selectivos, tóxicos, costosos e ineficientes en estadios avanzados, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

El disulfiram se ha aprobado como un fármaco y utilizado para el tratamiento del alcoholismo por más de 50 años, tiene una farmacología muy bien documentada, se considera una sustancia relativamente no tóxica cuando se administra en dosis terapéuticas (Vallejo *et al.*, 2009).

Resientes investigaciones describen que los Ditiocarbamatos (DSF, metabolitos y sus análogos), tienen diversas actividades biológicas en células de diferentes tipos de cáncer, como inhibición proteosomal en células tumorales (Chen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Buac *et al.*, 2012), reducen la viabilidad celular y crecimiento tumoral (Chen *et al.*, 2006; Chiba *et al.*, 2014) además de presentar la capacidad de inducir apoptosis (Cen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012). De igual forma los ditiocarbamatos son capaces de interactuar con el Cu²⁺ formando complejos, incrementando su actividad inhibidora del proteosoma e inductora de apoptosis (Chen *et al.*, 2008; Buac *et al.*, 2012;), así también actuando como de radio sensibilizador en células de cáncer (Rae *et al.*, 2013).

Se ha descrito que el DSF es rápidamente metabolizado, por lo que sus metabolitos son posiblemente los responsables del efecto antitumoral; tales metabolitos pueden llegar a presentar una amplia gama de modificaciones estructurales, además de forma sintética se pueden obtener derivados o análogos de éstos. En estudios donde se evalúa la actividad biológica de los Ditiocarbamatos se ha demostrado que afectan el potencial proliferativo de células de cáncer de melanoma, mama, próstata, ovario, glioblastoma y neuroblastoma en un rango concentraciones de CI₅₀s: 0.026-16 nmol/ml (Cen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006; Yip *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Mucka *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Rae *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el DSF tiene actividad en líneas celulares de CaCu, afecta el potencial proliferativo a concentraciones CI₅₀s: 0.23, 0.22 y 0.26 nmol/ml para las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo respectivamente (Raya, 2013); el MePTC-SO análogo del MeDTC-SO, metabolito del DSF, compuesto más parecido estructuralmente al análogo analizado en este trabajo; reduce el potencial proliferativo en células HeLa y CaSki, con una CI₅₀ de 155.28 nmol/ml (Camacho, 2010). A diferencia del análogo MePTC-SO₂ evaluado en esta investigación, se determinó una concentración menor (CI₅₀) para las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, de 8.8, 11.7 y 24.1 µg/ml (equivalentes a 49.71, 66.10 y 136.15 nmol/ml, respectivamente).

Se observa de acuerdo a los datos obtenidos, que el análogo MePTC-SO₂ disminuye el potencial proliferativo en líneas celulares CaCu de manera dependiente de la concentración. Es decir, al aumentar la concentración

del compuesto, se puede apreciar una disminución del número celular. Estas concentraciones resultan ser altas comparadas con las reportadas para DSF, pero menores si se compara con los resultados reportados para el análogo MePTC-SO, (Camacho, 2010), en el cual solo se reportan datos para las líneas celulares HeLa y CaSki; en éste trabajo, además se realizó en la línea celular ViBo (Negativa al VPH) y en la cual el MePTC-SO₂ se obtiene una CI₅₀ de 24.1 µg/ml (136.15 nmol/ml).

Estudios previos demuestran que el DSF es inductor de apoptosis y necrosis para una amplia gama de líneas celulares de cáncer *in vitro e in vivo* (Wang *et al.*, 2003, Cen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Lin, *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2011). Los ditiocarbamatos dañan a las células tumorales induciendo a muerte celular (necrosis y apoptosis) y el tipo de muerte varía en cada tipo de celular.

Reportes recientes describen que el DSF induce apoptosis en células de melanoma humano metastásico (células 46A-C81, C81-61) tratadas a una dosis de 0.084-0.168 nmol/ml; El DDTC (Dietilditiocarbamato sódico) en líneas de melanoma c81-46A a una dosis de 1.44 nmol/ml; El PDTTC (Pirrolidina ditiocarbamato) causa efecto apoptótico en células de cáncer de mama (MCF-7), y en células de cáncer ovario (OVA-14, Cauv-1, OVP-10, MDAH2774 Y SKOV-3) en un rango de concentraciones que fluctúan entre 10-20 nmol/ml (Chen *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2010; Mucka *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que se ha reportado cambios en la morfología de núcleo relacionados con la apoptosis, al tratar las células tumorales con DSF (Chen *et al.*, 2006), en este contexto, el MePTC-SO₂ produce cambios en la morfología de núcleos en células de CaCu, al aplicar las concentraciones determinadas para cada línea celular (CI₅₀), además con la tinción con DAPI se logró observar condensación de cromatina, compactación nuclear y fragmentación nuclear, en relación con estos cambios nucleares se detectó la formación de cuerpos apoptóticos.

Además de observar núcleos con características apoptóticas, el MePTC-SO₂ produce expresión de Caspasa 3 activa, siendo un conjunto de resultados que indican que el MePTC-SO₂ produce muerte por apoptosis, lo cual concuerda con la aseveración que propone a los ditiocarbamatos como antitumorales en base a la capacidad de inducir apoptosis, ya que conservan esta actividad con mayor o menor efecto a pesar de las modificaciones estructurales realizadas; coincidiendo con los resultados reportados para el MePTC-SO en la expresión de Caspasa 3 activa y la fragmentación de ADN en células de CaCu (Camacho, 2010).

El DSF induce a una muerte celular por necrosis en células de melanoma metastásico (c83-2c) a la concentración de 0.084 nmol/ml (Cen *et al.*, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos para el DSF (Raya, 2013), al evaluar la enzima LDH, como parámetro de muerte celular por necrosis, en células de CaCu (HeLa, CaSki y ViBo) un 34.51, 4.45, y 0% respectivamente. En el caso particular del MePTC-SO₂ al ser evaluado para la detección de enzima LDH en sobrenadante en medio de cultivo se obtiene como resultado en las líneas celulares HeLa y CaSki, y ViBo el 15, 13 y 2.7 % LDH respectivamente. Con estos resultados obtenidos es evidente que el MePTC-SO₂ produce menor efecto necrótico en células de CaCu.

Es conocido que los tratamientos contra el cáncer cervicouterino actúan de manera no selectiva, ya que afectan a células tumorales como a no tumorales, afectando así entre otras a células del sistema inmune, es por esta razón se evaluó el MePTC-SO₂ aplicando un rango de concentraciones en las cuales se encuentran las CI_{50s} que abaten el potencial proliferativo en células tumorales: 3.12, 6.25, 12.5, y 25 µg/ml.

El MePTC-SO₂ presenta efecto antiproliferativo en las células linfocíticas de sangre periférica humana en las dosis de 6.25, 12.5 y 25 µg/ml. Concentraciones cercanas a las CI₅₀ de las células tumorales a la concentración de 3.12 µg/ml el potencial proliferativo empieza a recuperarse en un 60.2 %. Al evaluar muerte celular por necrosis no se encontró actividad de la enzima LDH en medio de cultivo, esto indica que la disminución del potencial proliferativo no se debe a un efecto que conduzca a muerte celular por necrosis. De igual manera al evaluar el efecto del MePTC-SO₂ sobre cultivos de células fibroblásticas, se encontró una disminución en el número celular a concentraciones de 3.12 a 25 µg/ml.

El compuesto MePTC-SO₂ presenta mayor actividad en comparación a el MePTC-SO, sin embargo ambos son menos activos que el DSF, el MePTC-SO₂ favorece un efecto apoptótico por sobre la necrosis que se aprecia en el DSF, sin embargo presenta un efecto antiproliferativo en cultivos primarios de células no tumorales.

CONCLUSIONES

- ◆ El compuesto MePTC-SO₂ disminuye el potencial proliferativo de las células HeLa, CaSki y ViBo de manera dependiente de la concentración con una CI₅₀ de 8.8, 11.7 y 24.1 µg/ml respectivamente.

- ◆ El compuesto MePTC-SO₂ no indujo liberación de LDH de manera significativa hacia los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con las concentraciones de 8.8, 11.7 y 24.1 respectivamente; en cultivo de linfocitos no hubo presencia de la enzima de LDH a una concentración de 25 µg/ml.

- ◆ El compuesto MePTC-SO₂ induce muerte celular por apoptosis, ya que al evaluar la presencia de caspasa 3 activa en las líneas celulares de CaCu, éstas fueron positivas en un 27.6, 31.6 y 37.2 % para HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, así también fue positiva la formación de cuerpos apoptóticos.

- ◆ El MePTC-SO₂ inhibe el potencial proliferativo de las células linfocíticas de sangre periférica humana y de células fibroblásticas no tumorales de cérvix humano de manera considerable en un 61.4% y 86.5% a la concentración de 25 µg/ml respectivamente, no presentó actividad selectiva en cultivos de células no tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Watson, D. (2006). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. España. 1024 p.
- Alonso P., Lazcano E. y M. Hernández. (2000). *Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control*. Medica Panamericana. México. 254 p.
- ATCC (2012), Product details. Cell biology: CaSki y HeLa. Consultada: el 25 agosto 2012. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/ta>
- Becker, W., Lewis, J., y Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula*. 6ª edición. Editorial Pearson, España. 1008 p.
- Bolsover S. R., Hyams, J.S., Shephard, E.A., White, H. A. y Widemann, C.G. (2004). *Biología celular*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York. 531p.
- Bolsover S. R., Hyams, J.S., Shephard, E.A., White, H. A. y Widemann, C.G. (2007). *Biología celular*. 2ª edición. Editorial Acriba. Zaragoza. 477p.
- Buac, D., Schmitt S., Vento G., Rani K F., and Dou Q. P. (2012). Dithiocarbamate-Based Coordination Compounds as Potent Proteasome Inhibitors in Human Cancer Cells *Chem. October ; 12(12): 1193–1201*
- Camacho, Z. E. (2010). *Efecto antitumoral del S-Metil- pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México, D.F., 58 p.
- Cen, D., González, I. R., Buckmeier, A. J., Kahlon, S. R., Tohidian, B. N., y Meyskens L. F. (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: A Redox-related Process. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, pp. 197–204.
- Chen, D., Cui, Q. C., Yang, H. y Dou, P. (2006). Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug y copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Research*, 66, pp. 10425-10433.
- Chiba T, Suzuki E, Yuki K, Zen Y, Oshima M, et al. (2014) Disulfiram Eradicates Tumor-Initiating Hepatocellular Carcinoma Cells in ROS-p38 MAPK Pathway-Dependent and -Independent Manners. *PLoS ONE* 9(1): e84807. doi:10.1371/journal.pone.0084807.

- Cooper, G. M. (2002). La célula. Marbán. Madrid. 716 p.
- Daniel K., Chen D., Orlu S., Cui Q., Miller F. y Q. Dou.(2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Reviews*. 7: 897-908.
- Degterev, A. y Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 9, pp. 378-390.
- Della, R. F., Cucciolla, V., Borriello A., Della, P. V., Manna, C., Galletti. P. y Zappia, V. (2000). Pyrrolidine Dithiocarbamate Induces Apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, pp. 942-946.
- Di Chen, Qiu Zhi Cindy Cui, Huanjie Yang, y Q. Ping Dou. (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 Res*. 70: pp. 10425-10433.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *The Biochemical Society*, 110, pp. 525-541.
- Gogvadze, V., y Orrenius, S. (2006). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact*. Vol.163, pp.4-14.
- Gourley M. and J. Williamson. (2006). Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Drugs Aging* 17:249-255.
- Guang-Yaw L., Norbet F., Helmut B. y L. Jen-Kun.(1998). Induction of apoptosis by Thiuramdisulfides, the Reactive Metabolites of Dithiocarbamates, through coordinative Modulation of NFκB, c-fos/c-jun, and p53 proteins. *Molecular Carcinogenesis*. 22:235-246.
- Guo X; Xu B; Pandey S; Goessl E; Brown J; Armesilla A; Darling J. y Wang W; (2010). Disulfiram/copper complex inhibiting NFκB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Letters*, 290 (1): 104-113.
- Hernández, V.J.M.V. (2004). Determinación de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y la de su derivado 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico-uterino HPV-18: CaLo, HeLa e InBl'' Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México, D.F., 60 p.
- Hidalgo, M. (2006). El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed*, Vol. 17, no. 1, pp.81-84

- Hyun-Ji, C., Tae-Sung Lee, Jae-Bok Park, Kwan-Kyu Park, Jung-Yoon Choe, Doo-Il Sin, Yoon-Yub Park, Yong-Suk Moon, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, Sang-Mi Han, Young-Su Cho, Myeong-Rak Choi, Nam-Gyu Park, Yun-Sik Lee y Young-Chae Chang. (2007) Disulfiram Suppresses Invasive Ability of Osteosarcoma Cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J. Biochem Mol Biol.* Vol. 40, No. 6, pp. 1069-1076
- Imagen 1: Esquema de las fases del ciclo celular, tomada de preujct.cl/biologia/curtis/libro/img/10-5. Consultada 25-agosto-2012.
- Imagen 2: Esquema de dos tipos de muerte celular, tomada de www.nature.com/html. Consultada 25-agosto-2012.
- INEGI (2011). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 22 de octubre del 2012. Disponible en: HYPERLINK "<http://www.inegi.gob.mx>" www.inegi.gob.mx
- Karp, G. (2006). *Biología celular y molecular*. Mc Graw-Hill. México D.F. 899 p.
- Kim Young Tae and Zhao Min (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. *Yonsei Medical Journal* Vol. 46, No. 5, pp. 597 - 613,
- Klug, W. S., Cummings, M.R., y Spencer, C.A. (2006). *Conceptos de genética*. 8ª edición. Prentice Hall. Madrid. 920p.
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., et al. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer*; 128: pp. 927-935.
- Lin, J., Haffner, M.C., Zhang, Y., Lee, B.H., Brennen, W.N., Britton, J., Kachhap, S.K., Shim, J.S., Liu, J.O., Nelson, W.G., y Yegnasubramanian, S. (2011). Carducci MA. Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *Prostate*; 71(4): pp. 333-43.
- Liu P., S Brown, T Goktug, P Channathodiyil, V Kannappan, J-P Hugnot, P-O Guichet, X Bian, AL Armesilla, JL Darling and W Wang, (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
- Lizarbe, M. A. (2007). El Suicidio y la Muerte Celular. *Rev.R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* Vol 101, no. 2, pp.1-33
- Lomanto, L. D., Ortiz, O.L., Bretón, C.O., Gómez, A.I. y Mesa, V.M. (2003) El ciclo celular. *MEDUNAB*; 6(16): pp. 21 – 29.

- López, O.M. (2009). Síntesis de algunos sulfóxidos y sulfonas como potenciales inhibidores de la betaína aldehído deshidrogenasa de *pseudomonas aeruginosa* Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México, D.F., 74 p.
- Macarulla, M., Ramos, F. y Taberno, J. (2009). Comprender el cáncer. AMAT. Barcelona. 118 p.
- Monroy, G., Rangel, C., Rocha, Z., Trejo, B., Ramírez, G., Martínez, R., y Weiss-Steider. B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. Revista Mexicana de Oncología, Vol. 7, pp.69–76
- Morgan, S., y Darling, D. (1993). Cultivo de las células animales. Editorial Acriba. España, 159 p.
- Mućka J. A., Jacek Sieńko, Lukasz Zapała, Rafał Wolny and Witold Lasek. (2012) Synergistic cytotoxic effect of sulindac and pyrrolidine dithiocarbamate against ovarian cancer cells. ONCOLOGY REPORTS 27: 1245-1250,
- Muños,N. & X.Bosh.1997.Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. Salud Publica.Mèxico.39:174-282.
- Oh H, Bang JS, Choi HM, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. (2010). Fetal bovine seru requirement for pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptotic cell death of MCF-7 breast tumor cells. Eur J Pharmacol.; 649:135–139.
- OMS (2009). Estadísticas de mortalidad. Consultada el 4 de febrero de 2013. www.who.int/es.
- OPS (2013) Datos y estadísticas. Situación de Salud en las Américas: Indicadores Básicos de Salud 2013. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2470&Itemid=2003&lang=es . 22 de octubre del 2012
- Paniagua, Gómez-Álvarez, R., Nistal, M. M., Sesma, E. P., Álvarez-Uria Rico-Valdemoro, M., Fraile, L. B., Anadón Álvarez, R., y Sáez-Crespo, F. J. (2007). Biología Celular. 3ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. 539 p.
- Pardo, F. (1998). Anatomía patología general y especial de las neoplasias. España: Científico-Médico. 1226 p.
- Porter, A., y Urbano., A. (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? Bioessays 28: pp. 834-843.
- Rae, Colin and Tesson, Mathias and Babich, John W and Boyd, Marie and Sorensen, Annette and Mairs, Robert J (2013).The role of copper in disulfiram-induced toxicity and radiosensitization of cancer cells. The Journal of Nuclear Medicine, 54 (6). pp. 953-960. ISSN 0161-5505

- Raya J., (2013). Efecto antoproliferativo, citotóxico inductor de muerte del disulfiram en líneas celulares de cáncer cervicouterino
- Ryan C. and G. Wilding. (2000). Angiogenesis inhibitors. New agets in cancer therapy. *Drugs Aging*.17:249-255.
- Salazar, M., Peralta, C. y Pastor, F.J. (2009) Tratado de Psicofarmacología: bases y aplicaciones clínicas. 2da edición. Buenos Aires, Madrid: Medica Panamericana
- Sánchez, S. V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev Cubana Invest Biomed*, 20(4), pp. 266-74.
- Shen, H., y Pervaizs, S. (2006). TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution, *Faseb J.*, Vol. 20, pp.1589-1598.
- Shine-Gwo, S., Yu-Rung Kao, Felicia Ying-Hsiueh Wu, y Cheng-Wen Wu (2003). Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol* 64: pp. 1076–1084.
- Solomon, P., Berg, R., y Martin, W. (2008). *Biología*. 8va edición, Editorial Mc Graw Hill, México, 1234 p.
- Stevens, A. y Lowe, J. (2001). *Anatomía patológica*. 2ª edición. Elsevier. España.
- Suneet, S., Zuben E. Saunaa, Rajendra Prasadb, y Suresh V. Ambudkara. (2004). Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322. pp. 520–525.
- Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. y G. Borges. (2005). Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública México*; 47:342-350.
- Velázquez, M., Andrade, M., Lagunas, M., y Zajgla M. (2004), SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis, *Vol 23*, no. 2, pp.64-70.
- Wang W; McLeod H. y Cassidy J; (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF-κB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 104 (4): 504-511.
- Wickström, M., Danielsson, K., Rickardson, L., Gullbo, J., Nygren, P., Isaksson, A., Larsson, R. y Löuborg, H. (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*, 71, pp. 25-33.

- Wynne, J.H., Jensen, S. D., y Snow, A. W. (2003). One-Pot Synthesis of S-Alkyl Thiocarbamates. *J. Org. Chem*, Vol. 68, No. 9, pp. 3733-3735
- Yakisich, J. S., Sidén, A., Eneroth, P. y Cruz M. (2001). Disulfiram is a potent in vitro Inhibitor of DNA topoisomerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, pp. 586-590.
- Yip NC., Fombon IS., Liu P., Brown S., Kannappan V., Armesilla AL., Xu B., Cassidy J., Darling JL., and Wang W., (2011). Disulfiram modulated ROS–MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties *British Journal of Cancer* 104, 1564 – 1574
- Yu Z, Wang F, Milacic V, et al. (2007). Evaluation of copper-dependent proteasomeinhibitory and apoptosis-inducing activities of novel pyrrolidine dithiocarbamate analogues. *Int J Mol Med.*; 20:919–925.
- Zaldívar-Machorro V. J., López, O. M., Demare, P. R., Regla, I. y Muñoz C. R.A. (2011). The disulfiram metabolites S- ethyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate bateine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie* 93: pp. 286-295.

APÉNDICE**Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).**

Componente	g/l
Sales Inorgánicas	
Cloruro de Potasio – KCl	0.4
Cloruro de Sodio – NaCl	6
Fosfato de Sodio Dibásico (Anhídrido) - Na ₂ HPO ₄	0.8
Nitrato de Calcio tetrahidratado - Ca(NO ₃) ₂	0.1
Sulfato de Magnesio Anhídrido - Mg SO ₄	0.4884
Aminoácidos	
Glicina	0.01
L-Ácido Aspártico	0.02
L-Ácido Glutámico	0.02
L-Arginina	0.2
L-Asparagina	0.05
L-Cisteína 2HCl	0.0652
L-Fenilalanina	0.015
L-Hidroxiprolina	0.02
L-Histidina	0.015
L-Isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina HCl	0.04
L-Metionina	0.015

L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
L-Tirosina 2Na*2H ₂ O	0.02883
L-Treonina	0.02
L-Triptofano	0.005
L-Valina	0.02
Vitaminas	
Ácido D-Pantoténico (hemicálcica)	0.00025
Ácido Fólico	0.001
Ácido p-Aminobenzoico	0.001
Cloruro de Colina	0.003
D-Biotina	0.0002
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Otros	
D-Glucosa	2
Glutation (reducido)	0.001
Rojo Fenol Na	0.0053
Adicionado	
L-Glutamina	0.3

Medio de cultivo

Para 1 L de medio de cultivo, se agrega 10.34 g de medio RPMI-1640 y 2 g de Bicarbonato de sodio (NaHCO₃; Sigma-Aldrich, USA) que es disuelto en 0.8 L de Agua bidestilada. Con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos, los medios nutritivos deben ser suplementados con antibióticos; en este caso fue agregado 1 mg/ml de antibiótico Pengesod: bencilpenicilina (In vitro, Méx.). El pH es ajustado a 7.2-7.2 con Ácido clorhídrico (HCl; Sigma-Aldrich, USA) 10 Normal o Hidróxido de sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) al 1 %. Finalmente es esterilizado por la técnica de filtrado al vacío a través de una membrana (Millipore) con poro de 22 µm y se almacena a 4°C.

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes (HeLa y CaSki) y funciona como agente quelante que atrae iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.40 g (SIGMA, U.S.A)
Etilen- diamen- tetra- acético (EDTA)	0.40 g (SIGMA, U.S.A)

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

Tripsina

La solución es utilizada para la disgregación del tejido y el desprendimiento de las células tumorales ViBo. Para su preparación es pesado 100 mg de tripsina (Sigma-Aldrich, USA) y es disuelto en 200 ml de verseno en condiciones estériles.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato mono-ácido de sodio	2.16 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato di-ácido de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)

El Cloruro de Sodio, el Cloruro de Potasio, el Fosfato mono-ácido de sodio y el Fosfato di-ácido de potasio se disuelven en 100 ml de H₂O bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 1 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g. de NaOH y 4.28 ml. de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada, y por último se filtra usando papel Whatman núm. 2. Se almacena a temperatura ambiente.

Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 40 ml. para su mejor uso y manipulación.

Glutaraldehído (1.1 %)

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2 %)

Paraformaldehído al 2 % de PBS (preparado al momento, para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60 °C, si rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no sirve para fijar)