



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimental Zaragoza. (UMIEZ) LAB. 2, P.B.

**“Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica
del S-Metil, N,N dietiltiocarbamato (Me-DTC)
en líneas celulares de cáncer
cervicouterino”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Edgar Vázquez Salazar

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Sánchez Sánchez

Ciudad de México 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **VÁZQUEZ SALAZAR EDGAR**, con número de cuenta **309261816**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **21 de febrero de 2017** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE M. en C. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del S-Metil, N,N dietiltiocarbamato (Me-DTC) en líneas celulares 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”

Ciudad de México, a 10 de enero de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



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

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

*A mis padres la Sra. Adela Salazar y el Sr. Edgar Vázquez.
Gracias por su esfuerzo y trabajo, esta meta es absolutamente de
ustedes, siempre les estaré infinitamente agradecido por haberme
dado las herramientas y apoyo para llegar hasta esta instancia.
A Jennifer y Tonatiuh porque desde su llegada, son un motivo
más para seguir adelante.*

“Nuestra lealtad es para las especies y el planeta. Nuestra obligación de sobrevivir no es solo para nosotros mismos sino también para ese cosmos, antiguo y vasto, del cual derivamos”

-Carl Sagan

Gracias por su amistad, nunca conocí una confianza como la de ustedes, ahora y siempre nos quedaremos hasta la mañana y prometeremos luchar por nuestro destino. Emilio, Fernando, Antonio, Georgina, Lizz, Alberto, Magie, Maricarmen, Daniel, Fernanda, lesly, Ivonne, Mariano, Juan Manuel.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Sánchez, por proporcionarme la oportunidad así como todos los recursos y conocimientos que ayudaron a mi formación profesional.

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

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández, por compartir conmigo sus conocimientos, herramientas y consejos que sin duda alguna fueron indispensables para poder realizar este trabajo. Muchas gracias.

Al Dr. Hugo López, por compartir su invaluable conocimiento que ayudó a enriquecer mi trabajo.

Al la Dr. Rosalva Rangel Corona y a la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez, porque sus observaciones contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (Laboratorio N° 2, Planta Baja del edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ)), con apoyo de los proyectos PAPIIT: IN 222114, IN 220916 y los proyectos CONACyT 255881 y 253979

Abreviaturas.

ADN	Acido desoxirribonucleico.
Apaf-1	Del inglés: Apoptosis protease-activating factor-1.
APC	Del inglés: Adenomatous Polyposis Coli.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATM	Gen Ataxia Telangiectasia Mutado.
ATP	Adenosín trifosfato.
Bax	Del inglés: Bcl-2-associated X protein.
Bcl-2	Del inglés: B-cell lymphoma 2.
CaCu	Cáncer cérvicouterino.
CD40	Del inglés: Cluster of Differentiation 40.
Cdc20	Del inglés: Cell-division cycle protein 20.
Cdk	Del inglés: Cyclin-dependent kinases.
CIP	Del inglés: Cdk-Interacting Protein.
DAPI	Del inglés: 4',6-diamidino-2-phenylindole.
DED	Del inglés: Death-Effector domain.
DR5	Del inglés: Death receptor 5.
E2F	Factor de transcripción que activa genes para la progresión del ciclo celular.
FADD	Del inglés: Fas-Associated protein with Death Domain.
Fas	proteína con un dominio citoplasmático de muerte celular.
FasL	Del inglés: Fas Ligand.
FITC	Del inglés: Fluorescein Isothiocyanate.
FLIP	Del inglés: FLICE-Like Inhibitor Protein.
HER2	Vía de señalización protooncogénica.
IAPs	Del inglés: Inhibitors of apoptosis.
CI50	Concentración inhibitoria del 50%.
INK4:	Del inglés: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors.
KIP	Del inglés: Kinase inhibitor protein.
K-Ras	Del inglés: Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog.
L1	Genes de expresión tardía del VPH.
LCR	Del inglés: Long Control Region.
L-Myc	Factor de transcripción de protooncogenes.
MAPK	Del inglés: Mitogen-activated protein kinases.
NF-1	Del inglés: Neurofibromatosis-related protein.
NFkB	Del inglés: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.
PBS	Del inglés: Phosphate Buffered Saline.
pRB1	Familia de proteínas supresoras de tumores.
Pre-RC	Complejo Prerreplicativo.
Puma	Del inglés: p53 up-regulated modulator of apoptosis.
Rb	Proteína del Retinoblastoma.
RPMI	Del inglés: Roswell Park Memorial Institute.
SFB	Suero fetal bobino.
TNF	Del inglés: Tumor necrosis factor.
TNFR-1	Del inglés: Tumor necrosis factor receptor 1.
TRAIL	Del inglés: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.
VPH	Virus del papiloma humano.
WT-1	Del inglés: Wilms Tumor Protein.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	3
• La célula.....	3
• Ciclo celular.....	3
• Necrosis	7
• Apoptosis	7
• Cáncer Cervicouterino	11
• Disulfiram	19
• S-metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC).	22
Planteamiento del problema	23
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivo general	26
Objetivos particulares	26
Método	26
Resultados	32
Análisis de resultados	46
Conclusiones	49
Bibliografía	50
Referencias	54
Apéndice	56

Resumen

En la última década los tratamientos empleados en la lucha contra el cáncer terapéuticamente suelen ser efectivos cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana, sin embargo, cuando éste se detecta en una etapa tardía, los tratamientos resultan ser ineficientes, de baja selectividad y con efectos colaterales graves. Ante este panorama, actualmente se ha implementado la búsqueda de nuevos compuestos, con un mejor perfil toxicológico y selectivo, tal es el caso del Disulfiram y sus metabolitos.

El Disulfiram (DSF) es un fármaco utilizado originalmente en el tratamiento del alcoholismo crónico, donde sus diferentes metabolitos son responsables de dicha actividad biológica. Sin embargo, numerosos estudios le han descrito como una molécula con actividad antiproliferativa y citotóxica en células tumorales. Ante esto, se cree que la actividad antitumoral del Disulfiram posiblemente radique en sus metabolitos. No obstante, se desconoce cuál de estos metabolitos son los responsables de la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis presentes en el Disulfiram. Con el propósito de aportar información para aclarar esta incógnita, la actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de apoptosis del compuesto S-metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC), el cual es un metabolito inicial de la ruta metabólica del Disulfiram, fue evaluada en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo así como en cultivos de células no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica). Los resultados obtenidos demostraron que el Me-DTC afectó la proliferación de las células HeLa, CaSki y ViBo, de una manera dependiente de la dosis, con unas CI_{50} de 455 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 782 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La nula o baja actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) detectada en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con el compuesto, indicó que el decremento observado es causado por un proceso diferente a la muerte necrótica. La positividad a la caspasa-3 activa así como la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas en las células tratadas, establecen que el Me-DTC induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte apoptótica. Con respecto a las células no tumorales, el Me-DTC afecta la proliferación de las células linfocíticas en un 56%, 68% y 96% a 72 h de tratamiento a concentraciones de 455, 782 y 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, sugiriendo que el efecto antiproliferativo del compuesto afecta a células tumorales, así como a células no tumorales. Sin embargo, de menor forma que otros metabolitos del Disulfiram, la nula o baja actividad de la LDH determinada en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos tratados con el Me-DTC, sugiere que el decremento en el número celular es causado mediante un proceso diferente a la necrosis.

Introducción.

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) representa un problema de salud pública al estar entre los primeros lugares de incidencia y mortalidad a nivel mundial. El cáncer cervicouterino, es el segundo tipo de cáncer más común en México y la tercera causa de muerte en todo el mundo (Siegel, 2014). La Prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) en CaCu es de 99.7%, siendo en México los tipos VPH 16 y 18 causantes de más de 75% de todos los cánceres de cérvix (Muñoz *et al.*, 2003).

El cáncer es una enfermedad multifactorial, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, las cuales forman tumores en el tejido circundante provocando la muerte si no es diagnosticado y tratado a tiempo. En el caso del Cáncer cervicouterino, la infección por virus del papiloma humano, parece ser el principal causante de la enfermedad, en la mayoría de los casos, a través de la unión selectiva por parte de proteínas virales E6 y E7 a las proteínas supresoras p53 y Rb, lo que lleva a la proliferación y progresión tumoral.

Los tratamientos utilizados son efectivos cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana de su aparición, sin embargo, cuando se detecta en una etapa tardía, los tratamientos resultan ser ineficientes y altamente tóxicos, siendo nocivos para las células no cancerosas. Esto es, la terapia resulta ser de baja selectividad y con efectos colaterales graves debidos a la radiación o a la alta citotoxicidad de los compuestos aplicados. Este hecho ha generado la necesidad de implementar terapias alternativas. En la actualidad la comunidad científica busca desarrollar y probar compuestos que presenten únicamente afinidad específica a células cancerígenas sin generar citotoxicidad a células no tumorales. Al respecto, el Disulfiram, un compuesto perteneciente a la familia de los ditiocarbamatos, ha tomado importancia como agente potencial contra el cáncer debido a su impacto en los procesos dependientes del cobre y zinc (Wiggins, *et al.*, 2015). Se ha reportado que el disulfiram, así como sus metabolitos tienen actividad quelante sobre dichos elementos, alterando así procesos bioquímicos de señalización celular en células tumorales. Diferentes estudios han demostrado la actividad antitumoral de dicho compuesto, sin embargo, el Disulfiram una vez que entra a torrente sanguíneo, es convertido en diferentes metabolitos, dejando una incertidumbre de cuál metabolito dentro de su ruta metabólica es el que presenta actividad antitumoral. También se desconoce si el Disulfiram y/o sus metabolitos tienen actividad antiproliferativa en células de cáncer cervicouterino. Por ello, este trabajo tiene la finalidad de probar la actividad antiproliferativa, citotóxica (necrótica) y apoptótica del S-Metil, N, N dietiltiocarbamato (Me-DTC), un metabolito intermedio del Disulfiram, en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Marco teórico.

La célula.

Todos los organismos vivos están constituidos por unidades estructurales microscópicas autómatas denominadas células, las cuales en conjunto confieren al organismo un orden jerarquizado, permitiéndole realizar las diferentes funciones para desarrollar la vida.

La célula engloba todas las características de la vida, en su interior se producen numerosos eventos moleculares que le confieren la capacidad para crecer, reproducirse, generar energía y experimentar irritabilidad.

La célula constituye una unidad de organización, de modo que, en el caso de los seres pluricelulares como los humanos, ésta es la unidad morfofisiológica que integra la arquitectura anatómica de un cuerpo.

En el cuerpo humano está formado por más de 10^{14} células, muchas de estas células sufren mutaciones cada día, rompiendo potencialmente los controles sociales. Pero lo que resulta aún más peligroso, es que, una mutación de este tipo puede proporcionar a una célula una ventaja selectiva, permitiendo que se divida más vigorosamente que sus vecinas y se convierta en la fundadora de un clon mutante en crecimiento, mutación que origina un comportamiento no altruista que arriesga el futuro de un organismo, comprometiéndolo a que pueda desarrollar un tipo de cáncer (Alberts *et al.*, 2008). Este mecanismo que le permite a una célula dividirse y proliferar es conocido como ciclo celular (figura 1).

Ciclo celular.

De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “las células sólo provienen de células”, en virtud de lo anterior se desarrollaron las bases que dieron lugar a la teoría celular. Sabemos que las células existentes se dividen a través de una serie de eventos macromoleculares programados genéticamente, dichos eventos conducen a la división celular ordenada y la producción de dos células hijas con un número cromosómico idéntico a la célula madre (Lodish *et al.*, 2005). Las cinasas dependientes de ciclina, (Cdk, del inglés cyclin-dependent kinases) forman junto con las ciclinas los complejos que regulan las diferentes etapas del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2008). Para su estudio, el ciclo celular es dividido en Interfase y fase M.

Interfase:

- Fase G₁: En esta fase la célula sintetiza proteínas esenciales para la maquinaria de replicación, proteínas como el complejo prerreplicativo (Pre-RC) que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación molecular, además al final de esta fase se encuentra el punto de restricción G₁/S el cual es fundamental para determinar si la célula entra irreversiblemente o no al ciclo celular (Alberts *et al.*, 2008). Este punto de restricción está regulado por el factor de transcripción p53 y los complejos Cdk4, Cdk6 y Ciclina D, dichos complejos fosforilan a la proteína Rb permitiendo que esta libere el factor de transcripción E2F el cual estimula la síntesis de Cdk2 y Ciclina E, los cuales forman parte del primer punto de control, este complejo de igual manera fosforila la proteína Rb permitiendo nuevamente la liberación de E2F generando así una retroalimentación positiva que culmina con la activación de genes involucrados en la proliferación y diferenciación, desencadenando la continuidad del ciclo celular a la fase de síntesis.
- Fase de síntesis (S). En esta fase ocurre la duplicación del contenido de ADN celular, tiene el objetivo de sintetizar una nueva copia del material genético. En esta fase el complejo Cdk 2-ciclina A se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación del material genético.
- Fase G₂: en esta fase la célula incrementa su tamaño debido al incremento del metabolismo intracelular, además la célula condensa gradualmente su cromatina. También se encuentra el segundo punto de control, los complejos Cdk1- ciclina A y ciclina B, permiten el paso a través de este punto, en conjunto la actividad de estos dos complejos se denominó Factor Promotor de la Maduración (MPF), el cual interviene induciendo el ensamblaje correcto del huso mitótico y en parte de asegurar que los cromosomas se unan a éste (Alberts *et al.*, 2008), participa de igual modo en la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, finalmente desensambla la envoltura nuclear fosforilando las láminas nucleares, así mismo se encarga de armar nuevamente el citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (Alberts *et al.*, 2008).

Fase M.

- Esta fase del ciclo celular se condensan los cromosomas, la envoltura nuclear se desorganiza y los cromosomas replicados, cada uno constituido por un par de cromátidas hermanas, se unen a los microtúbulos del huso mitótico (Alberts *et al.*, 2008). Posteriormente se lleva a cabo la segregación del material genético en dos células hijas, dicha fase se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Karp *et al.*, 2011). Así mismo se encuentra un tercer último punto de control entre la metafase y anafase, este punto se encarga de revisar que las cromátidas hermanas se separen y que exista una correcta unión de los cromosomas al uso mitótico, dicho evento se desarrolla cuando cdc20 activa APC (del inglés Complejo Promotor de la Anafase) formando un complejo APC-cdc20 cdc20 el cual marca a la securina para su degradación permitiendo que esta libere la separasa la cual ahora puede escindir una de las sub unidades del complejo de cohesinas para que así las cromátidas hermanas se puedan separar (Alberts *et al.*, 2008).

Finalmente, el ciclo celular es el proceso mediante el cual las células regulan su proliferación brindando una perfecta homeostasis al organismo, sucede como producto de fosforilaciones y desfosforilaciones de los complejos de proteínas quinasas dependientes de ciclina, (Cdk). Los reguladores más importantes de las Cdk son las proteínas denominadas ciclinas. La actividad de este complejo aumenta y disminuye a medida que la célula progresa través del ciclo celular permitiendo o inhibiendo el progreso de éste (Alberts *et al.*, 2008).

Esta maquinaria molecular está programada genéticamente, los ácidos nucleicos son las moléculas encargadas de almacenar y transmitir la información genética cada vez que se divide una célula, de una célula madre a una célula hija y cada vez que se reproduce un individuo de generación en generación (Juvé *et al.*, 2014). Dicha información es expresada en forma de aminoácidos los cuales conforman las proteínas como las ciclinas, CDK, CIP, INK4, p53, P16, cdc20, y demás moléculas presentes en el ciclo celular, formando así los componentes necesarios para organizar las estructuras y dinamizando así las reacciones que caracterizan todos los procesos bioquímicos, fisiológicos y metabólicos propios de la vida.

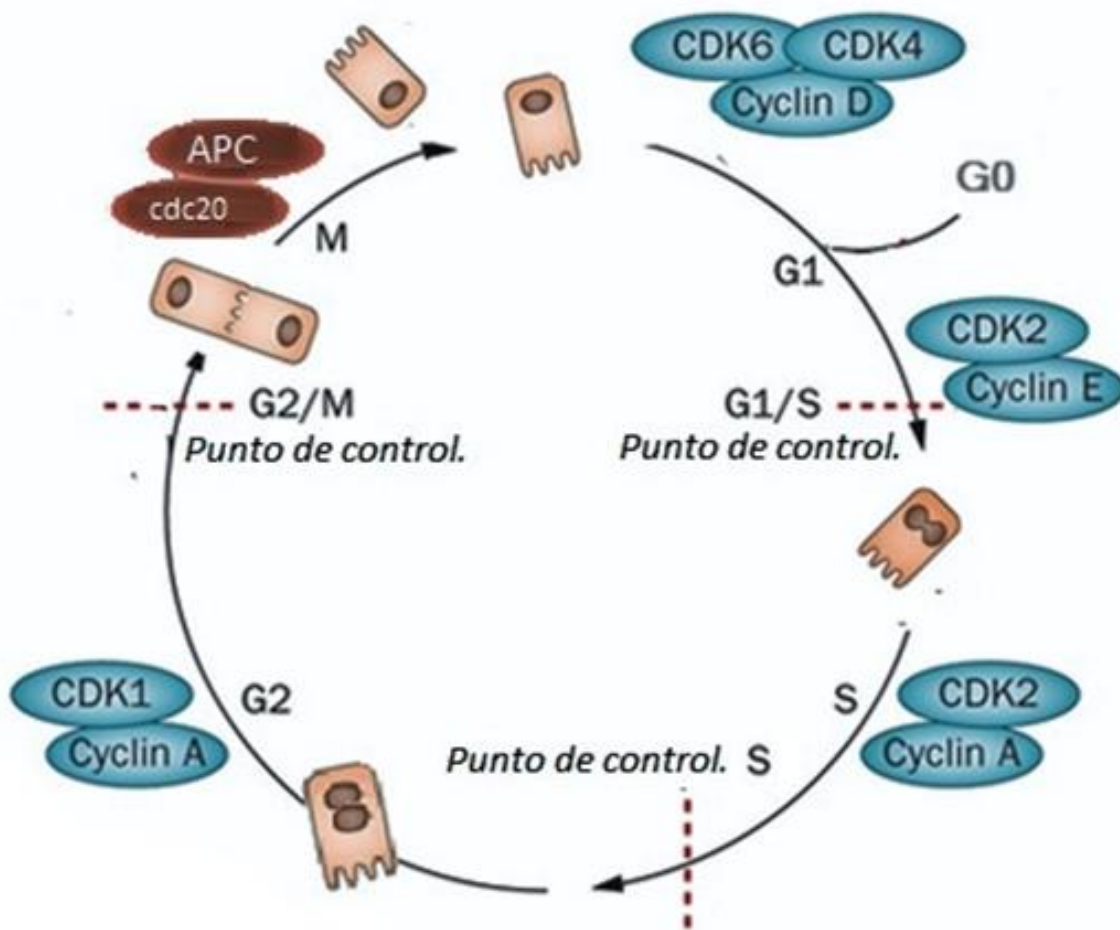


Figura 1. Actividad de las Cdk y ciclinas durante las fases del ciclo celular. El ADN celular se replica en la fase S, y la mitosis celular se produce en la fase M, separados por dos fases, G1 y G2. Existen puntos de control o checkpoint (en inglés) en G1/S y G2/M, donde las acciones de las ciclinas, CDK (quinasa dependiente de ciclina) y sus inhibidores determinan la continuidad del ciclo celular. La importancia de los puntos de control radica que éstos controlan la proliferación celular, evaluando las condiciones extracelulares y señales intracelulares de la célula principalmente el daño genético y fallas en la duplicación del ADN. Modificado de Ferenbach, 2015.

Ante el daño en el material genético, los niveles de p53 son incrementados y una vez que p53 haya completado sus modificaciones postraduccionales, ésta logra su activación estimulando la actividad inhibitoria de las proteínas CIP (p21, p27, p57) y de diferentes KIP (p15, p16, p18 p19), que en conjunto detienen la progresión del ciclo celular.

De esta manera, ante la presencia de daño en el ADN las proteínas ATM/ATR modula señalizaciones a través de fosforilaciones hasta incrementar los niveles de la p53, la cual dependiendo de otras proteínas y factores de transcripción regula diferentes funciones iniciando con la detención del ciclo celular, para posteriormente iniciar la reparación del ADN y si finalmente el ADN no pudo ser reparado con éxito, p53 de igual manera enviará a la célula a apoptosis.

Muerte celular.

La muerte celular es fundamental para mantener el equilibrio homeostático en un organismo, las células mantienen controlado genéticamente su potencial proliferativo en la embriogénesis y el desarrollo de un organismo adulto. Algunas células como las precursoras hematopoyéticas o las epiteliales, experimentan una proliferación constante para dar lugar a diferentes células, gran parte de las células se renuevan constantemente en proceso de “recambio celular” (Herráez, 2012), o bien como resultado final de una lesión celular progresiva. En la naturaleza existe un mecanismo regulado genéticamente y otro incidental no regulado que median la muerte celular, la apoptosis y la necrosis (figura 2).

Necrosis

La necrosis es un proceso patológico ocasionado por estímulos ambientales como lesiones agudas, exposición a sustancias tóxicas, isquemia y radiación ionizante, que sobrepasan la respuesta celular adaptativa de la célula. La necrosis es un proceso que inicia cuando la membrana plasmática de la célula es alterada, permitiendo la entrada pasiva de agua produciendo un flujo anormal de iones particularmente de calcio que en conjunto alteran la membrana celular para finalmente lisa la célula, provocando que ésta libere su contenido intracelular, expulsando las mitocondrias y otros componentes intracelulares con lo que a menudo se induce una respuesta inflamatoria (Ramírez, 2010). Las actividades celulares intrínsecas y los eventos que preceden al colapso celular definen el tipo de daño, sin embargo, existen eventos donde la necrosis coexiste con otros tipo de muerte celular, (Vandenabeele, 2010). La ocurrencia de necrosis incluso en presencia de ATP hace pensar que ésta es un evento menos pasivo y que hasta cierto punto se puede regular la inducción del daño (Ramírez, 2010).

Apoptosis

Se conocen diferentes tipos de muerte celular programada tales como la apoptosis, la autofagia y muerte vesicular no lisosomal (Lodish, 2005). La apoptosis funciona como un mecanismo activado genéticamente, ésta elimina células cuya lesión causada por la radiación, fármacos antitumorales, hipoxia, acumulación de proteínas mal plegadas y virus, no le permiten a la célula continuar con el ciclo celular (Kumar, 2015).

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por la pérdida de los contactos celulares, disminución de la turgencia, translocación de la fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática hacia la capa externa, condensación de la cromatina la cual se fosforila y desensambla la lámina nuclear y posteriormente fragmenta el núcleo mientras que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas (Jiménez 2003), así mismo la presión intracelular generada en el citoplasma y la eventual disociación del citoesqueleto genera o burbujas “*Blebbing*” en la membrana plasmática de la célula (Fackler, 2008).

También ocurre fragmentación del ADN en segmentos específicos que van de 200 a 100 y 50 kilopares de bases para finalmente cortarse cada 180 pares de bases o sus múltiplos, siguiendo los espacios internucleosomales (Elinos, 2003). Así mismo la célula se rompe en varias vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, finalmente los restos celulares son engullidos por las células fagocíticas, macrófagos y células dentríticas (Jiménez, 2003; Alberts, 2008). A nivel bioquímico ocurre la activación de proteasas específicas denominadas caspasas, las cuales se clasifican en tres grupos: I) activadoras de caspasas apoptóticas que incluyen a las caspasas-2, -8, -9 y -10. II) efectoras o ejecutoras de la apoptosis que incluyen a las caspasas -3,-6 y -7 y el grupo III) mediadores de la inflamación que incluyen a las caspasas -1,-4,-5,-11,-12,-13 y -14 (Fan *et al.*, 2005). Para la ejecución de la muerte, las procaspasas efectoras tienen que ser activadas por proteólisis a través de proteínas adaptadoras o mediante la acción proteolítica de otras proteínas usualmente las mismas caspasas (Jiménez, 2003).

Las caspasas existen como proenzimas inactivas y han de ser sometidas a escisión enzimática para activarse. La activación de las caspasas es regulada por miembros de las familias de proteínas Bcl-2 e IAP (Alberts, 2008). El proceso de la apoptosis se divide en una fase inicial durante la cual algunas caspasas se convierten en catalíticamente activas y una fase de ejecución en la que otras caspasas estimulan la degradación de componentes celulares esenciales, la activación de las caspasas depende de un equilibrio muy ajustado entre la producción de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (Kumar, 2015). La apoptosis tiene dos vías de activación; intrínseca y extrínseca.

Vía intrínseca

El daño nuclear inducido determinará la expresión de p53 y su mensaje apoptótico será alentado por las proteínas PUMA, NOXA, Bak, Bax y Bid siempre y cuando supere los niveles de la familia Bcl-2/Bcl-xL antiapoptótica. Cuando se activa p53 se estimula la traducción de p21 (CIP) y bloquea el ciclo celular en la transición de los diferentes puntos de control uniéndose a los complejos Cdk2/ciclina E, Cdk4/ciclina D, Cdk6/ciclina D, Cdk2/ciclina A y Cdk1/ciclina B (Aragón, 2006). Aunado a esto, otro de los inductores más importantes de la apoptosis se encuentra el supresor de tumores p23, la cual tras detectar el daño en ADN abre un periodo en la fase G₁/S durante la cual se puede realizar la reparación de ADN, (Müller, 2008). Cuando el daño en el ADN es irreversible induce la expresión del gen bax, y posteriormente la proteína Bax junto con proteínas de la familia BCL2 proapoptóticas que

inducen la liberación del citocromo c mitocondrial al citoplasma, donde se une a APAF-1 y ATP y procaspasa 9, formando el apoptosoma (Chen G., 2009), el cual activa por autocatálisis a la caspasa 9 activa, que a su vez hidroliza la procaspasa 3 para dar lugar a la caspasa 3 activa (Jiménez, 2003), al mismo tiempo Smac/Diablo de origen mitocondrial inhibe IAP la cual es una proteína antiapoptótica, que al estar inhibida permite el inicio de la cascada de caspasas (Kumar, 2015).

Vía Extrínseca

Los receptores de muerte TNFR-1, Fas, CD40 y DR5 son receptores de muerte que son activados por la unión de sus ligandos o anticuerpos antagonistas (Müller, 2008), dichos ligandos pertenecen a la familia TNF α , tales como FasL que se une a Fas y TNF α que se une a TNFR-1.

En la membrana plasmática podemos encontrar receptores de la familia TNF, en particular Fas, donde la unión de un ligando FasL induce una oligomerización de receptores Fas que activan su dominio de muerte citosólico del tipo DD (del inglés death domains) mediante unión de proteínas adaptadoras citosólicas FADD origina un complejo que puede unir dos moléculas de procaspasa 8 que recíprocamente se autoactivan (Müller, 2008).

Alternativamente el receptor TNFR-1 puede causar también una apoptosis mediante la proteína adaptadora TRADD (Müller, 2008) aunque también recluta otras proteínas que contienen DD como Rip que a su vez recluta a Raidd (Jiménez, 2003) ambas activando el clivaje de la procaspasa 8. Dicha caspasa posee dos regiones DED en su predominio que usa para interactuar con FADD procesándose proteolíticamente a la forma activa (caspasa 8) que escinde la proteína Bid a tBid que participa en la vía intrínseca, finalmente caspasa 8 actúa activando a las procaspasa 3, 6 y 7 para ejecutar la cascada de caspasas y así la muerte celular (Jiménez, 2003).

La regulación de esta vía ocurre a varios niveles, la FLIP inhibe la conversión de procaspasa-8 en su forma activa. Los inhibidores apoptóticos (IAP) inhiben la conversión de procaspasa 3 en su forma activa. Estos efectos pueden superarse mediante las proteínas Smac/Diablo que se libera a partir de mitocondrias (Murray, 2012).

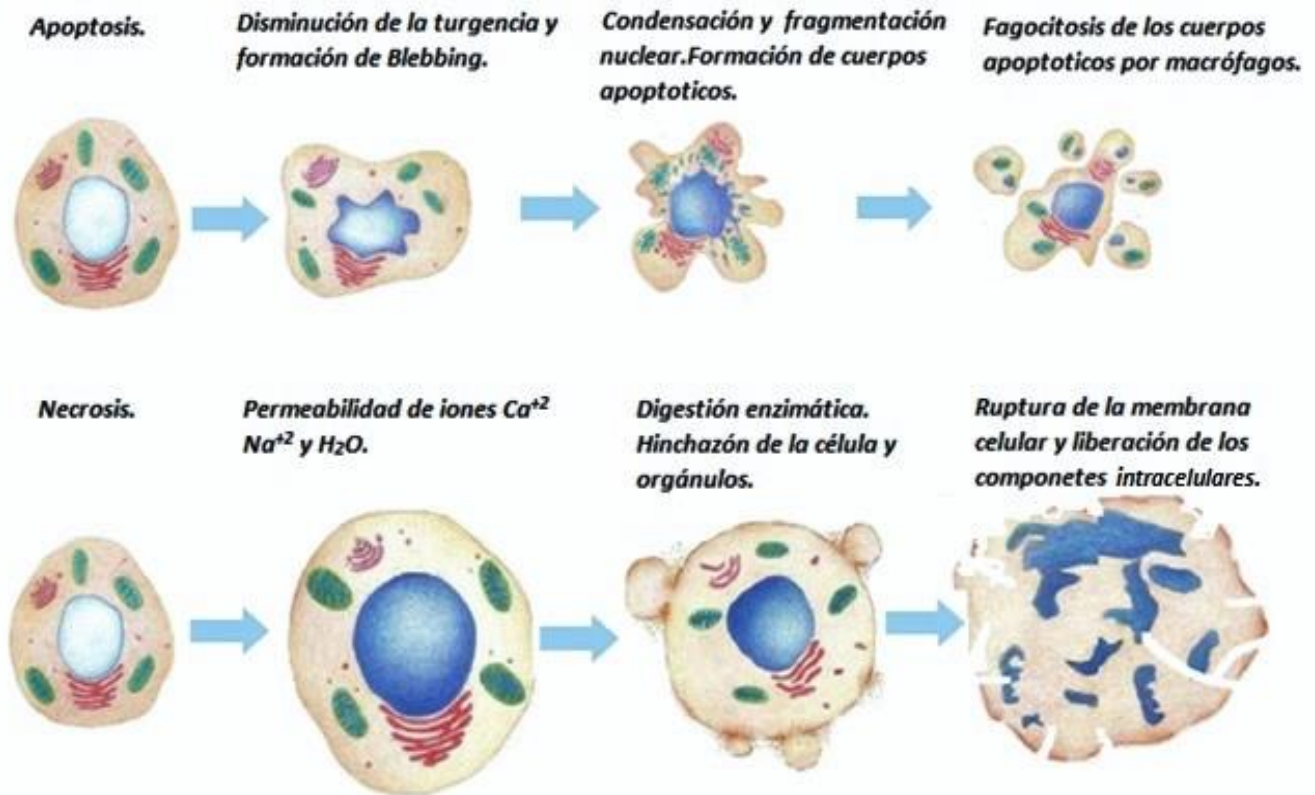


Figura 2. Representación de la muerte celular: apoptosis y necrosis. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular estrictamente regulado y dependiente de energía, comienza con la condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, sin generar respuesta inflamatoria, en contraparte la necrosis es el evento en el cual la célula incrementa su volumen celular debido a la entrada pasiva de agua, provocando lisis celular, vertiendo al exterior el contenido citoplasmático generando una respuesta inflamatoria. Imagen modificada de Monteiro, 2015.

Cuando el ADN es expuesto a carcinogénicos químicos, radiaciones ionizantes, rayos X o virus, es dañado y alterado generando mutaciones, por lo que la célula se ve comprometida a detener el ciclo celular, e intentar reparar el daño génico de lo contrario es enviada a muerte celular, sin embargo, si la célula es capaz de sintetizar el ADN dañado antes de que se repare, ésta puede reproducir los errores génicos en su respectiva progenie, heredando todas las alteraciones en la maquinaria molecular que dirige el ciclo celular produciendo enfermedades degenerativas como el cáncer (Pierce, 2010; Alberts *et al.*, 2008).

Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética en la cual las células experimentan varias alteraciones genéticas que las dota de la capacidad para evitar las señales que regulan la diferenciación, proliferación y muerte celular, como resultado estas células anormales crecen y se diseminan de forma inexorable siendo capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes en lugares donde normalmente no pueden crecer, causando daño local e inflamación.

El ADN contiene secuencias de nucleótidos que forman genes, los cuales codifican productos tales como las proteínas, algunas de estas últimas, son las encargadas de regular la diferenciación, proliferación y muerte celular mediante el ciclo celular.

La radiación ultravioleta, los rayos gamma, las drogas quimioterapéuticas, especies reactivadas de oxígeno y radicales generados por la células como producto normal del metabolismo (Chen, 2009), afectan directa o indirectamente al ADN alterando la secuencias de nucleótidos original, produciendo así proteínas defectuosas.

Tal es el ejemplo de los carcinogénicos químicos como benzopirenos alquitrán, hidrocarburos aromáticos polinucleares, benceno, β -propiolactona, mecloretamina, por mencionar algunos, que producen mutagénesis. Éstos interactúan de manera covalente con el ADN formando aductos, algunos otros son metabolizados por las diferentes especies de citocromo p450 formando sustancias químicas más reactivas de características electrofílicas, que atacan fácilmente grupos nucleófilos en el ADN (Murray *et al.*, 2012). De igual modo la presencia de algunos virus tanto de ADN y ARN en la célula huésped produce cáncer en seres humanos, por ejemplo; el virus de Epstein-Bar que causa linfoma de Burkitt, cáncer nasofaríngeo, el virus de la Hepatitis B y C; carcinoma hepatocelular, herpes virus humano tipo 1; sarcoma de Kaposi y algunos Virus del papiloma humano que generan cáncer de cuello uterino (Murray *et al.*, 2012).

La exposición constante a este tipo de condiciones, desencadena alteraciones en el genoma que pueden afectar protooncogenes y genes supresores de tumores, en los primeros basta una mutación para que éstos se transformen en oncogenes que producen factores de crecimiento y de transcripción por ejemplo; L-Myc, K-Ras, CDK2, CDK4 así como cinasas de proteínas citoplasmáticas, estas proteínas afectan positivamente la proliferación, en contraparte los genes supresores de tumores codifican proteínas como la p53, pRB1, APC, WT-1, NF-1, que detienen la proliferación celular, al ser afectados pierden su función generando proteínas incapaces de detener el ciclo celular (Cooper, 2009).

La importancia de dichos antioncogenes radica en que éstos corrigen los defectos y daños provocados en el ADN sin importar la naturaleza de éste, por ejemplo los daños en el ADN provocan un incremento de la concentración y de la actividad de la proteína p53, proteína supresora de tumores, su papel es primordial en la prevención de proliferación de células

portadoras de mutaciones, puesto que p53 bloquea el ciclo celular en la fase G₁ lo que permite la reparación del ADN antes de entrar a la fase S (Chen, 2009). Así mismo, si el daño no fue corregido produce apoptosis (Alberts et al, 2008).

Es así que podemos entender como el cáncer, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células mutantes, causado por diferentes agentes internos y externos que provocan daño irreversible al material genético de una célula, la cual mediante un proceso carcinogénico recibe señales que promocionan el crecimiento y proliferación mediante factores de crecimiento y otras señales que indican la progresión de una población celular cancerosa a establecer un tumor primario irrigado por la formación de nuevos vasos sanguíneos en un proceso llamado angiogénesis donde a causa de una sobre expresión de de diferentes receptores de crecimiento tales como el PDGF (factor de crecimiento de las plaquetas), ERB-2/HER-2 (factor de crecimiento epidérmico), FCEV (facto de crecimiento vascular) y FCFB (factor de crecimiento de fibroblastos) y la nula presencia de inhibidores de la angiogénesis como la trombospondina y la angiostatina permite el crecimiento e irrigación a un tumor.

En algunos casos las células del tumor adquieren la capacidad reestructurar su propio citoesqueleto y sus moléculas de adhesión para adquirir motilidad, expresando factores que estimulan esta propiedad, tal como lo es el factor autocrino de motilidad o factor “scatter” entre otros. (Arvelo F, 2001), de esta forma las células comienzan un proceso de intravación a la lamina basal empleando enzimas proteolíticas, metaloproteasas, colagenasa IV y glicosilasas (Arvelo F, 2001), introduciéndose al torrente sanguíneo, estas células cancerosas portan mutaciones que les permiten vivir sin señales de adherencia celular, si estas logran evadir el sistema inmunitario y logran asentarse en un vaso o capilar, comienzan a proliferar hasta llegar a lumen del capilar o vaso donde comienzan a secretar enzimas proteolíticas y posteriormente mediante la migración de células endoteliales del vaso sanguíneo, migran hacia el exterior, adquiriendo así de la capacidad de aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo, formando tumores que invaden el tejido circundante.

De acuerdo a la capacidad invasiva los tumores se clasifican en benignos, cuando las células cancerosas permanecen en una única masa de células y malignos cuando las células cancerosas tienen la capacidad de invadir tejido circundante entrar al torrente sanguíneo o vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo. (Jiménez, 2003).

Para su estudio los tumores se clasifican en sarcomas cuyo origen son células del tejido óseo, adiposo, conectivo y células musculares, las leucemias y tumores del sistema nervioso originados en células hematopoyéticas y células del sistema nervioso (Jiménez, 2003) y finalmente los carcinomas los cuales están formados a partir de células epiteliales.

De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI por sus siglas en inglés National Cancer Institute) el 90% de los cánceres humanos pertenecen a este último grupo y de acuerdo al linaje celular tienen un nombre, por ejemplo los adenocarcinomas, que se forman en las células epiteliales que producen fluidos o mucosidad y el carcinoma de células escamosas, que es un cáncer que se forma en las células escamosas, las cuales son células epiteliales que están debajo de la superficie exterior de la piel.

Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un padecimiento en el cual el cérvix desarrolla células tumorales, formando carcinoma de células escamosas, las cuales posteriormente invaden tejido circundante del aparato reproductor femenino causando dolor e inflamación y en algunos casos metástasis. El cáncer cervicouterino, es un problema de salud pública, es la segunda causa de cáncer más común en México y la tercera causa de muerte en todo el mundo (Siegel, 2014). Harald Zur Hausen demostró que la prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) en CaCu es de 99.7%, siendo en México los tipos VPH 16 y 18 causantes de más de 75% de los padecimientos de cáncer cervicouterino (Muñoz *et al.*, 2003). En México, una revisión sistemática reciente reportó datos de prevalencia y distribución de genotipos de VPH en mujeres mexicanas con CaCu obteniendo; VPH 16 (63.1%), VPH 18 (8.6%), VPH 58 y VPH 31 (5%) (Ciapponi *et al.*, 2011). Es por esto que la incidencia de CaCu está estrechamente relacionada con la presencia de VPH, al igual que la radiación ultravioleta, los rayos gamma, las drogas quimioterapéuticas y los carcinogénicos químicos. Sin embargo, de acuerdo con López Saavedra y Lizano Soberón (2006), otros factores de riesgo para desarrollar cáncer cervicouterino son los siguientes: Promiscuidad y actividad sexual a temprana edad, presencia de enfermedades de transmisión sexual; verrugas genitales, coinfección con otros virus, como el del herpes simple (VHS) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpes virus humano tipos 6 y 7 (VHH-6), pareja sexual con cáncer cervicouterino ó de pene y uso prolongado de anticonceptivos orales, la región larga de control, LCR (por las siglas en inglés long control región), en el genoma viral (figura 3), contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroideas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona (López 2006).

Como se mencionó anteriormente el cáncer cervicouterino está relacionado directamente con la infección por virus del papiloma humano, es así que el CaCu posee una etiología viral debido a que ciertas oncoproteínas del virus del papiloma humano (figura. 4) interactúan con la maquinaria celular y la respuesta inmune.

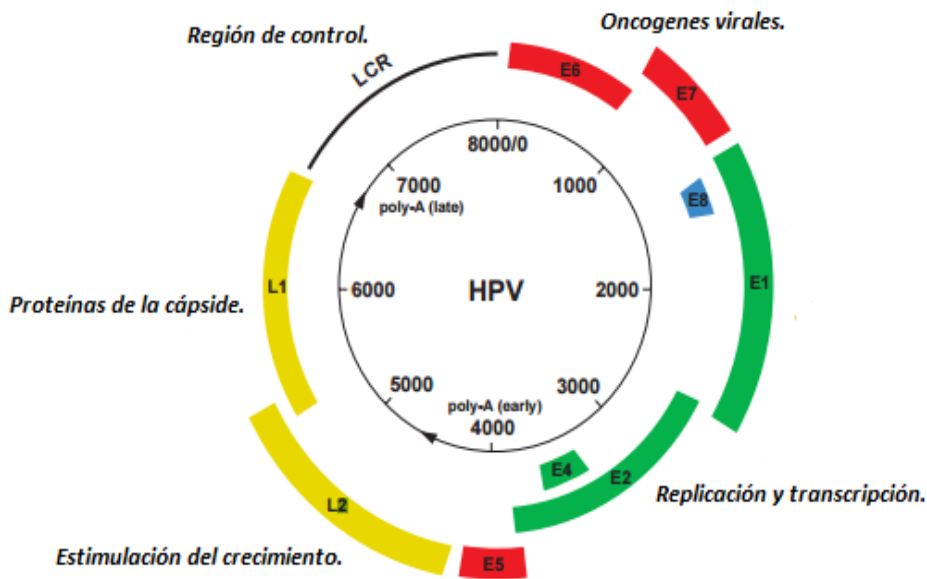


Figura 3. Organización del genoma del virus del papiloma humano. Tomado de Prendiville, 2006.

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia Papovaviridae y se caracteriza por ser un virus que presenta una cápside compuesta de 72 capsómeros, en la cual se encuentra el genoma viral. El genoma del VPH presenta un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb, que está dividido funcionalmente en tres regiones. La primera, contiene una región larga de control no codificante (LCR, por sus siglas en inglés), que presenta sitios de regulación de la replicación y transcripción viral. La segunda es una LCR que codifica para proteínas de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y la tercera es la región tardía L (de su sigla en inglés *Late*) la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 (Beltrán 2014).

El mecanismo de infección comienza cuando las microlesiones de las células de la zona de transformación cervical permiten el ingreso del VPH a través de microabrasiones, posteriormente la internalización del virus a las células del epitelio basal ocurre mediante endocitosis de vesículas asociadas a clatrina (López, 2006), manteniéndose como un elemento extracromosomal en forma de episoma (Manzo, 2014), inmediatamente las proteínas E1 y E2 son expresadas para mantener el DNA viral como episoma y así facilitar la correcta segregación de los genomas durante la división celular (figura 4). Sin embargo, cuando éste se integra al genoma celular se interrumpe la expresión de los genes E1 y E2 (Doorbar, *et al.*, 2012), por lo que el DNA viral pierde su capacidad para mantenerse como elemento extracromosomal, previniendo así la replicación del DNA viral y estimulando al mismo tiempo el crecimiento del tejido celular, con la subsecuente expresión de los oncogenes E6 y E7 principales estímulos oncogénicos codificados por VPH (Manzo, 2014).

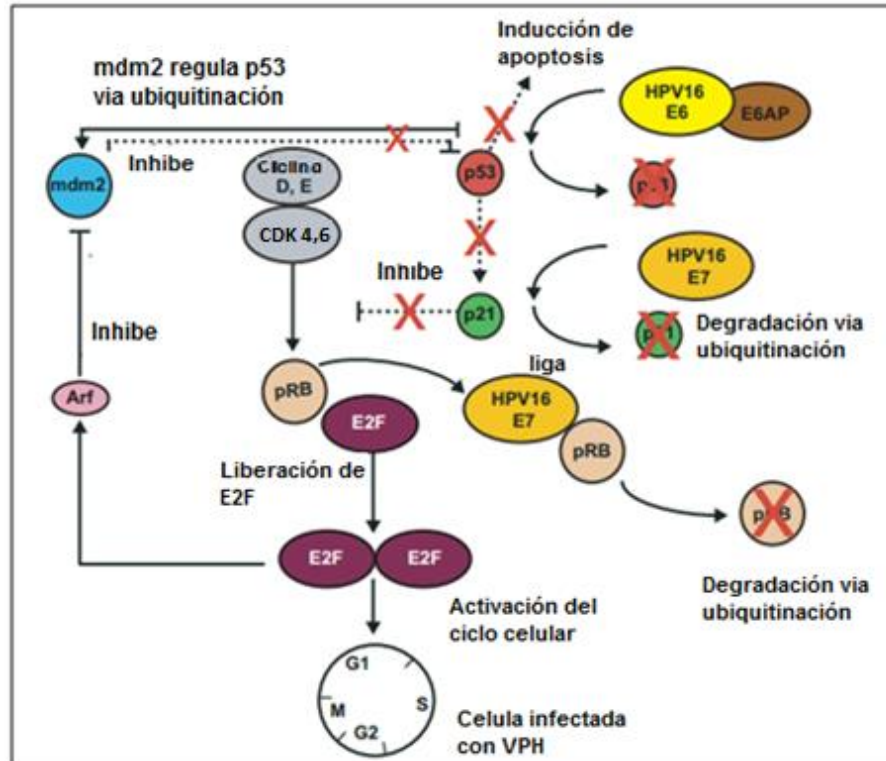


Figura 4. Mecanismo de acción de proteínas virales E6 y E7. Las regiones E6 y E7 del virus son las regiones oncogénicas; E6 compite selectivamente por unirse a p53 ligándose a ella, incrementando así la actividad de la telomerasa produciendo inestabilidad cromosómica y evitando la apoptosis. Por otro lado, E7 se liga a Rb permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F, activando las ciclinas D y E, promoviendo la continuidad del ciclo celular (Muñoz, et al., 2003). Finalmente, la proteína E4 participa en la maduración viral, además de que al interactuar con citoqueratina induce el colapso del citoesqueleto y favorece la liberación del virus. Tomado de Prendiville, 2006.

Una vez iniciada la infección, las células infectadas permanecen en la parte basal del epitelio mientras que las células hijas inician el proceso de diferenciación hacia la parte superior del epitelio (Doorbar, et al., 2012). Es así que la amplificación del genoma viral inicia en un subgrupo de células de las capas superiores del epitelio (figura 5).

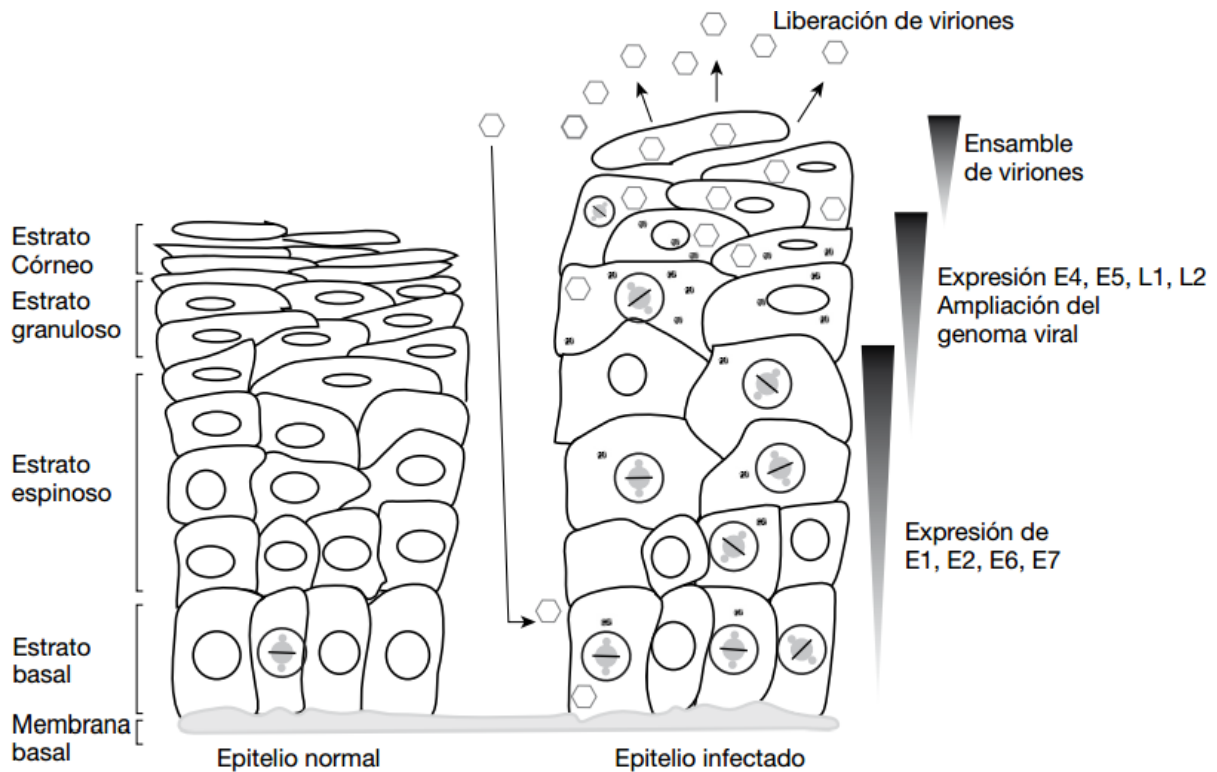


Figura 5. Los Papillomavirus humanos ingresan a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. Posterior a la infección, los genes tempranos E1, E2, E6, E7 son expresados y ocurre la replicación del genoma viral. En las capas superiores del epitelio, el genoma viral eleva su tasa de replicación, y los genes tardíos L1, L2, así como E4 y E5, son expresados. L1 y L2 encapsulan el DNA viral, con lo cual, los viriones pueden iniciar una nueva infección. Imagen tomada de Manzo, 2014.

La replicación continúa de dichas células favorece capacidad transformante debido a la inestabilidad genética causada a partir de la acción permanente de los oncogenes virales al evadir varios puntos de control en el ciclo celular, permitiendo una replicación continua a pesar del daño de material genético, produciendo finalmente células cancerígenas en el tejido.

El cáncer cervicouterino evoluciona a partir de lesiones premalignas no invasivas, referidas como NIC o lesiones intraepiteliales escamosas (LIE). Histológicamente, las alteraciones precancerosas se gradúan de la siguiente forma: NIC I: displasia leve. NIC II: displasia moderada. NIC III: displasia grave y carcinoma *in situ*. Normalmente, las infecciones por VPH son atacadas por el sistema inmune del organismo y sólo una pequeña fracción evoluciona hacia lesiones de alto grado (NIC 2/NIC 3) (Manzo, 2014).

Actualmente existen diferentes tipos de tratamientos para combatir los diferentes estadios del cáncer cervicouterino, sin embargo, en los estadios avanzados como displasia moderada y carcinoma *in situ*, resulta poco eficiente el uso de los tratamientos hasta ahora utilizados.

Tratamientos.

De acuerdo a la Sociedad Americana contra el Cáncer de Atlanta, Georgia, ACS (por sus siglas en inglés American Cancer Society) Los tratamientos más comunes para el cáncer cervicouterino son la cirugía, la quimioterapia y la terapia dirigida.

Cirugía.

- Criocirugía; La criocirugía se utiliza para tratar el carcinoma *in situ* del cuello uterino, pero no un cáncer invasivo. Una sonda de metal enfriada con nitrógeno líquido se coloca directamente en el cuello uterino, esto elimina las células anormales mediante congelación.
- La cirugía con láser se usa para tratar el carcinoma *in situ* del cuello uterino, al igual que la criocirugía no se utiliza para tratar el cáncer invasivo. Un rayo láser es enfocado y dirigido a través de la vagina, se usa para eliminar células anormales o para extraer una pequeña muestra de tejido para su estudio.
- La conización: Una biopsia de cono, se puede utilizar para diagnosticar el cáncer antes de un tratamiento adicional con cirugía o radiación. Se retira del cuello del útero una muestra de tejido en forma cónica, esto se hace utilizando un bisturí o láser. Después del procedimiento, el tejido extirpado se examina bajo el microscopio.
- Histerectomía: Cirugía para extirpar únicamente el cuerpo del útero y el cuello del útero. Los ganglios linfáticos, ovarios, trompas de Falopio, vagina y la pelvis no se eliminan.
- Exenteración pélvica; Esta es una operación más extensa que puede ser utilizada para tratar el cáncer cervicouterino recurrente. En esta cirugía el cuerpo del útero y el cuello del útero son removidos al igual que en una histerectomía radical. La vejiga, la vagina, el recto y parte del colon también puede ser removido, dependiendo de dónde el cáncer se ha diseminado.

Radioterapia

- Radioterapia de haz externo (RHE); apunta rayos X en el tejido canceroso desde el exterior del cuerpo.
- Braquiterapia; Es empleada para tratar el cáncer cervicouterino en mujeres que han tenido una histerectomía, se coloca material radiactivo encapsulado en un cilindro dentro de la vagina, colocando así una radiación cerca del tejido canceroso.

Terapia dirigida

- La terapia dirigida es un tipo especial de quimioterapia que se aprovecha de las pequeñas diferencias entre las células normales y células cancerosas. Por ejemplo, para que los tumores crezcan, deben formar nuevos vasos sanguíneos para mantenerlos alimentados, este proceso se denomina angiogénesis. Algunos fármacos dirigidos bloquean este nuevo crecimiento de vasos sanguíneos.

Quimioterapia

- La quimioterapia sistémica usa medicamentos contra el cáncer que se inyectan vía intravenosa o se administran por vía oral. Estos medicamentos entran al torrente sanguíneo y pueden llegar a todas las áreas del cuerpo, por lo que este tratamiento es útil para atacar células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo. Se administra a menudo en ciclos, con cada período de tratamiento seguido de un período de recuperación; ejemplos: 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, Paclitaxel, Topotecan y Gemcitabina.

Los medicamentos quimioterapéuticos destruyen las células cancerosas, sin embargo, dañan células no tumorales, siendo las más sensibles la que se encuentran en constante división, por ejemplo, al dañar las células de la médula ósea, los recuentos de células sanguíneas pueden bajar lo que puede dar lugar a ciertos efectos secundarios. Los cuales dependen del tipo de medicamentos, la cantidad administrada y la duración con la que son tratados los pacientes. En general los efectos secundarios de la quimioterapia pueden incluir; náuseas y vómitos, pérdida de apetito, pérdida de cabello, llagas en la boca, fatiga, aumento en la probabilidad de infección patológica, sangrado o hematomas después de cortaduras o lesiones menores.

La quimioterapia y la radioterapia frecuentemente comprometen la vida del paciente generando efectos secundarios que demeritan la calidad de vida del paciente debido a que los tratamientos generan reacciones citotóxicas y no selectivas sobre las células no cancerosas. Por lo que se ha generado la necesidad de explorar y buscar diferentes alternativas para el tratamiento del cáncer. Actualmente, se ha encontrado que algunos fármacos presentan otras actividades biológicas, diferentes a las inicialmente reportadas. Al respecto, el Disulfiram, es un compuesto utilizado para el tratamiento del alcoholismo y recientemente se le ha descrito con actividad antiproliferativa en diferentes líneas tumorales, que sugieren que éste podría ser utilizado como un agente antitumoral.

Disulfiram

El Disulfiram (1-dietiltiocarbamoildisulfanil- N, N-dietil-metanol tioamida) o DSF (figura. 6), es un miembro de la familia de los ditiocarbamatos (Lipsky, 2001), compuestos comúnmente usados como plaguicidas (Primo *et al.*, 1995). En la actualidad el principal uso del disulfiram es como auxiliar en el tratamiento del alcoholismo crónico, es reconocido como una de las dos drogas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del alcoholismo.

El Disulfiram inhibe a la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH) causando una acumulación de acetaldehído después de la ingestión de etanol (Mays *et al.*, 1995), al estar bloqueada esta reacción, el acetaldehído incrementa sus concentraciones plasmáticas de 5 a 10 veces, por lo que cuando el disulfiram es suministrado con bebidas alcohólicas en los primeros minutos provoca una serie de malestares como son náuseas, vómito, cefalea pulsátil, rubor, disnea, dolor precordial, sudoración, visión borrosa, vértigos, taquicardia e hipotensión (DynaMed 2015; MedilinePlus 2016).

Entre las actividades biológicas que se le han reportado destacan su capacidad antioxidante, fungicida, bactericida, plaguicida y antiviral (Wynne *et al.*, 2003). De igual forma ha sido sugerido para ser de uso potencial en oncología clínica, en el tratamiento de la dependencia de la cocaína, diabetes tipo 2, trombosis y como agente antimalárico (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2006).

Algunos estudios han demostrado que los compuestos de la familia de los ditiocarbamatos, como el disulfiram, presentan acción antiproliferativa y apoptótica sobre diferentes tipos de líneas celulares tumorales. Se ha descrito muerte celular apoptótica en líneas celulares de melanoma metastásico c81-46a, c81-61, y c83-2C, con CI_{50} s de 25-50 ng/mL (Cen *et al.*, 2002), también se ha reportado actividad apoptótica en la línea celular de cáncer pancreático humana (PANC-1) utilizando 5, 10, 13 μ M de disulfiram durante 24 h. (Dastjerdi, 2013), se han generado estudios que demuestran que en combinación con el cobre (Cu) el Disulfiram induce la actividad de ROS en líneas celulares de melanoma (Cen *et al.*, 2002), e indujo la activación de la caspasas 3 y 7 así como muerte celular por apoptosis en células MDA-MB, con una CI_{50} de 5 μ M (Chen, 2006). Así mismo se ha reportado inhibición de la proliferación celular en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), (Duan, 2014).

En los últimos años se ha generado una estrecha relación entre la propiedad quelante y la actividad antitumoral que presenta el disulfiram, tal es el caso del complejo Disulfiram-Cobre que inhibe la actividad de la vía de señalización NFkB, de igual forma se ha demostrado que este complejo, sensibiliza a las líneas celulares de cáncer MCF7 (mama), H630 y HCT116 (Colon) a 5-fluorouracilo y Gemcitabina de manera citotóxica (Guo *et al.*, 2010).

Debido a que los ditiocarbamatos presentan la capacidad de estabilizar los metales de transición en una amplia gama de estados de oxidación (Ronconi *et al.*, 2006), podemos darnos cuenta que el disulfiram clínicamente ha ganado importancia como un agente potencial contra el cáncer debido a su impacto en los procesos dependientes del cobre y zinc (Wiggins *et al.*, 2015). Una característica fisiológica de muchos tejidos y células tumorales es la tendencia a acumular altas concentraciones de cobre y otros metales traza (Yip *et al.*, 2011). Ante la naturaleza quelante del disulfiram, se cree que la presencia de metales pesados en células tumorales favorece la selectividad y actividad apoptótica del disulfiram (Kenyon, 2005), por ejemplo, el zinc está asociado al desarrollo oncogénico y se ha reportado que inhibe las caspasas en los procesos de apoptosis (Franklin *et al.*, 2009).

Estudios recientes demostraron que en células tumorales de cáncer de mama MCF-7 y BT474 1 μ M el Disulfiram generó una baja toxicidad y aumento significativo de los niveles de zinc endolisosomal (Wiggins *et al.*, 2015), así mismo el DSF deteriora la tumorigenicidad de células HCC (células de carcinoma hepatocelular iniciadoras del tumor) a través de la activación de la vía de ROS-p38 (Chiba *et al.*, 2014), también se ha reportado que 1 μ M Disulfiram en complejo con cobre, produce efecto citotóxico en líneas celulares de glioblastoma multiforme U251MG, U87MG y U373MG con CI_{50} 119.7 nM a 464.9 nM así mismo potencia la actividad citotóxica de la Gemcitabina (Liu, 2012), por otra parte también fue altamente tóxico e indujo la expresión de la proteína Bax y Bcl2 y la activación de la vía MAPK mediante ROS en células madre de cáncer de mama (BCSCs) con una CI_{50} de 200-500 nm en presencia de 1 μ M de Cobre (Yip *et al.*, 2011).

Debido a dicha actividad antiproliferativa, el disulfiram ha sido una molécula de referencia para estudiar la actividad biológica de sus diferentes metabolitos (figura 7), modificando incluso la naturaleza química de éstos, por ejemplo se ha reportado actividad antiproliferativa de Oro (III) pirrolidinditiocarbamato (PDT) sintetizado a partir de ditiocarbamatos, sobre líneas celulares tumorales humanas SAOS-2 (osteosarcoma humano), HeLa (cáncer cervical) y HCT116 (neoplasia de colon, presentando un baja citotoxicidad, obteniendo CI_{50} de 12.2 μ M, 17.7 μ M y 15.8 μ M respectivamente (Nardon *et al.*, 2015).

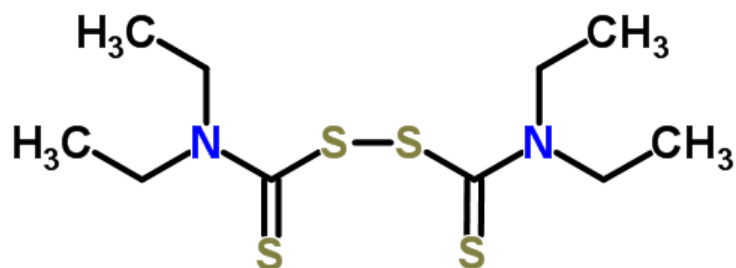


Figura 6. (DSF), 1-(dieltiocarbamoildisulfanil)-N, N-dietyl-metanotioamida. Tomado de Hu et al., 1997.

Se cree que el disulfiram tiene una corta duración *in vivo* para inhibir directamente la ALDH, en su lugar se biotransforma a metabolitos reactivos (Figura. 7) que inhiben la enzima (Mays et al., 1995). Por lo que se cree que la actividad antiproliferativa del disulfiram podría radicar en dichos metabolitos.

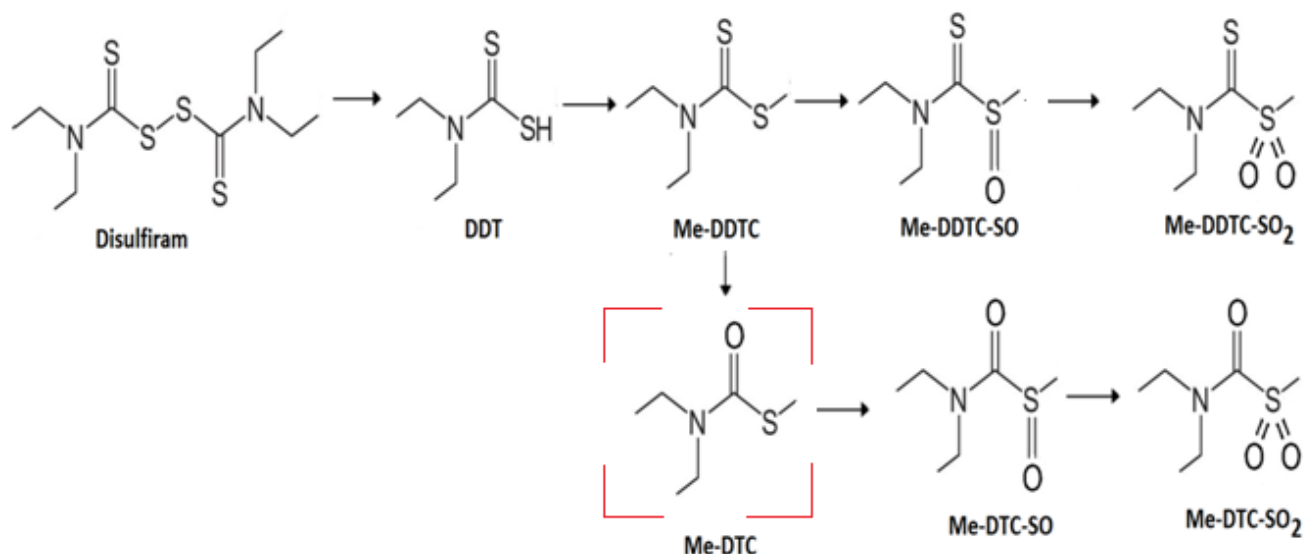


Figura 7. Ruta metabólica del Disulfiram, donde son utilizadas las siguientes abreviaturas: DDT; N,N-dieltiditiocarbamato ácido; el cual, sufre una reacción de metilación para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dieltiditiocarbamato; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el Me-DTC, S-metil-N,N-dieltitiocarbamato; y Me-DTC-SO, S-metil-N,N-dieltitiocarbamatosulfóxido. Modificado de Hu et al., 1997.

Se ha descrito que los metabolitos del disulfiram (figura 7), Me-DDTCSO₂, Me-DTC-SO₂, MeDDTC-SO y Me-DTC-SO han sido empleados como inhibidores de la Betaína aldehído deshidrogenasa del patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* humana (PaBADH) (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2006), por lo que estos metabolitos por si solos también poseen actividad biológica.

S-metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC).

Los metabolitos son compuestos químicos producidos por el metabolismo de los seres vivos, son reconocidos por la actividad biológica que pueden llegar a desarrollar, éstos son clasificados en primarios y secundarios, estos últimos son moléculas de peso molecular menor a 1500 uma, estrictamente no son necesarios para la supervivencia del organismo y por tanto su ausencia no suele ser fatal, caso contrario a los metabolitos primarios (Guarnizo, 2009).

Los metabolitos del disulfiram tiene origen intracelular en las células hepáticas (Mays *et al.*, 1995), el Me-DTC, (S-metil-N, N-dietiltiocarbamato) (Figura. 8) es un metabolito procedente del disulfiram como resultado de la desulfuración oxidativa. Se ha demostrado que los metabolitos del disulfiram inhiben la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa en el metabolismo del alcohol (Mays *et al.*, 1995) por lo que se cree que la actividad antitumoral del Disulfiram posiblemente radique en dichos metabolitos, aunado a ésto y a la característica antiproliferativa y apoptótica del disulfiram, surge la idea de evaluar por separado a los diferentes metabolitos del disulfiram en especial al Me-DTC buscando actividad antiproliferativa, apoptótica y selectiva sobre células tumorales. Es así que el presente trabajo pretende evaluar la actividad antitumoral del S-metil-N, N-dietiltiocarbamato en células tumorales de cáncer cervicouterino.

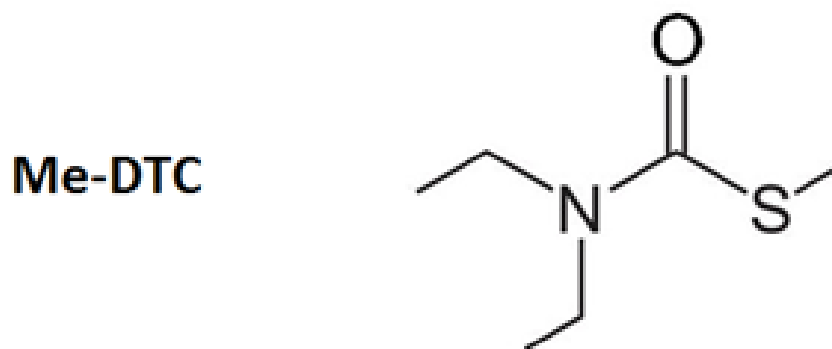


Figura 8. Metabolito generado en los hepatocitos, procedente del disulfiram como resultado de la desulfuración oxidativa y oxidación del S-metil-N, N-dietiltiocarbamato. Modificado de Hu *et al.*, 1997. Sintéticamente fue producido en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM).

Planteamiento del problema.

Controlar la inexorable forma de invasividad de las células tumorales es un procedimiento que involucra el uso de múltiples tratamientos anticancerígenos debido al nulo desarrollado de un método totalmente eficaz para erradicar dichas células.

Una de las principales barreras para vencer el cáncer es la baja selectividad de los tratamientos utilizados, puesto que las terapias actuales resultan ser poco selectivas y de una elevada citotoxicidad en las células tumorales y no tumorales, aunado a esto los fuertes efectos secundarios generados por las distintas formas de radioterapia y quimioterapia demeritan fuertemente la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad. Por lo que es necesario desarrollar compuestos con actividad antiproliferativa, de baja o nula citotoxicidad, e inductores de muerte celular programada (apoptosis y/o autofagia).

Justificación.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, se identifica que a nivel mundial los tumores malignos de mama, pulmón, estómago, colorrectal y cervicouterino son los de mayor incidencia (OMS, 2015). Particularmente en México el cáncer es la tercera causa de muerte en mujeres en edades de 25 a 65 años (INEGI, 2014) siendo el cáncer cervicouterino el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres mexicanas.

De acuerdo a datos del INEGI, La incidencia de cáncer cervicouterino se ha incrementado desde el 2012, donde esta neoplasia ocupaba el cuarto lugar de incidencia, sin embargo, actualmente el cáncer cervicouterino se ha convertido en el segundo tipo de cáncer que se presenta con mayor frecuencia en la población femenina (Siegel, 2014), es así que en México se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (INEGI, 2014), por lo que es de vital importancia desarrollar herramientas que permitan contrarrestar este padecimiento.

Hipótesis.

El disulfiram es un fármaco perteneciente a la familia de los ditiocarbamatos, al cual se le ha descrito con actividad antiproliferativa y citotóxica en células tumorales. Recientemente se ha demostrado que los metabolitos del disulfiram son responsables de inhibir la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa en el metabolismo del alcohol, por lo que se cree que la actividad antitumoral del Disulfiram posiblemente radique en dichos metabolitos. Si el compuesto S-metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC), es un metabolito perteneciente a la ruta metabólica del disulfiram, se espera encontrar actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa CaSki y ViBo.

Objetivo general.

- Determinar si el compuesto **Me-DTC** induce un efecto antiproliferativo, necrótico (citotóxico) y apoptótico en células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Objetivos particulares.

- Determinar si el Me-DTC presenta actividad antiproliferativa en las líneas tumorales de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, expresada como la concentración de compuesto requerido para disminuir en un 50% (CI_{50}) la densidad celular.
- Evaluar el efecto necrótico de las CI_{50} s en las líneas celulares tumorales de HeLa, CaSki y ViBo mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Establecer si el Me-DTC induce muerte apoptótica en células HeLa, CaSki y ViBo, mediante la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas (contracción celular, condensación de la cromatina nuclear, pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, etc.) así como la detección celular de la caspasa 3 activa.
- Valorar si las CI_{50} s inducen muerte celular necrótica en células linfocíticas, mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH).
- Evaluar si las CI_{50} s afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana.

Procedimiento.

Preparación del Stock de S-Metil, N, N dietiltiocarbamato (Me-DTC).

S-metil-N, N-dietiltiocarbamato fue donado por el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Se pesaron 10 mg de S-Metil, N, N dietiltiocarbomato y fueron solubilizados en 90µl de etanol absoluto, obteniendo de esta manera una concentración de 10,000µg/100µL de etanol en un tubo cónico tipo eppendorf de 600 µL el cual se almacenó a 4°C en oscuridad.

Cultivo de líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo.

La línea celular CaSki, deriva de carcinoma epidermoide cervicouterino, fue establecida a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, siendo positiva a VPH 16. American Type Culture Collection (ATCC, 2015). Por otra parte, las células HeLa son procedentes de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2015). Finalmente, la línea celular ViBo, procede de células de carcinoma de estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Dichas líneas celulares se cultivaron en cajas petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/L) y bencilpenicilina (500 000 U/L) (Grunenthal, MEX) al 5% de suero ternera neonata (STN) (Gibco, USA) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío.

Determinación de la concentración de S-Metil, N, N dietiltiocarbomato (Me-DTC) que abate el 50 % de la proliferación celular (CI₅₀).

Se cultivaron las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo en placas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µL de RPMI-1640 al 5 % de STN, por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se estimularon seis pozos por condición. Para cada una de las tres líneas celulares se prepararon concentraciones individuales de 200 hasta 900µg/mL del stock de Me-DTC disueltas en 1mL de RPMI-1640 al 5 % de STN respectivamente. Se utilizó como vehículo etanol absoluto en una concentración de 9µL/1000µL de RPMI-1640 al 5 % de SFB y un control únicamente con RPMI-1640 al 5 % de SFB dejando los estímulos durante 24 horas en la incubadora a 37 °C, al 5 % de CO₂.

Una vez concluidas las 24 horas del estímulo, se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta (Kueng W, 1998), para ello se retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se retiró el

glutaraldehído y se procedió a enjuagar la placa con agua desionizada a continuación se dejó secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta (50 μ L) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Transcurridos los 20 minutos, se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante incorporado en el núcleo de las células es solubilizado con ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Image Tecan Spectra). En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal para la obtención de la concentración que abata el 50 % de la población celular (CI_{50}). Todas las líneas celulares se evaluaron por triplicado.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Se cultivaron las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo en placas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 μ L de RPMI-1640 al 5 % de STN, por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: Dos controles de RPMI-1640 al 5 % de STN, un control con la concentración del vehículo y finalmente la concentración la CI_{50} correspondiente respectiva de la línea celular. Una vez transcurridas 23 horas después de aplicar las condiciones antes mencionadas, a un control positivo le fue sustituido el medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 una vez completado lo anterior se dejó que el ensayo completara las 24 h de tratamiento.

Completadas las 24 horas, la placa es centrifugada a 1500 RPM a $-10^{\circ}C$ durante 10 min, centrífuga (Ortoalresa Digicen 21 R, USA) posteriormente los sobrenadantes de cada una de las condiciones fueron colectados de manera individual y traspasados una placa de 96 pozos, 40 μ L por pozo, para su evaluación.

La actividad de LDH se determinó con el kit CytoTox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 40 μ L de la mezcla de reacción. La cual se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min. Se evaluó a 10, 15 y 20 min. A una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image Tecan Spectra). Los resultados fueron procesados en Microsoft Excel 2010, contrastando la absorbancia cuantificada en las células tratadas con tritón X-100 y las absorbancias registradas de los tratamientos. Todas las líneas celulares se evaluaron por sextuplicado y se realizaron 3 ensayos por cada línea.

Morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por microscopia con tinción con DAPI.

Se cultivaron las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo por separado en cubre objetos (Corning, USA) estériles insertados la placa de plástico de 24 pozos (Corning, USA), a una densidad de 35,000 células/pozo en 500 μ L de RPMI-1640 al 5 % de SFB, por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se estimuló con la CI_{50} de Me-DTC, Colchicina y Et-OH en la concentración del vehículo de la CI_{50} , dejando un control únicamente con medio RPMI-1640 al 5 % de STN. Una vez completadas las 48 horas del ensayo se retiró el medio de cultivo, aplicando un suave lavado con PBS filtrado, una vez completado este paso, las células fueron fijadas con Paraformaldehído durante 15 minutos, posteriormente fueron lavadas con PBS y posteriormente lisadas con tritón X100 al 2% a 3°C durante dos minutos, enseguida se realizó un lavado con PBS, y se adicionaron 10 μ L a una concentración de 3 μ g/mL del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA), durante 5 min, Inmediatamente se realizó un lavado con PBS las muestras fueron almacenadas en oscuridad a -20 °C hasta su observación. Dichas muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600, equipado con una cámara de alta resolución DXM1200F.

Detección específica de la caspasa-3 activa en cultivos celulares.

Para cada línea celular, en cajas de petri de 2.5 mL se sembraron seis condiciones con 200,000 células con 2mL de RPMI-1640 al 5 % de STN, respectivamente, dejando incubar por 24 horas a 37 °C, al 5 % de CO₂. Una vez transcurridas las 24 horas se asignó a cada una de las cajas una condición para ser estimuladas dónde; tres condiciones son tratadas como controles con RPMI-1640 al 5 % de STN, un vehículo con la concentración requerida de Et-OH para la respectiva CI_{50} , un control positivo con 1 μ g/mL de Colchicina y finalmente la CI_{50} respectiva a de cada línea celular, dichas condiciones fueron puestas en incubación por 24 horas adicionales.

Transcurridas las 24 horas, por separado y por condición, las líneas celulares CaSki y HeLa fueron cosechadas con 1mL de verseno a 4°C mientras que para la línea celular ViBo se utilizó tripsina. Una vez cosechadas todas las condiciones estas fueron centrifugadas a 1700 rpm en tubos eppendorf, desechando el sobrenadante, al haber obtenido un botón celular por condición, cada uno de estos fue resuspendido en 1mL de PBS filtrado y nuevamente fue centrifugando a 1700 rpm desechando el sobrenadante con la micropipeta, el botón celular resultante de estos dos lavados fue fijado con 250 μ L de Metanol /PBS 1:1 durante 25 minutos a 4°C , transcurridos los 25 min se centrifugó a 1700 rpm y se desechó el sobrenadante con la micropipeta, obteniendo un botón celular por cada una de las seis condiciones, a las cuales se agregaron 50 μ L anticuerpo 1º anti-caspasa (.4 μ L:200 μ L de PBS) a cuatro condiciones; Control experimental que llevara anticuerpo 1º y 2º, Et-OH , Me-DTC y Colchicina) transcurridas 24 horas se realizan dos lavados con PBS y se agregan 50 μ L anticuerpo 2º (.5 μ L:250 μ L de PBS) a cinco condiciones (Ctrl experimental, Ctrl únicamente

con anticuerpo 2º, ETOH, Me-DTC , y Colchicina), durante 3 h en incubación a 37 °C, al 5 % de CO₂. Transcurridas las tres horas, se centrifugaron las muestras a 1700 rpm retirando con una micropipeta el sobrenadante, Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS filtrado a todas las condiciones, dicho lo anterior se resuspendió cada botón celular en 500 µL de PBS y finalmente las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACSAria II). Al término de la lectura, los datos se procesaron en el programa estadístico Flowing 2.5 versión 2013. Todas las líneas celulares se evaluaron por triplicado.

Obtención de linfocitos.

En tubos Vacutainer con EDTA (BD, USA), se obtuvieron 20 mL totales de sangre periférica humana, posteriormente se colocaron (5 mL) en tubos cónico de vidrio de 15 mL (Pirex, USA), con 5 mL de Histopaquete (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 5 tubos), éstos se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumenta gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con la pipeta se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10 mL de PBS (por tubo), a continuación, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células quedo contenido en un solo tubo cónico con un volumen total de 4 mL. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 mL de RPMI-1640 suplementado con 20 % de STN, y se incubaron durante 1 hora en condiciones de cultivo antes mencionadas. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión. En un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugo la suspensión celular colectada a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en 5 mL de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 µL, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Proliferación de linfocitos humanos por incorporación de carboxifluoresceína (CFSE).

La proliferación de linfocitos se llevó a cabo con 1×10^6 células/mL. Siendo marcadas con carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE; Sigma-Aldrich, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 mL de PBS con 10 µL de CFSE (12 µM por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS centrifugando a 1500 rpm, desechando el sobrenadante finalmente fueron resuspendidos en 4 mL de RPMI-1640 al 20 % de STN, posteriormente fueron activados con fitohemaglutinina (FHG; Micro Lab S.A. Méx.). Los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 mL a una densidad de 1×10^6 células/mL de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 µL de fitohemaglutinina/mL

diluida 1:10 en PBS, de esta manera cada tubo cónico fue estimulado con las tres diferentes concentraciones de la CI_{50} de Me-DTC controles y vehículo, de tal manera que fueron sembradas por condición en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ L, dicha placa fue incubada en condiciones de cultivo por 72 horas.

Al cabo de las 72 horas cumplidas la placa de 96 pozos fue centrifugada a 1500 rpm a $-10^{\circ}C$ en la centrifuga de placas, el medio de cultivo se recuperó por condición para su posterior análisis y los linfocitos fueron cosechados por condición en tubos de citometría y se resuspendieron en 250 μ L de Verseno a $4C^{\circ}$ por 3 minutos, posteriormente cada muestra se centrifugó a 1500 rpm desechando el sobrenadante. Finalmente, las muestras se resuspendieron con 400 μ L de PBS filtrado para leerse en el citómetro de flujo FACSaria II, datos fueron procesados en el programa Flowing 2.5 versión 2013

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de linfocitos humanos.

Para determinar efecto necrótico del compuesto Me-DTC sobre linfocitos, fue necesario recuperar el medio de cultivo de 72 horas de las siguientes condiciones, control positivo con fitohemaglutinina al cual trascurrida 71 horas le fue sustituido el medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 una vez completado lo anterior se dejó que el ensayo completara las 72 horas como al resto de las condiciones, vehículo el cual contenía la cantidad máxima de etanol empleada en la CI_{50} , y finalmente las concentraciones de CI_{50} 455 μ g/mL, 782 μ g/mL y 875 μ g/mL de HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Por cada condición se tomaron 40 μ L de medio traspasándolo a una placa de 96 pozos.

La actividad de LDH se determinó con el kit CytoTox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 40 μ L de la mezcla de reacción a cada grupo de condiciones. Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz, evaluando lecturas a los 10, 15 y 20 min. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image Tecan Spectra). Los datos se analizaron haciendo una comparación con el control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

Resultados.

Efecto antiproliferativo de Me-DTC en células tumorales.

Con la finalidad de evaluar la actividad antiproliferativa del metabolito Me-DTC, cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto. La actividad antiproliferativa fue expresada como la cantidad requerida de compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (CI_{50}). (Figura 9, tabla 1).

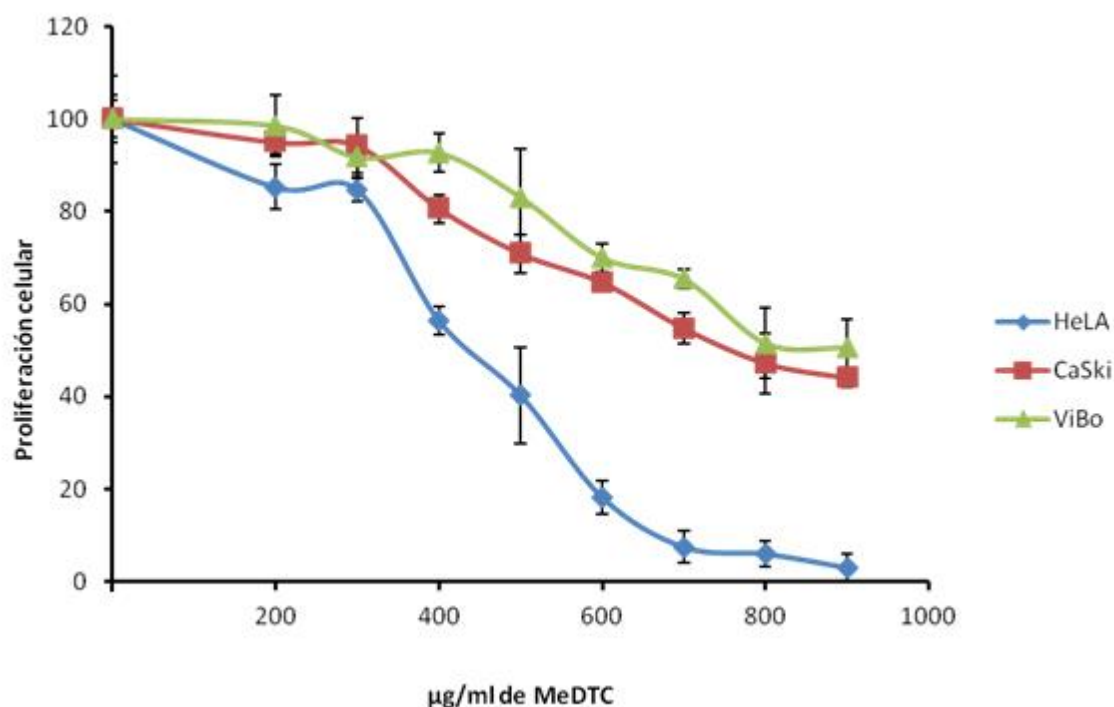


Figura 9. Actividad antiproliferativa del Me-DTC sobre las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas en placa de 96 pozos, estimuladas durante 24 horas con 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 µg/mL de Me-DTC. La proliferación celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta (Kueng W, 1998). La gráfica representa al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. La CI_{50} fue evaluada mediante la linealización de los datos, con la ayuda de la ecuación de la recta. Se observa que la línea celular HeLa fue la más sensible al Me-DTC, siguiéndole la línea celular CaSki, por último, se observa que la línea celular ViBo requirió de una mayor concentración de compuesto para lograr la CI_{50}

Tabla 1. Valores de CI_{50} calculadas de Me-DTC en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Línea celular	CI_{50} Me-DTC	CI_{50} μ M Me-DTC
HeLa	455 μ g/mL	3090.4 μ M
CaSki	782 μ g/mL	5311.4 μ M
ViBo	875 μ g/mL	5943.0 μ M

Los resultados obtenidos establecen que el Me-DTC afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. Con el propósito de corroborar las concentraciones obtenidas y de descartar actividad antiproliferativa del etanol utilizado en el vehículo, se procedió a confirmar las CI_{50} s (figura 10).

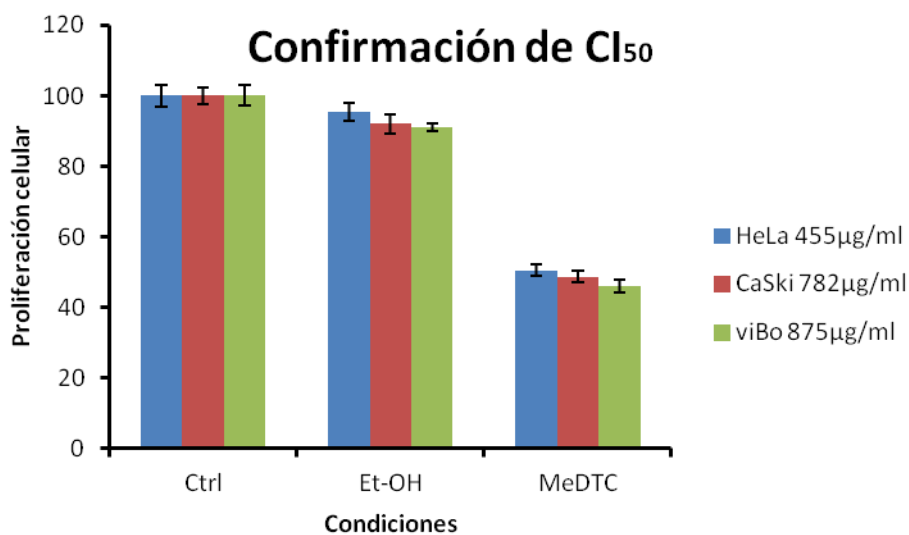


Figura 10. Confirmación de CI_{50} Ctrl: células en proliferación en condiciones normales de cultivo; Et-OH: células en proliferación en condiciones normales de cultivo más 9 μ l/mL de Et-OH; Me-DTC: células en proliferación en condiciones normales de cultivo estimulados con la respectiva CI_{50} para cada línea celular. La gráfica representa al menos tres ensayos independientes donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado.

Los resultados mostrados en la figura 10, confirman que el Me-DTC afecta el potencial proliferativo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo, con unas CI_{50} s de 455, 782 y 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Actividad apoptótica del Me-DTC en la morfología de células tumorales.

Se ha descrito que el efecto de los fármacos o compuestos puede apreciarse cuando se compara la morfología de las células del cultivo control con el cultivo de células tratadas con el compuesto, por ello y con el fin de definir si el Me-DTC afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo, cultivos de las tres líneas celulares fueron estimulados con el Me-DTC a sus respectivas CI_{50} durante 24 h y la morfología celular fue observada mediante microscopía de contraste de fases (Figura 11).

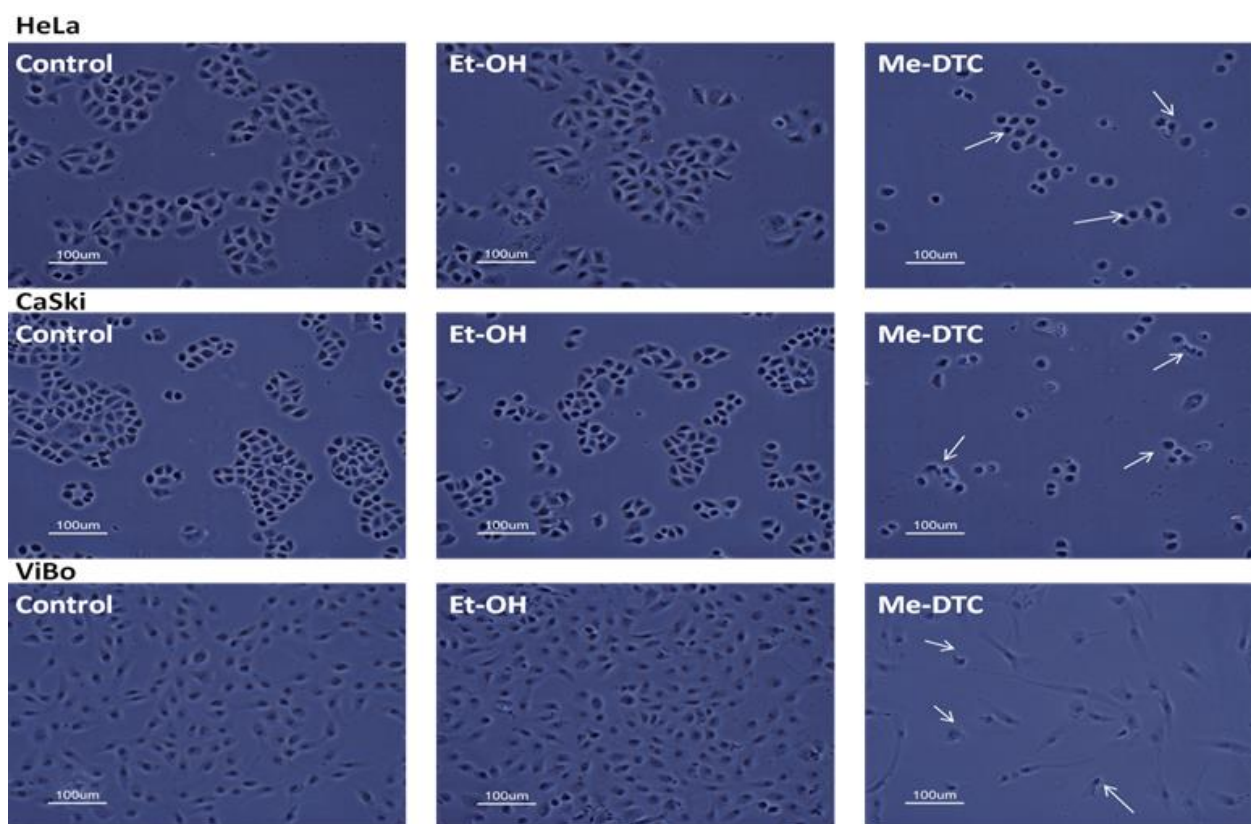


Figura 11. Efecto del Me-DTC en la morfología celular de HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos y posteriormente estimuladas con la respectiva CI_{50} durante 24 horas, las flechas indican células que han perdido la forma poliédrica, compactación celular, disminución del tamaño con pérdida de la adherencia y de las proyecciones citoplasmáticas, en contraste con los cultivos Control y Et-OH. Las fotografías representan al menos tres experimentos independientes con cuatro repeticiones cada uno.

Las fotografías mostradas en la figura 11, permiten observar el efecto del Me-DTC en la morfología de las tres líneas celulares, observándose que en las células tratadas con Me-DTC, éstas presentaron pérdida de las uniones intercelulares, compactación celular, pérdida de la adherencia y de las proyecciones citoplasmáticas, en contraste con el Control y el Et-OH, donde se observan células grandes con forma poliédrica y núcleo definido, perfectamente extendidas y formando islotes.

Efecto citotóxico (necrótico) del Me-DTC en células tumorales

Una vez demostrada la actividad antiproliferativa del Me-DTC sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino, fue evaluado el porcentaje de liberación de enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos (Berghe, *et al.*, 2013). Al respecto, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con el Me-DTC a sus respectivas CI_{50} s y la cantidad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos celulares y tomada como un parámetro de pérdida de la integridad de la membrana celular (figura 12, tabla 2).

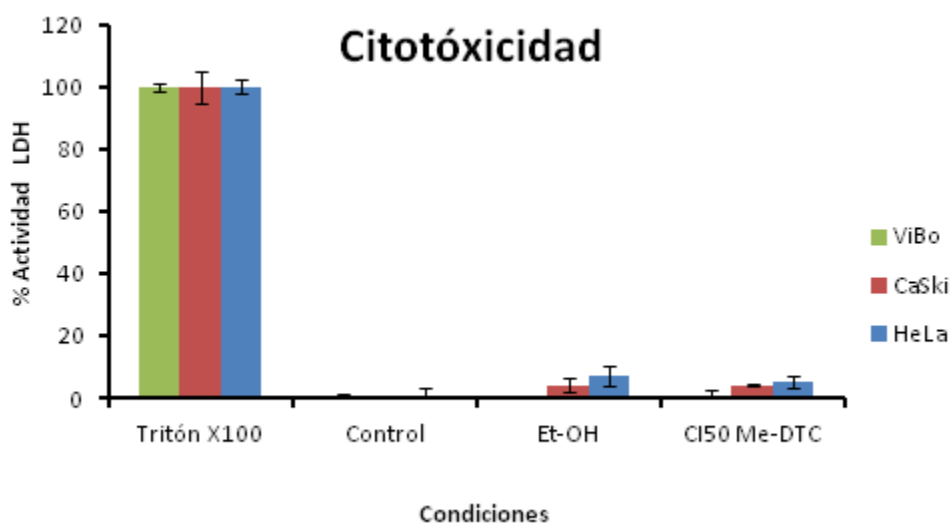


Figura 12. Porcentaje de actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo. Tritón: representa el máximo experimental de actividad de LDH, Control: porcentaje de actividad de LDH en condiciones normales del cultivo. Et-OH: porcentaje de actividad de LDH al estimular con etanol (10 μ L/mL) CI_{50} Me-DTC., porcentaje de actividad de LDH al estimular con la CI_{50} de Me-DTC. Los resultados mostrados son un representativo de por lo menos tres ensayos con 6 repeticiones cada uno (* $p < 0.05$) vs Et-OH (t-Student).

<i>Porcentajes de citotoxicidad producidos por el Me-DTC</i>				
Línea celular	Tritón X100	Control	Et-OH	Me-DTC
HeLa	100	0	7.21	5.66
CaSki	100	0	4.31	4.38
ViBo	100	0	0	0

Tabla 2. Los resultados mostrados en la figura 12, indican que los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las células HeLa, CaSki y ViBo presentan nula o baja presencia de la enzima citoplasmática LDH, sugiriendo que el Me-DTC no induce a las células tumorales a una muerte necrótica y que el decremento en el número celular es debido a causas independientes a la muerte celular necrótica.

Actividad apoptótica del Me-DTC en células tumorales

Debido a que el efecto antiproliferativo del Me-DTC sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino no genera una respuesta necrótica y con el propósito de establecer si la disminución en el número celular es debido a una muerte apoptótica, cultivos de células HeLa CaSki y ViBo fueron tratados con la respectiva CI_{50} durante 24 horas y posteriormente fueron fijados y teñidos con el fluorocromo DAPI (figura 13-15).

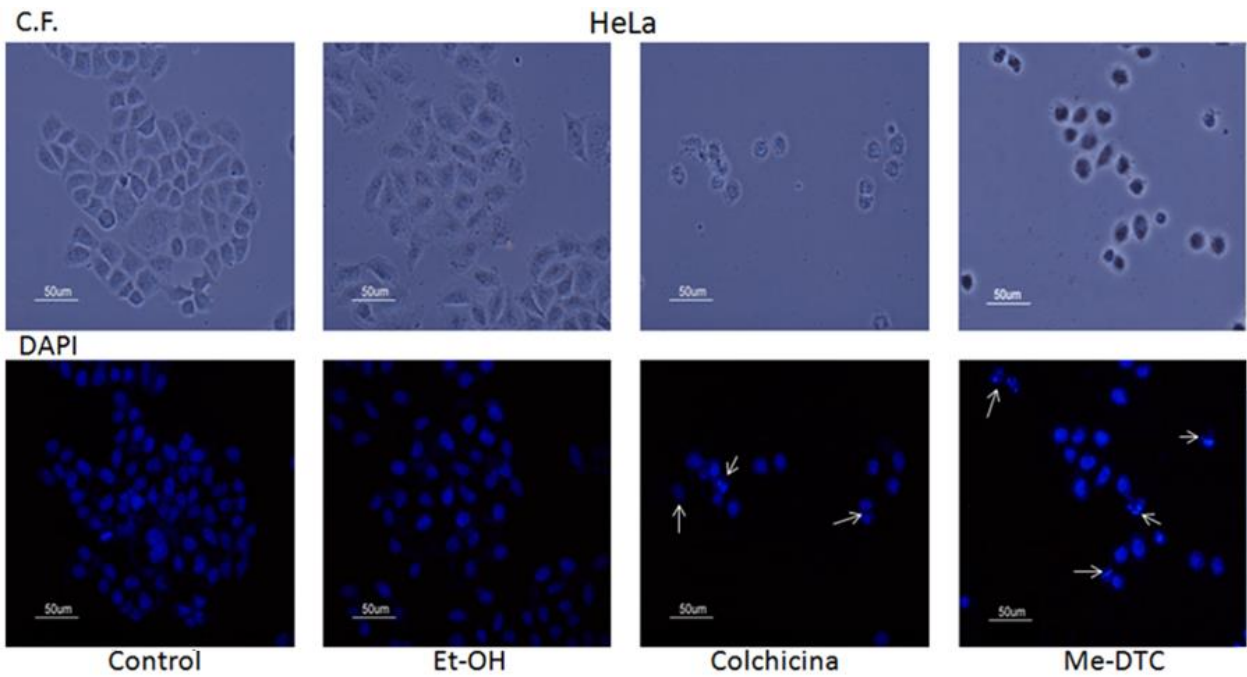


Figura 13. Morfología celular y condensación de la cromatina de células HeLa inducidas con Me-DTC. C.F; *contraste de fases, donde se muestran a las células tratadas con Me-DTC las cuales presentan compactación celular, pérdida de la adherencia y de las proyecciones citoplasmáticas, en contraste con el Control y Et-OH que presentan células con forma poliédrica, perfectamente extendidas, formado islotes. DAPI; células observadas con microscopio de epifluorescencia. Las flechas indican a los núcleos con cromatina condensada y/o con la cromatina (ADN) fragmentada, en contraste con el Control se observa una distribución uniforme del ADN dentro del núcleo. Las fotografías representan al menos dos experimentos independientes con cuatro repeticiones cada uno.*

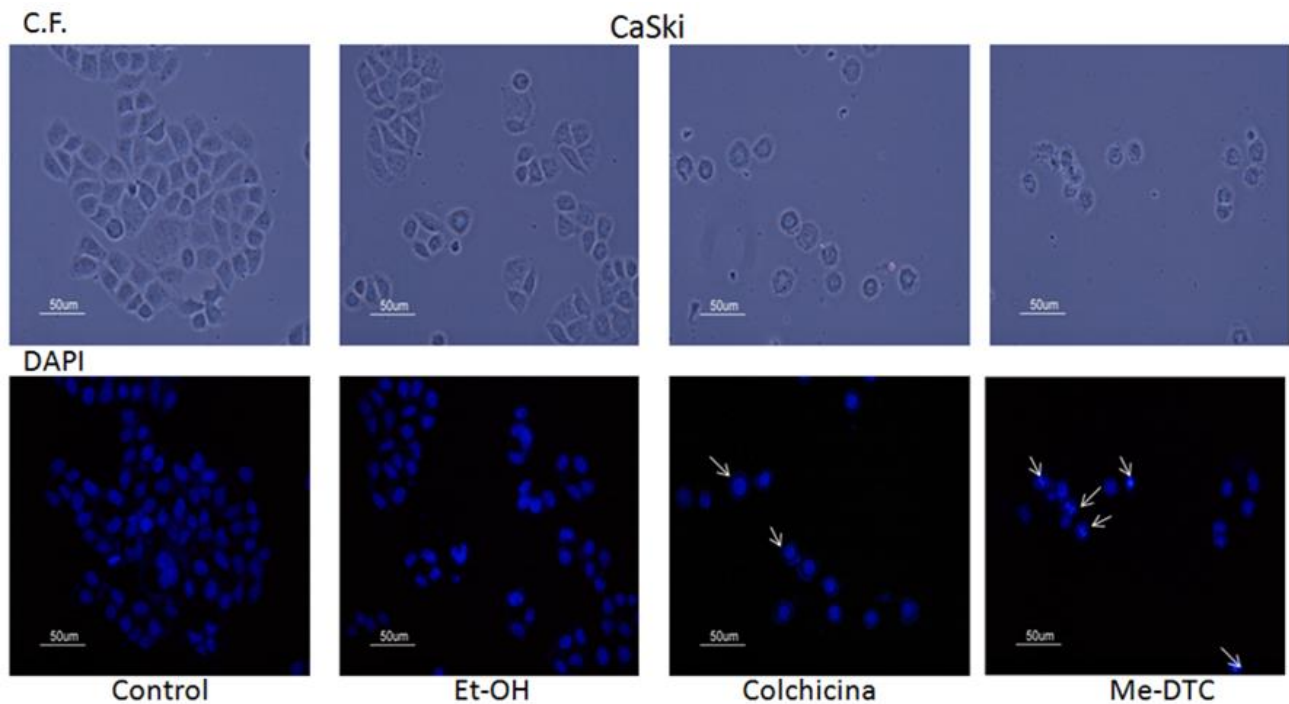


Figura 14. Morfología celular y condensación de la cromatina de células CaSki inducidas con Me-DTC. C.F; contraste de fases, donde se muestran a las células tratadas con Me-DTC las cuales presentan compactación celular, pérdida de la adherencia y de las proyecciones citoplasmáticas, en contraste con el Control y Et-OH que presentan células con forma poliédrica, perfectamente extendidas, formado islotes. DAPI; células observadas con microscopio de epifluorescencia. Las flechas indican a los núcleos con cromatina condensada y/o con la cromatina (ADN) fragmentada, en contraste con el Control donde se observa una distribución uniforme del ADN dentro del núcleo. Las fotografías representan al menos dos experimentos independientes con cuatro repeticiones cada uno.

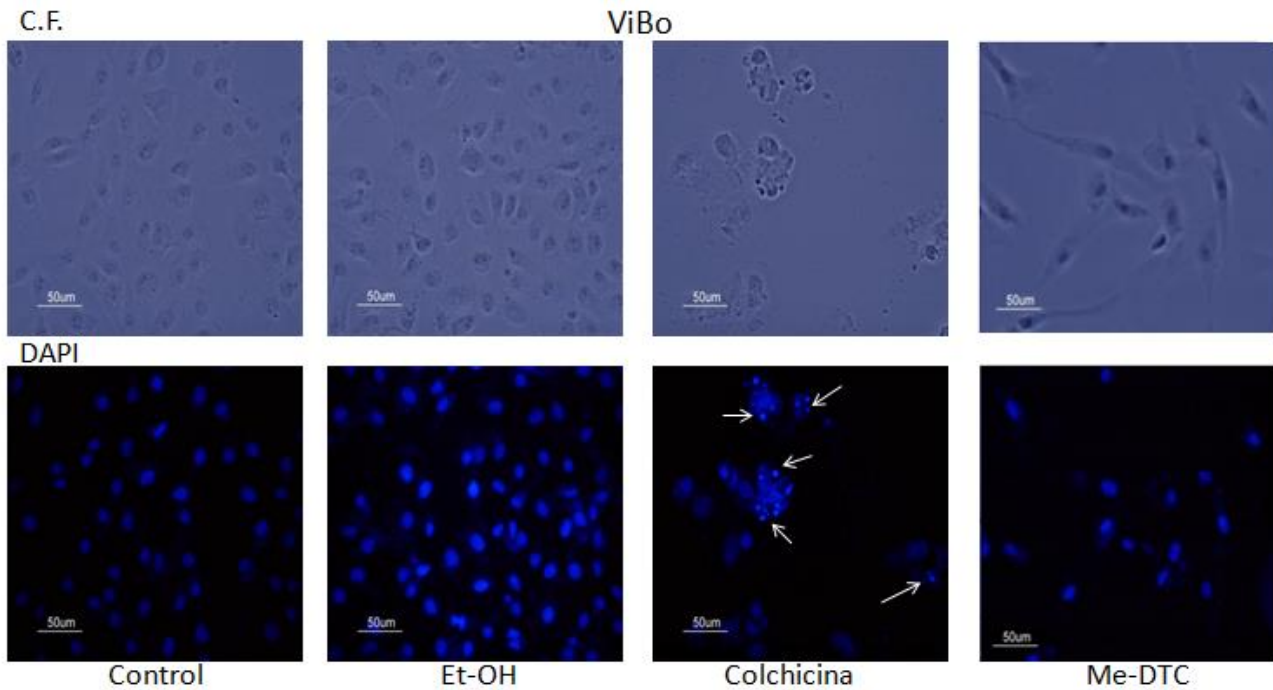


Figura 15. Morfología celular células ViBo inducidas con Me-DTC. C.F; *contraste de fases, donde se muestran a las células tratadas con Me-DTC las cuales no presentan una compactación nuclear ni pérdida de las proyecciones citoplasmáticas. Por otra parte el Control y Et-OH presentan células con forma poliédrica, perfectamente extendidas, formado islotes. DAPI; células observadas con microscopio de epifluorescencia. Las flechas indican a los núcleos con cromatina condensada y/o con la cromatina (ADN) fragmentada, en contraste con el control donde se observa una distribución uniforme del ADN dentro del núcleo al igual que las células tratadas con MeDTC. Las fotografías representan al menos dos experimentos independientes con cuatro repeticiones cada uno.*

Las fotografías mostradas en las figuras 13-15, establecen que el Me-DTC induce a las células HeLa, CaSki a generar una contracción celular, con disminución del tamaño celular, con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas y la formación de cuerpos apoptóticos y/o fragmentación nuclear (DNA fragmentado), sugiriendo que el Me-DTC induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis.

Detección específica de la caspasa-3 activa.

Ante las evidentes características morfológicas apoptóticas observadas en las fotografías (figura 13-15), es necesario confirmar a través de un marcador bioquímico si la muerte apoptótica inducida por el Me-DTC en las células tumorales es llevada a término. Para ello, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el Me-DTC a sus respectivas CI_{50} , y la caspasa-3 activa fue detectada mediante la técnica de inmunodetección y cuantificada por citometría de flujo (Berghe, *et al.*, 2013), (figura 16-18).

Caspasa 3 activa en HeLa.

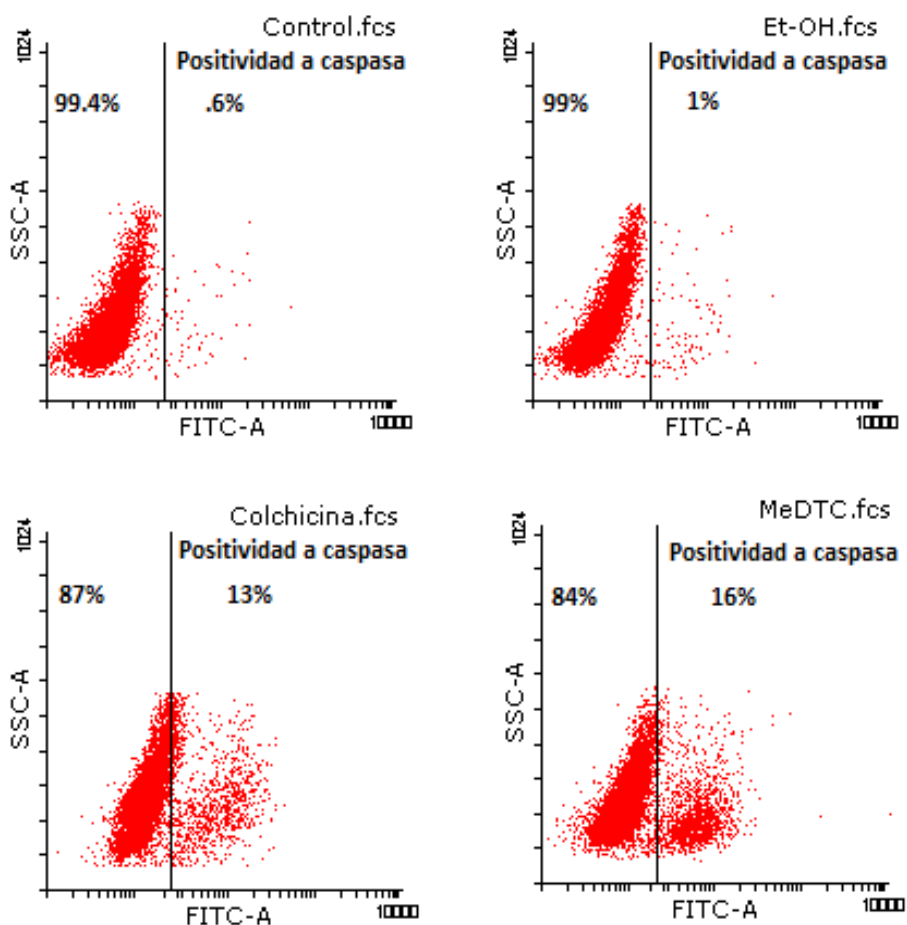


Figura 16. Las células HeLa fueron cultivadas en cajas de cultivo de 2.5 mL (200,000 células/caja) por 24 horas posteriormente fueron estimuladas durante 24 horas adicionales con la CI_{50} (455 μ g/mL) de Me-DTC dando un tiempo total de cultivo de 48 horas, consecutivamente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con anticuerpo 1^o anti caspasa 3 durante 24 horas. Posteriormente se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, finalmente las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo. Las gráficas representan al menos tres ensayos independientes.

Caspasa 3 activa en CaSki.

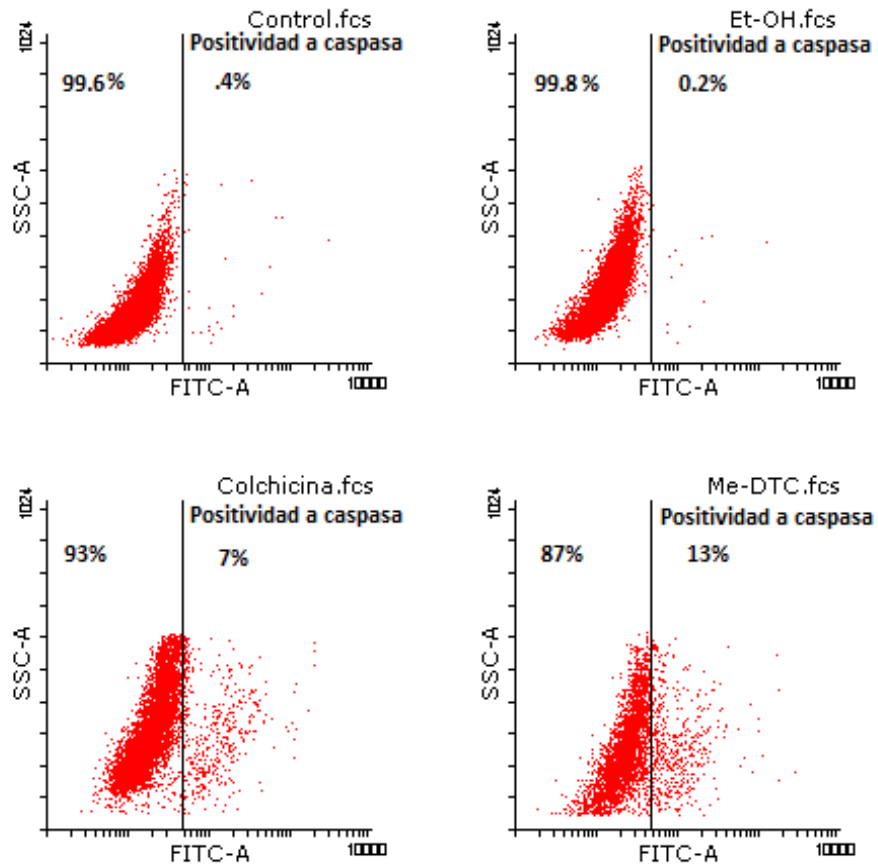


Figura 17. Las células CaSki fueron cultivadas en cajas de cultivo de 2.5 mL (200,000 células/caja) por 24 horas posteriormente fueron estimuladas durante 24 horas adicionales con la CI_{50} (782 μ g/mL) de Me-DTC dando un tiempo total de cultivo de 48 horas, consecutivamente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con anticuerpo 1^o anti caspasa 3 durante 24 horas. Posteriormente se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, finalmente las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo. Las gráficas representan al menos tres ensayos independientes. Control; células en condiciones normales de proliferación. Et-OH; células tratadas con 7.8 μ L de etanol. Colchicina; células tratadas con 1 μ g/mL de Colchicina, representa un control positivo a caspasa 3 activa y finalmente Me-DTC; presencia de caspasa 3 activa inducida por la CI_{50} de Me-DTC (782 μ g/mL).

Caspasa 3 activa en ViBo.

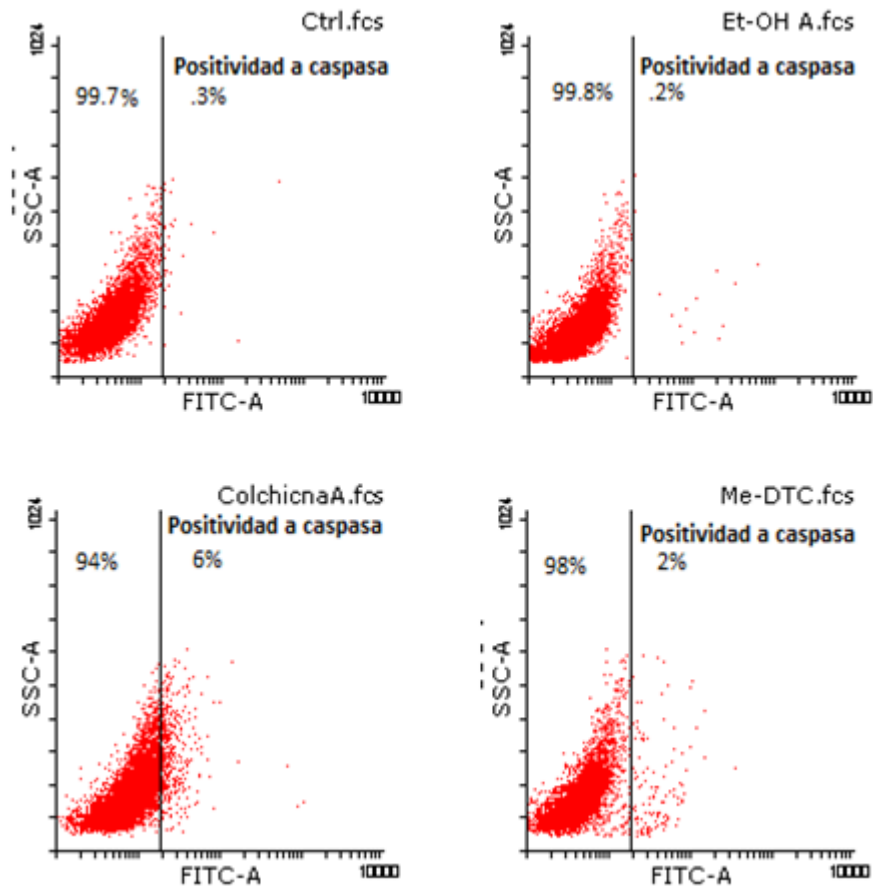


Figura 18. Las células ViBo fueron cultivadas en cajas de cultivo de 2.5 mL (200,000 células/caja) por 24 horas posteriormente fueron estimuladas durante 24 horas adicionales con la CI_{50} (875 μ g/mL) de Me-DTC dando un tiempo total de cultivo de 48 horas, consecutivamente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con anticuerpo 1^o anti caspasa 3 durante 24 horas. Posteriormente se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, finalmente las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo. Las gráficas representan al menos dos ensayos independientes Control; células en condiciones normales de proliferación. Et-OH; células tratadas con 8.7 μ L de etanol. Colchicina; células tratadas con 1 μ g/mL de Colchicina, representa un control positivo a caspasa 3 activa y finalmente Me-DTC; presencia de caspasa 3 activa inducida por la CI_{50} de Me-DTC (875 μ g/mL).

Los resultados obtenidos indican que el Me-DTC induce presencia de caspasa 3 activa en cultivos de células HeLa CaSki y ViBo en diferentes porcentajes (tabla 3).

Línea Celular	Ctrl	Et-OH	Colchicina	Me-DTC
HeLa	0.64%	1.06%	13%	16%
CaSki	0.4%	0.2%	7%	13%
ViBo	0.3%	0.2%	6%	3%

Tabla 3. Valores de expresión de caspasa 3 activa en cultivos de células tumorales de CaCu.

Los resultados obtenidos indican que el Me-DTC induce la activación de la caspasa 3 en los cultivos de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo en 16 13 y 2% respectivamente indicando que el Me-DTC induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. No obstante la relevancia de los resultados obtenidos en las células tumorales, es necesario determinar si el Me-DTC afecta a las células no tumorales. Al respecto, cultivos de células linfocíticas humanas de sangre periférica fueron tratados con las concentraciones de CI_{50} obtenidas para las líneas HeLa, CaSki y ViBo y el número celular fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y la marca en las células fue cuantificada por citometría de flujo (FACSAria II), (figura 19).

Proliferación de linfocitos.

Proliferación de linfocitos humanos por incorporación de carboxifluoresceína (CSFE).

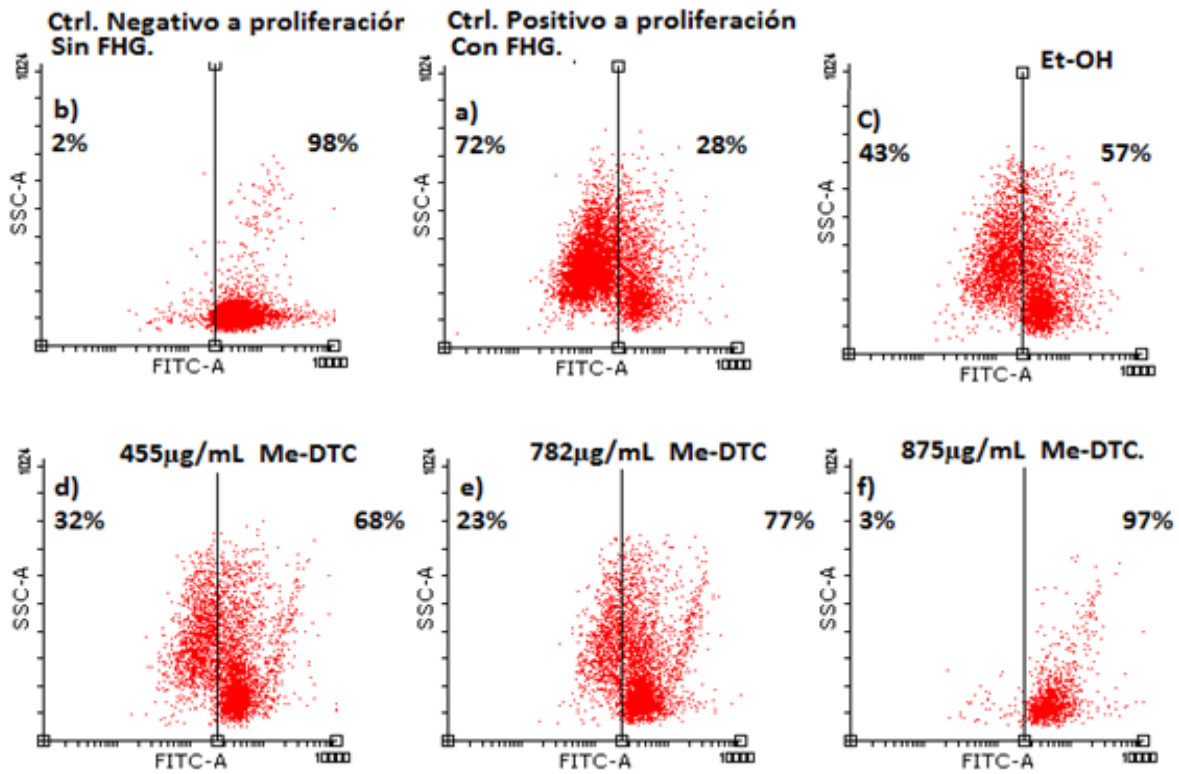


Figura 19. El efecto antiproliferativo del Me-DTC en células linfocíticas fue evaluado mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína mediante citometría de flujo (Hasbold J. 1999). Condiciones: a) Linfocitos activados, b) linfocitos no activados, c) etanol 9µL /mL d) 455µg/mL de Me-DTC, e) 782µg/mL de Me-DTC, f) 875µg/mL de Me-DTC.

Porcentaje de proliferación de células linfocíticas por incorporación de carboxifluoresceína (CSFE).

Positivo a proliferación.	72%	100%
Et-OH.	43%	60%
455µg Me-DTC.	32%	44%
782µg Me-DTC.	23%	32%
875µg. Me-DTC.	3%	4%

Tabla 4. De acuerdo a los resultados obtenidos, existe una disminución en el potencial proliferativo de células linfocíticas en un 56%, 68% y 96% con las concentraciones: 455µg/mL, 782µg/mL, 875µg/mL respectivamente. Tomando Positivo a proliferación como 100%.

Efecto citotóxico del Me-DTC en cultivos de linfocitos humanos.

Debido a que el Me-DTC afecta el potencial proliferativo en células linfocíticas, se procedió a determinar el tipo de muerte celular que este ejerce sobre los linfocitos humanos, los cuales fueron sembrados en placa de 96 pozos y estimulados con las concentraciones de 455 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 782 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Me-DTC. La actividad citotóxica fue determinada mediante la liberación de la enzima LDH con el kit CytoTox 96 (Promega, USA). (Berghe, *et al.*, 2013).

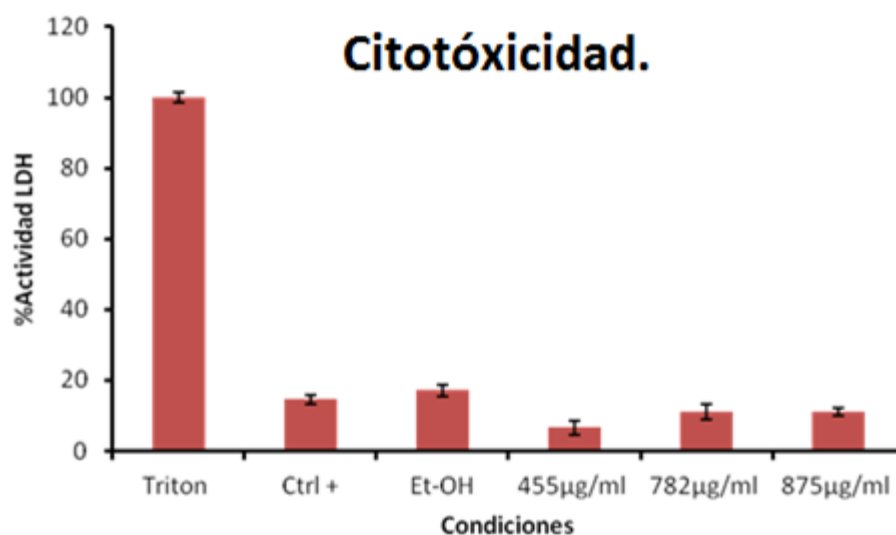


Figura. 20. Determinación de la actividad citotóxica del Me-DTC en cultivos de células Linfocíticas. 200000 células linfocíticas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y la cantidad de la enzima LDH fue evaluada a las 72 h Ctrl: células sin tratamiento; Tritón: células tratadas con 1% de tritón x-100; ET-OH: células tratadas con 9µL/mL de Et-OH; 455µg/mL, 782µg/mL, 875µg/mL de Me-DTC. (*. $p < 0.05$ seguido de una prueba de Tukey).

Porcentajes de citotoxicidad producidos por el Me-DTC en linfocitos humanos.

Tratamientos	Tritón X100	Ctrl +	Et-OH	455µg/mL	782µg/mL	875µg/mL
% citotoxicidad	100	14.6	17.2	6.5	10.9	11.1

Tabla 5. Los resultados obtenidos en la figura 20, Indican que el Me-DTC no genera un efecto citotóxico en células linfocíticas en las concentraciones de 455 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 782 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que la disminución de la proliferación celular en presencia de Me-DTC es totalmente independiente al tipo de muerte necrótica.

Análisis de resultados.

En la última década los tratamientos utilizados terapéuticamente son efectivos cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana de su aparición, sin embargo cuando éste se detecta en una etapa tardía, los tratamientos resultan ser ineficientes y de naturaleza citotóxica siendo nocivos para las células no cancerosas.

Ante este panorama, actualmente se ha implementado la búsqueda de nuevos compuestos, que presenten actividad antiproliferativa del tipo apoptótica u autofágica de una alta selectividad a células tumorales con mínima citotoxicidad con la finalidad de postular nuevos compuestos como agentes antineoplásicos.

En los últimos años, varios compuestos a base de ditiocarbamatos han sido diseñados y biológicamente investigados en todo el mundo con el fin de obtener agentes quimioterapéuticos con un mejor perfil toxicológico, como el caso del disulfiram y sus metabolitos.

La importancia del disulfiram como probable antineoplásico nace de la característica fisiológica de muchos tejidos y células tumorales los cuales tienden a acumular altas concentraciones de cobre y otros metales traza (Yip *et al.*, 2011). Ante la naturaleza quelante del disulfiram, se cree que éste interviene en las vías de señalización HER2 / Akt, NFkB y MAPK (Kim *et al.*, 2016; Chiba *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2003), de las células tumorales, por lo que se cree que la presencia de metales pesados en células tumorales favorece la selectividad y actividad apoptótica del disulfiram (Kenyon, 2005; Guo, *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2011; Liu, 2012; Wiggins *et al.*, 2015). Bajo esta premisa se han desarrollado numerosos ensayos que han utilizado la presencia de metales pesados como cobre y zinc en células tumorales como diana para encaminar la selectividad del Disulfiram.

Investigaciones recientes acerca del disulfiram, han demostrado que los compuestos de esta naturaleza ejercen una actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares de mama, próstata y pulmón (Wickström *et al.*, 2007), próstata (DU-145) con una CI_{50} de 26 μ M (Lin *et al.*, 2010; Duan, 2014), en células de CaCu; HeLa, CaSki y ViBo con CI_{50} s con .23 μ M, .22 μ M y .27 μ M respectivamente, afectando el potencial proliferativo de células linfocíticas en 25% (Raya, 2013). Así también se ha descrito características de muerte celular apoptótica en líneas celulares de melanoma metastásico c81-46a, c81-61 y c83-2C, con CI_{50} s de .025 y .050 μ M (Cen *et al.*, 2002) y con 5, 10, 13 μ M en la línea celular cancerosa pancreática humana (PANC-1) (Dastjerdi, 2013). En células HeLa indujo la actividad de las caspasas 3 y 7 (Wickström *et al.*, 2007), de igual forma en células MDA-MB con una CI_{50} de 5 μ M/L (Chen, 2006), también se ha reportado Inducción de apoptosis en células madre cancerígenas de mama positivas a HER2 (Kim, *et al.*, 2016).

En las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT474, 1 μ M de Disulfiram generó una baja toxicidad y aumento significativo de los niveles de zinc endolisosomal (Wiggins *et al.*, 2015), en células madre de cáncer de mama (BCSCs) el disulfiram presentó actividad antiproliferativa con una CI_{50} de .5 μ M en presencia de 1 μ m de Cobre (Yip *et al.*, 2011), en células de glioblastoma malino U-251MG, U-87MG y U-373MG generó actividad antiproliferativa con CI_{50} 0.119 μ M a 0.464 μ M, así mismo potencia la actividad citotóxica de la Gemcitabina (Liu, 2012) y deteriora la tumorigenicidad de células HCC (células de carcinoma hepatocelular iniciadoras del tumor) a través de la activación de la vía de ROS-p38 (Chiba *et al.*, 2014).

Al respecto el Me-DTC indujo las CI_{50} , en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa CaSki y ViBo con 3090 μ M, 5311 μ M y 5943 μ M respectivamente, concentraciones mucho mayores a las reportadas por el disulfiram siendo la línea celular HeLa positiva a VPH 18 la que presentó mayor susceptibilidad al Me-DTC, siguiéndole la línea celular CaSki positiva a VPH 16 y finalmente la línea celular ViBo sin presencia de VPH siendo la línea celular que generó una mayor resistencia al Me-DTC.

Nuestros resultados sobre la actividad citotóxica del Me-DTC mostraron que este análogo no generó actividad citotóxica a pesar de las altas concentraciones probadas, indicando que las células presentan una fuerte tolerancia al Me-DTC, por otra parte se ha descrito que el Disulfiram generó una fuerte actividad citotóxica en las células HeLa, sugiriendo que el Me-DTC podría servir de molécula modelo para sintetizar compuestos derivados de ésta que presenten mayor actividad antiproliferativa con nula o baja actividad citotóxica.

En cuanto al tipo de muerte celular presentado, las características de las células tratadas con Me-DTC en las líneas celulares HeLa y CaSki correspondieron a la morfología típica de una célula apoptótica con compactación celular y nuclear, pérdida de la adherencia y de las proyecciones citoplasmáticas, aunado a esto ambas líneas celulares presentaron una expresión de caspasa 3 activa en porcentajes de 16% y 13% con respecto a la Colchicina de hasta un 13% (tabla 3), ante los resultados obtenidos podemos sugerir que el tipo de muerte celular causado por el Me-DTC es del tipo apoptótico para el caso de las líneas celulares HeLa y CaSki ambas con presencia de VPH.

Si bien es cierto que el disulfiram es una molécula que genera una evidente actividad antiproliferativa en concentraciones de nanogramos, se sabe que este compuesto tiene una corta duración in vivo, en su lugar se biotransforma en diferentes metabolitos reactivos, responsables de la actividad biológica de este, dejando en duda si la acción de este fármaco es dependiente de los metabolitos.

Ante esta incógnita numerosos estudios respecto a los metabolitos del disulfiram han reportado una actividad antiproliferativa particularmente de naturaleza apoptótica, además se ha reportado el efecto antiproliferativo que genera en células linfocíticas de sangre periférica humana. El compuesto Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC) análogo del metabolito N, N-

dietilditiocarbamato ácido, reportó efecto antiproliferativo del tipo apoptótico en líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki, ViBo con Cl_{50} s 554 μ M 204 μ M 1667 μ M respectivamente afectando el potencial proliferativo de células linfocíticas hasta un 69% con 1167 μ M (Hernández, 2013), (figura7).

El S-metil-N,N dietiltiocarbamatosulfóxido (MeDDTC-SO), ha reportado actividad antiproliferativa en líneas las celulares de CaCu HeLa y CaSki con Cl_{50} de 9.4 μ M, sin afectar la proliferación de células linfocíticas (Galicía K, 2010). El S-Metil- pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) reporto actividad antiproliferativa en líneas celulares de CaCu HeLa y CaSki con una Cl_{50} de 155 μ M, afectando el potencial proliferativo de células linfocíticas hasta en un 79% con dicha concentración (Camacho, 2010).

De igual manera el análogo del metabolito Me-DTC-SO₂ el compuesto S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (MePTC-SO₂) registró una actividad antiproliferativa en líneas celulares de CaCu HeLa CaSki y ViBo con Cl_{50} s de 49 μ M, 66 μ M y 136 μ M respectivamente, afectando el potencial proliferativo de células linfocíticas hasta en un 65% a una concentración de 136 μ M (Mejía, 2014).

Con respecto a lo anterior el Me-DTC fue el metabolito que requirió de mayores concentraciones para lograr las Cl_{50} en las líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, sin embargo al igual que el resto de los metabolitos mencionados, generó una actividad antiproliferativa dosis dependiente de forma apoptótica, totalmente independiente de necrosis, no obstante el Me-DTC afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas en 56%, 68% y 96% con las concentraciones 3090 μ M, 5311 μ M y 5943 μ M respectivamente, sin generar muerte celular necrótica en los cultivos de células linfocíticas.

A pesar de las altas concentraciones utilizadas, este compuesto presentó una nula citotoxicidad en células tumorales y no tumorales, incluso permitió una mayor proliferación de células linfocíticas a una concentración de 3090 μ M, en comparación con el Dietilditiocarbamato sódico (**DDTC**) con 1167 μ M, el S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (**MePTC-SO₂**) con 136 μ M y el S-Metil- pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (**MePTC-SO**) con 155 μ M los cuales afectan mayormente el potencial proliferativo de células linfocíticas. De acuerdo a los resultados anteriormente mencionados podemos destacar las altas concentraciones requeridas para las Cl_{50} , siendo la línea celular HeLa positiva a VPH 18 la más susceptible de igual forma que con las Cl_{50} s de los metabolitos del DSF anteriormente mencionados, así mismo siendo la línea celular con mayor presencia de caspasa 3 activa. También se destaca la baja actividad citotoxicidad presentada por parte del Me-DTC en líneas celulares de CaCu y células linfocíticas además de una mayor proliferación de linfocitos a 3090 μ M, lo anterior indica que el Me-DTC podría servir de molécula modelo para sintetizar compuestos derivados que presenten mayor actividad antiproliferativa del tipo apoptótica en células tumorales con nula o baja actividad citotóxica y con menor impacto en la proliferación de células linfocíticas.

Conclusiones.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) genera una actividad antiproliferativa del tipo dosis dependiente en cultivos celulares de HeLa, CaSki y ViBo.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) reduce la proliferación celular en 50% en cultivos celulares de HeLa, CaSki y ViBo en concentraciones de 3090 μ M, 5311 μ M y 5943 μ M respectivamente.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) induce liberación de la enzima LDH en 5.6% 4.3% y 0% en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, respectivamente por lo que la actividad antiproliferativa es independiente del tipo de muerte celular necrótica.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) induce muerte celular apoptótica en las líneas celulares HeLa y CaSki.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas en 56%, 68% y 96% a las concentraciones de 3090 μ M, 5311 μ M y 5943 μ M respectivamente.

El metabolito S-Metil-N, N-dietiltiocarbamato (Me-DTC) no genera muerte celular necrótica en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana a las concentraciones de 3090 μ M, 5311 μ M y 5943 μ M respectivamente.

Bibliografía:

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Warter P., (2008). *Biología molecular de la célula* (5ª ed.) España: Omega., Pp. 983-1002, 1208.

Aragón Mamani Z., Bonkanka Tabares C., Gallardo Naranjo., Antonio J., García Velázquez. *Fármacos Antitumorales/Luces Sombras en las CDKs/ regulacion negativa del ciclo celular. Biocancer research journal volumen nº3 Enero 2006 ISSN 1697-6452.*

Arvelo F., Poupon M. F. (2001). Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient Venez*, 52(4), 304-312.

Beltrán Lissabet J. F. General aspects about the structure and function of the proteins encoded by the Human Papillomavirus. *CENIC ciencias biológicas. Volumen 45 2014 ISSN 2221-2450.*

Berghe T. V., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger Y., Krysko D. V., Takahashi N., Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 61(2), 117-129.

Cen D., Gonzalez R. I., Buckmeier J. A., Kahlon R. S., Tohidian N. B., Meyskens F. L. (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process1. *Molecular cancer therapeutics*, 1(3), 197-204.

Chen D., Cindy C. Q., Yang H., Ping D. Q. (2006). Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer research*. 66(21): 10425-10433.

Chen, G. G., Lai P. B. (2009). *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Camacho Elizabeth., (2010). Efecto antitumoral del *S-Metil- pirrolidiltiocarbamato-S-óxido* (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino. Tesis licenciatura, UNAM-FES Zaragoza.

Chiba T., Suzuki, E., Yuki K., Zen Y., Oshima M., Miyagi S., Ooka, Y. (2014). Disulfiram eradicates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells in ROS-p38 MAPK pathway-dependent and independent manners. *PloS one*, 9(1), e84807.

Ciapponi A., Bardach A., Glujovsky D., Gibbons L., Picconi M. A. (2011). Type-specific VPH prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 6(10), e25493.

Cooper G. y Hausman R., (2009). *The Cell: A Molecular Approach* (5ª ed.) Estados Unidos: Sinauer Associates Inc.

Dastjerdi N., Babazadeh Z., Rabbani M., Gharagozloo M., Esmaeili A., Narimani M. (2013). Effects of disulfiram on apoptosis in PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(4), 287-294.

Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Broker T. R., Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.

Duan L., Shen H., Zhao G., Yang R., Cai X., Zhang L., Huang, Y. (2014). Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4), 1010-1016.

Elinos Báez, C., Maldonado V., y Meléndez Zajgla, J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac. Méd. Méx.* 139(5).

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.

Fackler, O. T., Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of cell biology*, 181(6), 879-884.

Fan Ting-Jun, Han Li-Hui, Cong Ri-Shan, Liang J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimical et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727.

Ferenbach D. A., Bonventre J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews Nephrology*, 11(5), 264-276.

Fernández T. G., Martínez F. V., Navas S. V. (2002) *Biotechnología aplicada a la medicina* Ediciones Díaz de Santos. España Pp. 123.

Franklin R. B., Costello L. C. (2009). The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Journal of cellular biochemistry*. 106(5), 750-757.

Galicia K., (2010) Efecto del compuesto S-metil-N, N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), sobre el potencial proliferativo, muerte y ciclo celular de las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer cervicouterino. Tesis licenciatura, UNAM-FES Zaragoza.

Guarnizo A., Martínez P. (2009). *Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. Ediciones Elizcom, Colombia, 4-5.

Guo Xiaoxia., Bing Xu., Shuchita Pandey., Elisabeth Goessl. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Letters* 290 (2010) Pp. 104–113.

Hasbold J., Gett A. V., Rush J. S., Deenick E: Avery D., Jun J., Hodgkin P. D. (1999). Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and cell biology*, 77(6), 516-522.

Hernandez V., (2013) Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC) en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Tesis licenciatura, UNAM-FES Zaragoza.

Herráez Á., Sánchez Á. H. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier Health Sciences. 451-453.

Hu P., Jin L., Baillie T. A. (1997). Studies on the Metabolic Activation of Disulfiram in Rat. Evidence for Electrophilic S-Oxygenated Metabolites as Inhibitors of Aldehyde Dehydrogenase and Precursors of UrinaryN-Acetylcysteine Conjugates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(2), 611-617.

Jiménez L. y Merchant H. (2003). *Biología celular y molecular (1ª ed.)* México: Pearson Educación. Pp. 595.

Jouvé N. (2014) *Las células madre: Alquimia celular para una (2ª ed.)* España: Digital Reasons

Karp G., (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos (6ª ed.)* China: Mc Graw Hill Interamericana. Pp. 643.

Kenyon G., Chen D., Orlu S., Cui Q. C., Miller F. R., Dou, Q. P. (2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 7(6), R897-R908.

Kim J. Y., Cho Y., Oh E., Lee N., An H., Sung D., Seo J H. (2016). Disulfiram targets cancer stem-like properties and the HER2/Akt signaling pathway in HER2-positive breast cancer. *Cancer letters*, 379(1), 39-48.

Kueng W., Silver E., U. Eppenverg. (1998). Quantification of cells cultured on 96 wells plates. *Analytical Biochemical*. Pp., 186.

Kumar V., Abbas Abul K., Aster Jon C. (2015) *Patología estructural y funcional (9ª ed.)* España Elsevier Pp. 33.

Lipsky J., Shen M., Naylor S. 2001. In vitro inhibition of aldehydedehydrogenaseby Disulfiram and metabolites. *Chemico-BiologicalInteractions*. 130: 81-91.

- Liu P., Brown S., Goktug T., Channathodiyil, P., Kannappan V., Hugnot, J P., Wang W. (2012). Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British journal of cancer*, 107(9), 1488-1497.
- Lodish H., Berk A., Zipurski S., Matsudaira P., Baltimore D. J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. (2005). W. H. Freeman and Company. 5ª Ed. New York. Pp. 2, 973,619.
- López A. y Lizano, M. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1, 31-55. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.
- Manzo J., Merino., R. Jiménez-Lima., Cruz Gregorio (2014) *Biología molecular del cáncer cervicouterino*. Gaceta Mexicana de Oncología. 2014., 13(Supl 4):18-24.
- Mays D. C., Nelson A. N., Fauq A. H., Shriver Z. H., Veverka K. A., Naylor S. Lipsky J. J. (1995). S-Methyl N, N-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low Km mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemical pharmacology*, 49(5), 693-700.
- Mejía Ma. E., (2014) Efecto antiproliferativo y citotóxico del S-Metil-pirrolidiltiocarbomato-S-dióxido en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Tesis licenciatura, UNAM-FES Zaragoza.
- Müller-Esterl W., (2008) *bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Reverte, España Pp. 454.
- Muñoz N., Bosch F. X., De Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K. V. y Meijer C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527.
- Murray R., (2012) Harper: *Bioquímica ilustrada 29a*. Ed. McGraw Hill Mexico, Pp. 707
- Nardon C., Chiara F., Brustolin L., Gambalunga A., Ciscato F., Rasola A., Fregona D. (2015). Gold (III)-pyrrolidinedithiocarbamate Derivatives as Antineoplastic Agents. *ChemistryOpen*, 9999.
- Perkins N.D. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe, *TrendsBiochem. Sci.* 25 (2000) 434-440.
- Pierce B., (2010). *Genética: Un enfoque conceptual (3ª ed.)* España: Médica Panamericana.
- Prendiville W., Davies P. (2006). *The Health Professional's VPH Handbook: Human Papillomavirus and Cervical Cancer (Vol. 1)*. CRC Press.
- Primo Yúfera, E., Jiménez, M. E., Hernández, M. R., H Zambrano, M. L., Mateus, N., Machado, V. y S Ribiero, P. (1995). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. *Información Tecnológica Vol. 12, no. 6 (2001), p. 47-50*.

Ramírez Agudelo M y Rojas López M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177.

Raya J., (2013) Efecto antiproliferativo, citotóxico inductor de muerte del Disulfiram en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Tesis licenciatura, UNAM-FES Zaragoza.

Ronconi L., Marzano C., Zanello P., Corsini M., Miolo G., Maccà. (2006). Gold (III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *Journal of medicinal chemistry*, 49(5), 1648-1657.

Siegel R., Jiemin Ma., Zou Zhaochui (2014) Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 2014., 64:9-29

Skrott Z., Cvek B. (2012). Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(12), 1184-1192.

Vandenabeele P., Galluzzi L., Berghe T. V., Kroemer G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(10), 700-714.

Wang W., McLeod H. y Cassidy J., (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances. *International Journal of Cancer*, 104 (4): 504-511.

Wickström M., Danielsson K., Rickardson L., Gullbo J., Nygren P., Isaksson A., Lövborg H. (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical pharmacology*. 73(1), 25-33.

Wiggins H. L., Wymant J. M., Solfa F., Hiscox S. E., Taylor K. M., Westwell A. D., y Jones A. T. (2015). Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 93(3), 332-342.

Wynne J. H., Jensen, S. D., Snow, A. W. (2003). Facile one-pot synthesis of S-alkyl thiocarbamates. *The Journal of organic chemistry*, 68(9), 3733-3735.

Yip N. C., Fombon I., S Liu., P. Brown., S. Kannappan., V. Armesilla., Wang. W. (2011). Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *British journal of cancer*, 104(10), 1564-1574.

Zaldívar-Machorro V., Demare P., Ramírez M., Regla I. y Muñoz C., (2006). Inhibitory Effects of Disulfiram and Metabolites on *Pseudomonas aeruginosa* Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Growth. *Biochimie*, 93: 286-295.

Referencias:

DynaMed. Disulfiram. Sitio web de EBSCO. Disponible en: <http://www.ebscohost.com>
Actualización 18 de enero de 2015. Recuperado el 13 de junio de 2016

GLOBOCAN (2015) International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Recuperado 14 de enero de 2016 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Censo de Población y Vivienda. Gobierno Federal, México., 2014.

MedilinePlus. (2011). US National Library of Medicine. Sitio web de MedilinePlus. *Disponible en:* <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682602-es.html> Actualización 1 de julio de 2016. Recuperado 13 de agosto del 2016.

NCI National Cancer Institute USA.gov National Institutes of Health Department of Health and Human Services sitio web: www.cancer.gov última actualización 5-5-2015 Consultado 12-9-16

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). 10 datos sobre el cáncer. Consultado el 8-01-2016. <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>.

Apéndice

Líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCu)

Las líneas celulares de CaCu utilizadas en este trabajo fueron: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2016)., CaSki, células provenientes de carcinoma cervicouterino, establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2013)., y ViBo, células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Medio de cultivo

RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute., Gibco, E.U.A.) -----10.42 g

NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. Finalmente se suplementa al 1% Estreptomina/Penicilina.

La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (SFB) o suero de ternera neonatal (STN), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm.

Desactivación del suero

Tanto el SFB (suero fetal bovino., Hyclone, E.U.A.) como el STN (suero de ternera neonatal., Gibco, E.U.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 en tubos cónicos de plástico estériles.

Composición del RPMI-1640 (Gibco, E.U.A.)

SALES INORGÁNICAS		mg/L	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		100	
KCL		400	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		100	
NaCl		6000	
NaHCO ₃		2000	
Na ₂ HPO ₄		800	
AMINOÁCIDOS		mg/L	
L-arginina.HCL		200	
L-asparagina.H ₂ O		50	
L-ácido aspártico		20	
L-cistina		65.20	
L-ácido glutámico		20	
L-glutamina		300	
Glicina		10	
L-histidina.HCL.H ₂ O		15	
Hidroxiprolina		20	
L-isoleucina		50	
L-leucina		50	
L-lisina.HCL		40	
L-metionina		15	
L-fenilalanina		15	
L-triptofano		5	
L-prolina		20	
L-tirosina		28.33	
L-serina		30	
L-valina		20	
L-treonina		20	
VITAMINAS		mg/L	
Biotina		0.200	
pantotenato de calcio		0.250	
cloruro de colina		3	
ácido fólico		1	
Inositol		35	
nicotinamida		1	
ácido p-aminobenzóico		1	
piridoxina.HCL		1	
Riboflavin		0.200	
tiamina.HCL		1	
vitamina B12		0.005	
OTROS		mg/L	
Glucose		2	
Glutaciona		1	
rojo de fenol		5	

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Es utilizada 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 solubilizan en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	8.00 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	2.16 g
Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.20 g

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 calor húmedo finalmente la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes (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 (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	3.04 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.04 g
Etilen- diamen- tetra- acetico (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.40 g

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 de ácido acético (10%)

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se llevan a un volumen de 90 mL con agua bidestilada.

Glutaraldehído

Esta solución la utilizamos para fijar las células. La tendencia a formar uniones cruzadas hace del glutaraldehído un fijador útil, además para mantener la integridad estructural de los tejidos. Se prepara tomando 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada. Se almacena a 4 °C.

Colorante cristal violeta (0.1%)

NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	3.96 g
Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	4.28 mL
Cristal violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	1 g

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. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.