



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
Laboratorio No. 6, 2do piso, UMIEZ

**Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del metabolito MeDDTC-SO₂
sobre líneas tumorales provenientes de cáncer cérvico uterino**

T E S I S

PARA TENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

APARICIO SÁNCHEZ URIEL YAIR

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. MARÍA ELENA MEJÍA MONTOYA*

*Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos". ISSTE. Banco de sangre

ASESOR INTERNO: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



CIUDAD DE MÉXICO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El cáncer es ubicuo en nuestra población humana; la única manera cierta de evitarlo consiste en no nacer, ya que vivir supone un riesgo.

- *S.L. Robbins*

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

A la M. en C. María Elena Mejía Montoya, por sus enseñanzas, sus aportaciones que le brindó a mi trabajo, el tiempo para resolver mis dudas y sus palabras de inspiraron.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por aceptarme en su grupo de trabajo, por su paciencia, por el interés en mi aprendizaje y por acercarme más a la investigación.

Al Dr. Hugo López Muñoz por ser un excelente profesor al resolver mis dudas e inspirarme a ser un mejor profesionista.

A la Dr. María de Lourdes Mora García por su amabilidad, por su tiempo dedicado al revisar este trabajo y sus recomendaciones para mejorarlo.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por las observaciones y correcciones realizadas en este trabajo y por el tiempo invertido.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán por su apoyo al realizar mis experimentos, por sus consejos y al tiempo destinado para aclarar mis interrogantes.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por toda la amabilidad, su disposición y el apoyo para brindarme el material necesario.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su ayuda en la mejora de mis resultados.

El presente trabajo fue realizado con apoyo de los proyectos PAPIIT IN226420, PAPIIT IN216718, CONACyT 255881 y CONACyT 258156.

Dedicatorias

A mi mamá, Paulina, por siempre apoyarme, brindarme los recursos para seguir estudiando, por creer en mi y siempre darme ánimos para seguir adelante. Sin ella llegar hasta este punto de mi vida profesional no hubiera sido posible. Te lo debo todo mamá, gracias por esto y más. Te amo.

A mi Abuelito, Ignacio, por siempre estar a mi lado como el padre que nunca tuve, por siempre impulsarme y ser parte fundamental de mi desarrollo como estudiante.

A mis hermanos, Jazmín y Obed, por siempre brindarme su apoyo incondicional, por siempre motivarme y hacerme sonreír en los malos momentos. Los adoro.

A mis amigos del laboratorio, Jorge, Braulio, Ulises, Tonantzin, Helena, Monica, Fer, Karen y Denisse.

A mi amiga, Aida, por darme los mejores consejos y estar para ahí para todo.

A Jocelin, porque en esta última etapa de mi vida se volvió una parte esencial.

ÍNDICE		
1. RESUMEN		1
2. MARCO TEORICO		2
2.1. La célula		2
2.2. Ciclo celular		2
2.3. Muerte celular		3
2.3.1. Apoptosis		5
2.3.2. Necrosis		8
2.4. Cáncer		9
2.5. Cáncer cervicouterino (CaCu)		11
2.5.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)		11
2.6. Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Cervicouterino		12
2.7. Disulfiram y sus metabolitos		15
2.8. MeDDTC-SO ₂		17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		18
4. JUSTIFICACIÓN		18
5. HIPOTESIS		18
6. OBJETIVOS		19
6.1. General		19
6.2. Particulares		19
7. MÉTODO		20
7.1 Cultivo de las líneas tumorales		20
7.2 Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación de Cristal Violeta para el cultivo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo		20
7.3 Evaluación de la muerte por necrosis basada en medición de la actividad de LDH (lactato deshidrogenasa)		21
7.4 Evaluación de la morfología celular apoptótica por tinción DAPI e inmunodetección de la caspasa 3 activa mediante microscopía de epifluorescencia		22
7.5 Evaluación de muerte por apoptosis mediante la detección de caspasa-3 activa por citometría de flujo		23
7.6 Evaluación de la capacidad proliferativa de linfocitos humanos por la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)		23
7.7 Determinación de la necrosis en linfocitos humanos por medio de la cuantificación de la actividad de LDH (lactato deshidrogenasa)		25
8 RESULTADOS		26
8.1 Actividad antiproliferativa de MeDDTC-SO ₂ en células tumorales		26
8.2 Actividad necrótica del MeDDTC-SO ₂ en células tumorales		28
8.3 Actividad apoptótica del MeDDTC-SO ₂ en células tumorales		29
8.4 Actividad antiproliferativa de MeDDTC-SO ₂ en células no tumorales		34
8.5 Actividad necrótica del MeDDTC-SO ₂ en linfocitos humanos		35
9 DISCUSIÓN		36
10 CONCLUSIÓN		39
11 PERSPECTIVAS		39
12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		40
13 APENDICE		46

1 RESUMEN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Los compuestos que se aplican actualmente en el tratamiento contra el cáncer son ineficientes en estados avanzados de esta enfermedad, generando la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos. Al respecto, el disulfiram (DSF) es un ditiocarbamato que ha sido utilizado para el tratamiento del alcoholismo y actualmente se le ha descrito con actividad antiproliferativa e inductor de apoptosis en diferentes líneas tumorales. Sin embargo, el DSF es metabolizado una vez que entra a torrente sanguíneo y se desconoce cuál de sus metabolitos es el responsable de dicha actividad. El S-metil-N,N-dietilditiocarbamato Sulfona (MeDDTC-SO₂), un metabolito del DSF, no ha sido estudiado, por lo que en este trabajo la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del MeDDTC-SO₂ fue evaluada en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

La actividad antiproliferativa fue evaluada mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta y expresada como la concentración requerida de compuesto para disminuir en un 50 % la densidad celular (IC₅₀). La actividad necrótica fue evaluada a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares. La actividad apoptótica fue determinada por microscopía de campo claro, observando las características morfológicas propias de células apoptóticas, así como la inmunodetección de la caspasa 3 activa en las células tumorales determinada por microscopía de epifluorescencia y cuantificada por citometría de flujo. Por último, la selectividad del compuesto fue evaluada determinando el efecto de las IC₅₀ en el potencial proliferativo de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica) a través de la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE) y de igual manera se determinó la actividad de LDH en los sobrenadantes celulares, para determinar su actividad citotóxica (necrótica) en estas células.

Los resultados obtenidos indican que la actividad antiproliferativa del MeDDTC-SO₂ fue dosis dependiente con valores de la IC₅₀ para HeLa, CaSki y ViBo de 0.493, 0.452 y 0.163 µg/mL respectivamente. No se detectó actividad significativa de LDH en los sobrenadantes tanto en células tumorales y no tumorales. Las líneas de cáncer cervicouterino mostraron características morfológicas típicas de células apoptóticas y mostraron positividad a la caspasa 3 activa. Las IC₅₀ del MeDDTC-SO₂ correspondiente para las líneas celulares tumorales, no afectaron la proliferación de linfocitos humanos. Lo anterior muestra que el MeDDTC-SO₂ presenta actividad antiproliferativa, con nula actividad necrótica, con capacidad de inducir muerte celular apoptótica en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, sin afectar el potencial proliferativo de células no tumorales, sugiriendo que este compuesto es un digno candidato para ser estudiado en modelos in vivo, con la intención de establecer su uso como agente antitumoral con potencial terapéutico.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 La célula

Son unidades estructurales fundamentales y las formas de vida más simples (Alberts y Bray, 2006). En su interior se producen numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, reproducirse por división, producir energía para sus actividades, ocuparse de actividades mecánicas, reaccionar a estímulos y eliminar residuos. El conjunto de estas acciones se llama metabolismo (Karp, 2011).

El crecimiento de los organismos depende de un aumento en la masa o el tamaño general de los tejidos. Este proceso es el resultado del aumento en el volumen celular, o a través del incremento del número de células mediante la proliferación (Jo *et al.*, 2009) y que es mediado por el ciclo celular.

2.2 Ciclo celular

Este ciclo está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre (Lodish, 2005) permitiendo crecer y reemplazar las células a medida que se desgastan. En los animales, el ciclo de una célula normal toma alrededor de 24 horas de principio a fin para los diferentes tipos de células, aunque algunas, como las de la piel o las tumorales, están constantemente pasando por este ciclo. La secuencia de eventos que se producen cuando se estimula una célula para crecer y dividirse constituye el ciclo celular (Fig.1). Inicia con células estimuladas por factores de crecimiento con el fin de entrar en el ciclo celular (fase G1), en el que se prepara para un período de síntesis de ADN (fase S). Hacia el final de G1, hay un punto de restricción (R), en que se repara el ADN en caso de estar dañado, las proteínas supresoras de tumores como la del retinoblastoma RB y la familia de las proteínas p53, actúan en la fase G1 regulándola de manera importante. La proteína RB tiene como función principal inhibir la transición de la fase G1 a S. Su actividad depende de su estado de fosforilación: si RB no está fosforilada (estado activo), se encuentra unida al factor de transcripción E2F evitando su translocación al núcleo y la activación de genes necesarios para la síntesis del ADN (López-Marure, 2003). De no ser así, sigue adelante el ciclo. Una vez que se han duplicado sus cromosomas, la célula entra a un segundo período de crecimiento (fase G2), cuando se prepara para dividirse en dos células hijas durante el período de la mitosis (fase M). Esta fase M se divide en una serie de pasos discretos que comienzan con la profase, metafase, anafase, telofase y, finalmente, el proceso de la citocinesis, en donde la célula origina a dos células hijas iguales con el mismo material genético (Cruz *et al.*, 2014).

Las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, bien para poder ser reparado, o bien para inducir la muerte programada cuando el daño es muy grande. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del ADN (Burgués *et al.*, 2005).

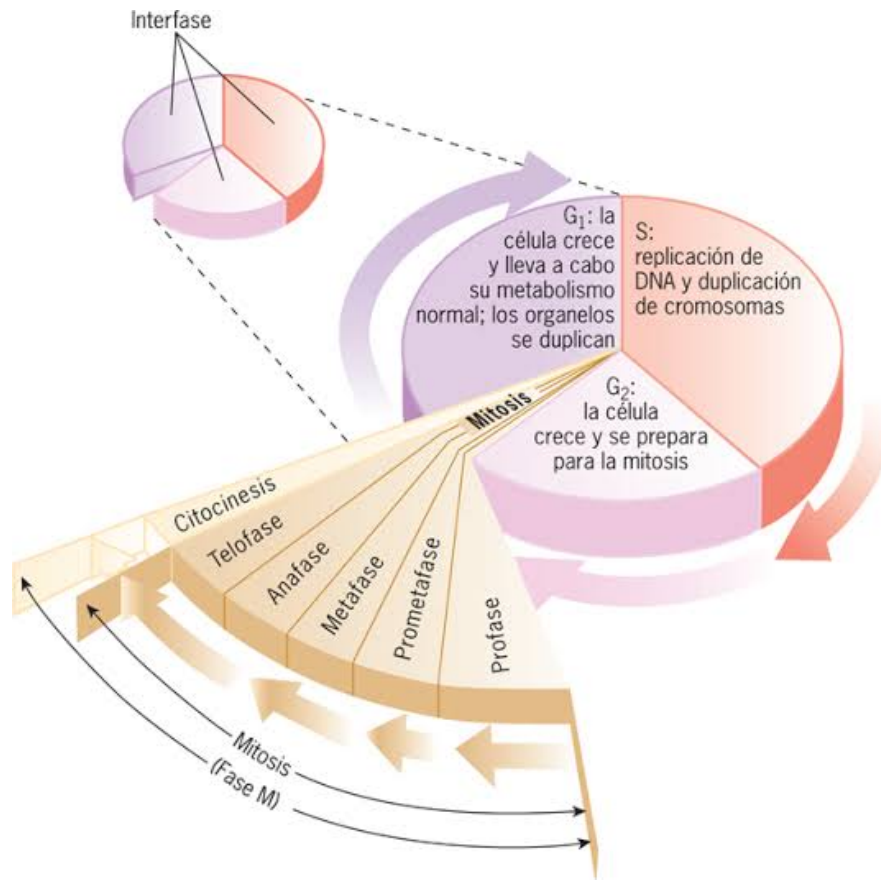


Figura 1. Esquema de las fases del ciclo celular. Modificada y obtenida de Karp, (2014).

2.3 Muerte Celular

La muerte celular es parte fundamental del desarrollo normal y el ciclo de maduración, así como un componente de respuesta de los tejidos vivos a los agentes xenobióticos (es decir, microorganismos y productos químicos) y a las modulaciones endógenas, como la inflamación (Kanduc *et al.*, 2002). Las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular manteniendo un equilibrio (homeostasis) a fin de garantizar la población adecuada en cada momento (Lizarbe, 2007). Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células. Existe otras

causas que provocan la muerte de las células como son: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios bioquímicos y morfológicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada (necrosis) (Degterev y Yuan, 2008) (Cuadro 1).

Necrosis	Apoptosis
Características Morfológicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la integridad de la membrana • Hinchamiento del citoplasma • Lisis celular total • Sin formación de vesículas • Desintegración (hinchamiento) de los organelos 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de ampollas en la membrana, pero sin pérdida de la integridad • Encogimiento del citoplasma y la condensación del núcleo • Fragmentación de las células en pequeños cuerpos • Formación de cuerpos apoptóticos • La mitocondria se vuelve permeable debido a la formación de poros involucrando proteínas de la familia bcl-2
Características Bioquímicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la regulación de la homeostasis de iones • Sin requerimiento de energía (proceso pasivo) • Fragmentación aleatoria del ADN posterior a la lisis 	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso fuertemente regulado que involucra la activación de enzimas (caspasas) • Dependiente de energía (ATP) • Fragmentación no aleatoria de ADN • Condensación de la cromatina • Liberación de varios factores (citocromo c, AIF) por la mitocondria en el citoplasma • Alteraciones en la membrana (translocación de fosfatidilserina desde el lado citoplasmático hasta el lado extracelular de la membrana)
Implicaciones fisiológicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Afecta a grupos de células circunstanciales • Inducida por alteraciones no fisiológicas (daño celular o tisular) • Respuesta inflamatoria 	<ul style="list-style-type: none"> • Afecta a células individuales • Inducida por estímulos fisiológicos (falta de factores de crecimiento, cambios en el ambiente hormonal) • Fagocitosis por células como macrófagos • Sin respuesta inflamatoria

Cuadro 1: Características generales de la muerte celular por necrosis y apoptosis. Modificado y tomado de Kunapuli et al. (2006).

2.3.1 Apoptosis

Para definir a este proceso, se acuñó el término apoptosis, neologismo tomado del griego clásico (*apo*: “fuera de” o “separación” y *ptosis*: “caída”) que hace referencia a la caída de las hojas (Kerr *et al.*, 1972). Se identificó originalmente en *Caenorhabditis elegans* y más tarde en células de mamíferos (Cohen, 1997). Suicidio, muerte celular programada o apoptosis, es una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas que representen una amenaza para el organismo (Degterev y Yuan, 2008). La muerte por apoptosis es un proceso estrictamente controlado por un conjunto jerárquico de moléculas más ordenado que la necrosis (Los *et al.*, 2002); se detectan cambios morfológicos particulares. Estas características revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nuclear, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos, alteraciones del citoesqueleto y burbujeo de la membrana (manteniéndose intacta). Durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Kunapuli *et al.* 2006) (Fig. 2). La muerte celular por apoptosis se puede dar por dos vías, la vía extrínseca y la vía intrínseca. A continuación, se describen brevemente cada una de ellas.

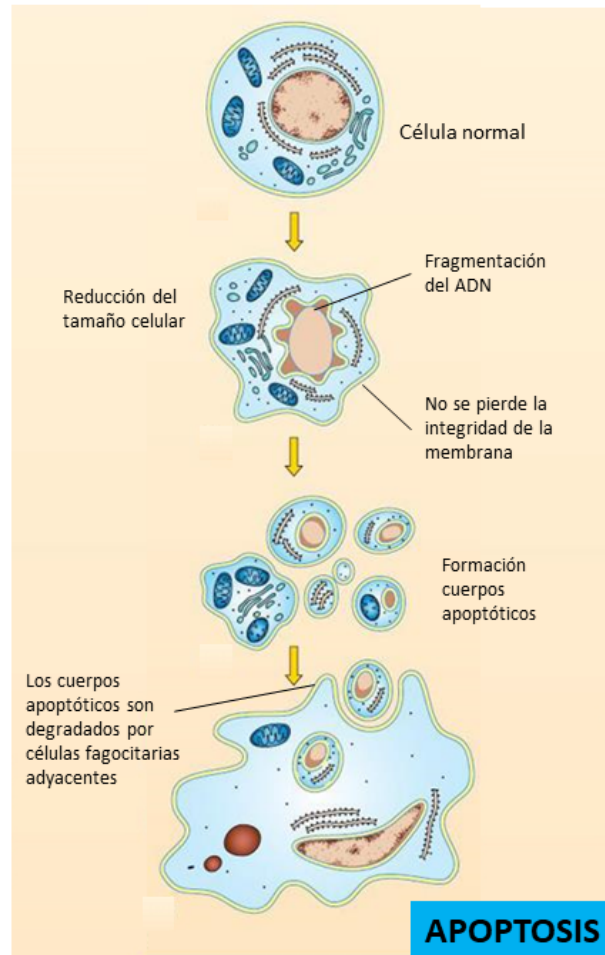


Figura 2. Proceso de muerte apoptótica. Modificada y tomada de <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology>

Vía extrínseca: Involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana celular en respuesta a señales extracelulares (Cuello *et al.*, 2006). En esta vía, los receptores como TNF, Fas y TRAIL interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas (Shen y Pervaizs, 2006). La ruta extrínseca causada por los receptores de Fas y su ligando induce una oligomerización de receptores Fas, que conducen a la activación del "Dominio de muerte" (DD, del inglés death domain). Mediante la unión de proteínas adaptadoras citosólicas FADD con los dominios DD activados se origina un complejo que puede unir a dos moléculas de procaspasa-8, que recíprocamente se auto-activan (Müller, 2008). Finalmente, la caspasa-8 puede activar a la caspasa-3, iniciándose así el programa de muerte celular (Shen y Pervaizs, 2006), o bien puede escindir a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. Bid truncado se traslada del citoplasma a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo C del

espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma para generar suficiente actividad de caspasas ejecutoras y provocar la muerte celular programada por la vía intrínseca (Velázquez *et al.*, 2004) (Fig. 3).

Vía intrínseca: Una señal determinada de muerte proveniente del interior de la célula, provocada por agentes genotóxicos, determinan una respuesta de estrés o daño celular que induce apoptosis a través de esta vía (Cuello *et al.*, 2006), donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO (Porter y Urbano, 2006). Entre los inductores de apoptosis más importantes se encuentra el supresor de tumores p23. Tras el daño del ADN, p23 inicia un periodo de reparación. Alternativamente, p23 puede enviar a la célula a apoptosis con daños de ADN irreparable; para ello p23 induce la expresión del gen bax. La proteína Bax regula en la membrana mitocondrial externa la liberación de citocromo C de la membrana interna de este orgánulo al citoplasma (Müller, 2008). El citocromo C liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa-9. La caspasa-9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Velázquez *et al.*, 2004), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Fig. 3).

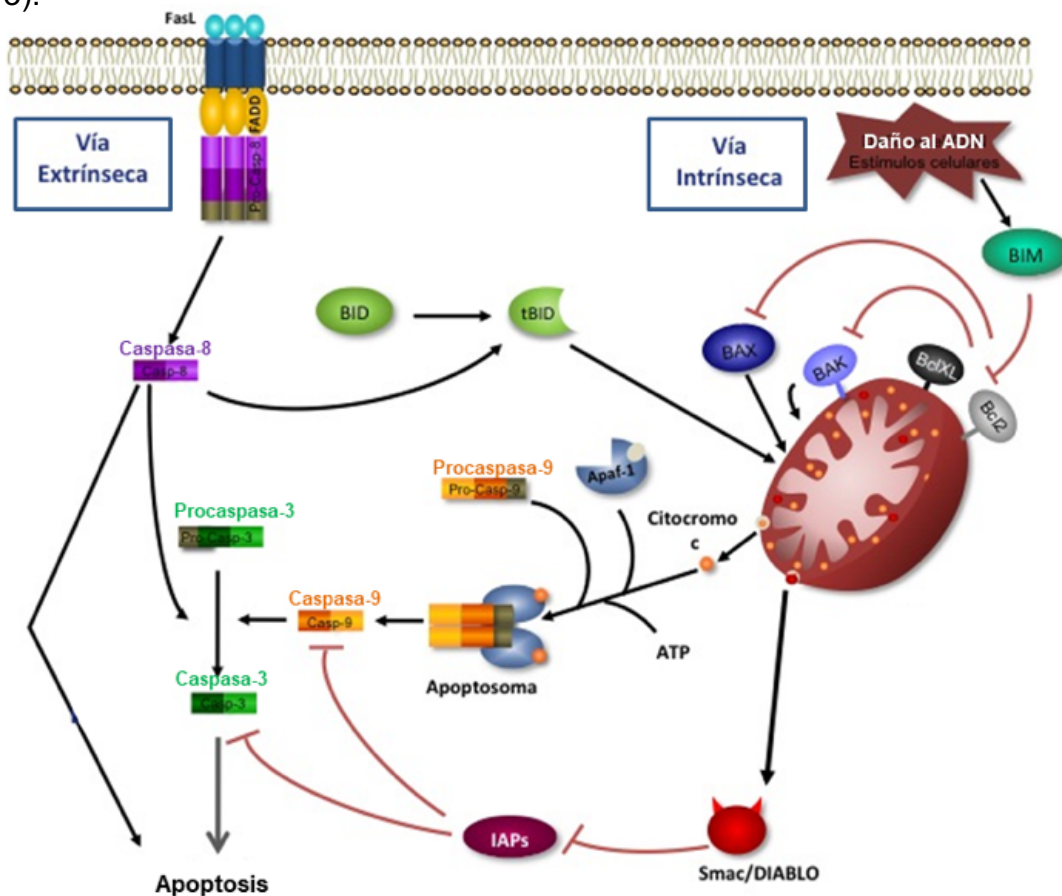


Figura 3. Esquema de las vías de la apoptosis. Modificada y tomada de Montero (2017).

2.3.2 Necrosis

La necrosis es considerada como una forma de muerte accidental, prematura e incontrolable que ocurre de manera aguda (Baynes y Dominiczak, 2019), mediante una agresión que causa lesión en una porción importante de células o de tejido. Esta agresión puede ser provocada por toxinas, hipoxia, isquemia, traumatismo y cualquier otra condición que genera caída de ATP. Esto crea cambios que histológicamente, están representados por desorganización. Entre los cambios nucleares, el ADN es partido en fragmentos irregulares al azar, también se han descrito picnosis nuclear o pérdida de volumen, y cariólisis, cuando ya no se detecta estructura cromatínica (Agudelo y López, 2010). Morfológicamente, hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular como las enzimas lisosomales, esta acción provoca daños adicionales al tejido, produciéndose la atracción de células del sistema inmune en el área, lo que genera el proceso de inflamación (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997) (Fig. 4).

La LDH (lactato deshidrogenasa) es una enzima citoplasmática oxidorreductasa, soluble y de gran tamaño. Está presente en casi todas las células y se libera en el espacio extracelular cuando se daña la membrana plasmática por lo tanto su presencia extracelular está siempre relacionada con la necrosis celular (Chan *et al.*, 2013).

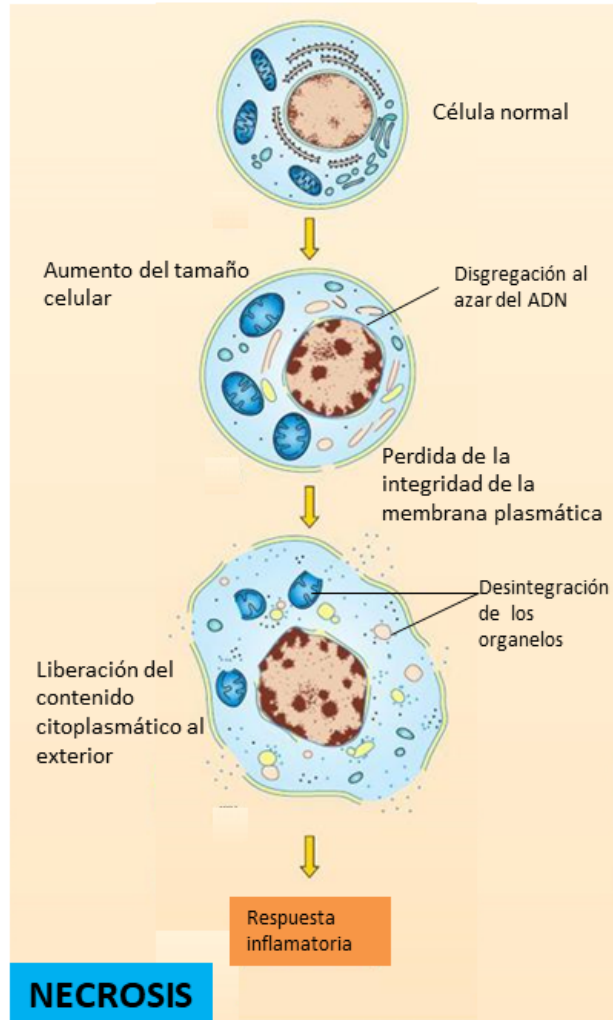


Figura 4. Proceso de muerte necrótica. Modificado y tomado de <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology>

2.4 Cáncer

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos (De la Garza y Juárez, 2013). Las características del cáncer incluyen funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de varios pasos en los tumores humanos a los que Hanahan y Weinberg (2011) llamaron sellos distintivos del cáncer. Estos incluyen el mantenimiento de la señalización autónoma proliferativa, evasión de los supresores de proliferación, escapatoria a la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado (atribuida a la presencia de telomerasa), la inducción de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), y la capacidad de invasión y metástasis. Recientemente se han añadido otras características; como son, desregulación energética celular, impedimento de la

respuesta inmune, inflamación promovida por el tumor, inestabilidad genómica y mutación (Karp, 2011; Pecorino, 2012; Hanahan y Weinberg, 2011).

El proceso de formación de un cancer consiste en múltiples alteraciones en el genoma de las células por acumulación de mutaciones en unos genes específicos, los cuales son la clave molecular para entender las raíces del cáncer. Entre los numerosos genes relacionados con la transformación maligna de células se encuentran dos grandes grupos, clasificados como oncogenes y genes supresores de tumores. Ambos presentan como denominador común su implicación en la proliferación celular. Los protooncogenes como genes que codifican proteínas, regulan de manera normal y fisiológica la cascada de eventos que sirven para mantener el control de la progresión del ciclo celular y el estado normal de diferenciación de la célula. Las versiones alteradas de estos protooncogenes por mutaciones dan lugar a los oncogenes. En consecuencia, las funciones de los productos génicos de los protooncogenes y de los oncogenes son diferentes; en los oncogenes estos productos son las oncoproteínas. Estas proteínas provocan una serie de cambios tanto celulares como moleculares, según el nivel molecular específico en donde actúen. De igual forma que los oncogenes, son determinantes en la evolución del cáncer. También los genes supresores de tumores desempeñan un papel clave en la tumorigénesis, ya que operan restringiendo o suprimiendo la proliferación celular bajo ciertas condiciones. Estos genes son sumamente importantes, ya que para la formación tumoral maligna es necesaria su inactivación o pérdida, lo que les confiere una naturaleza recesiva (Salazar *et al.*, 2013).

Las causas que provocan la progresión de un cancer residen en agentes que pueden alterar nuestros genes. Estos agentes externos se pueden dividir en tres grupos: agentes químicos, la mayoría producidos por la actividad industrial como los colorantes de acridina, la formalina, el ácido nitroso, agentes alquilantes, el benzopireno, el ácido bórico, parabenos, cromo hexavalente, entre otros; agentes físicos como radiaciones ionizantes: luz ultravioleta, partículas alfa, beta y gamma, u otras formas de radiación de alta energía; y agentes biológicos como bacterias (*Helicobacter pylori*) y virus (tales como VPH-16, VPH-18, virus de Epstein-Barr y otros) (De la Garza y Juárez, 2013; Salazar *et al.*, 2013).

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal. Consta de distintas formas de clasificarse, siendo tres los principales tipos: a) Los sarcomas proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. b) Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. c) Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas (Goldman, 2009; Mandal, 2014).

2.5 Cáncer cervicouterino (CaCu)

El CaCu es el crecimiento anormal de las células que se encuentran en el cuello de la matriz específicamente en la unión escamo-columnar que es el punto donde las células escamosas y columnares se encuentran. Esta unión se encuentra típicamente entre el ectocérvix central y el canal cervical inferior, pero la localización varía a lo largo de la vida de la mujer desde el desarrollo fetal hasta la menopausia (Vicuña *et al.*, 2009). Los principales factores para desarrollar CaCu son: infección cérvico vaginal por virus del papiloma humano de alto riesgo, tabaquismo, uso prolongado de hormonas, número elevado de embarazos, el inicio temprano de las relaciones sexuales sin protección en la adolescencia, múltiples parejas sexuales, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual (Secretaría de Salud, 2015).

De acuerdo con la OMS en 2018, murieron de CaCu unas 311 000 mujeres; más del 85% de esas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medios como México, en donde es la segunda causa de muerte, lo que representa un problema de salud pública asociado a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) que se transmite por contacto sexual (Ferlay *et al.*, 2018).

2.5.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma (VP), pertenece a la familia Papillomaviridae. Infecta específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. Los marcos de lectura se agrupan en dos conjuntos denominados genes de expresión temprana (E, early) y genes de expresión tardía (L, late). En el primer grupo se encuentran E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Las proteínas codificadas en el genoma que forman parte de la estructura del virión son solo dos: L1 y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López y Lizano, 2006).

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido. El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El ADN viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en

coordinación con la división celular. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo, la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales, donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones (Fig. 5) (Sanabria, 2009).

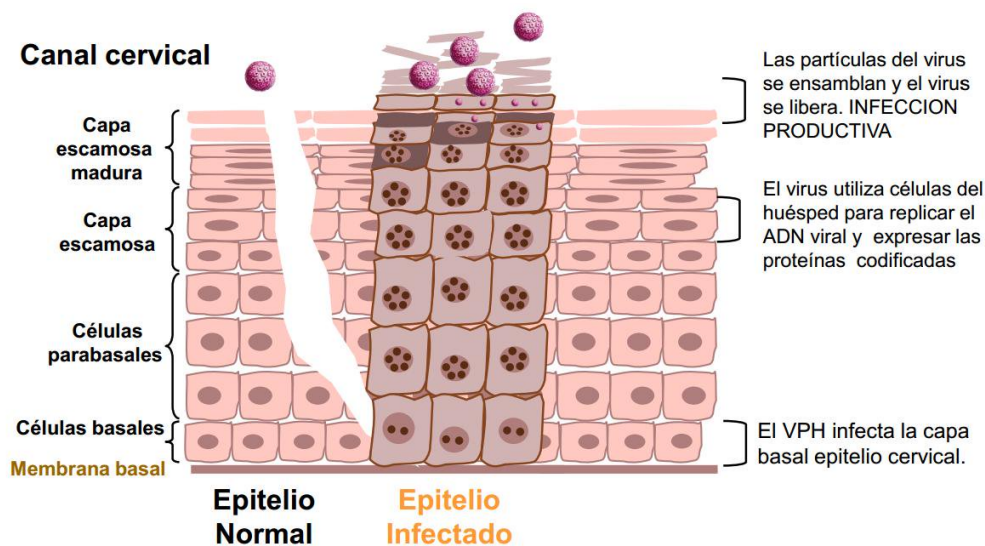


Figura 5. Ciclo de vida del VPH en el cérvix. Modificada y tomada de Frazer (2004).

Dicho proceso de infección inicia con la presencia de células atípicas en el epitelio cervical lo cual es conocido como displasia. Las lesiones displásicas pueden ser leves, moderadas o severas las cuales son consideradas precursoras del carcinoma in situ y del carcinoma invasor. Estas lesiones son también llamadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, NIC II o NIC III) (Medina-Villaseñor y Martínez-Macías, 2009).

2.6 Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Cervicouterino

El diagnóstico implica el uso de la citología como la prueba de Papanicolaou (que busca cambios en las células de la zona de transformación) el cual ha tenido muy poco impacto en la incidencia y mortalidad de cáncer de cuello uterino. Esto se puede explicar principalmente por la baja sensibilidad de la prueba y el elevado porcentaje de mujeres con anomalías citológicas que no son evaluadas y/o tratadas adecuadamente. Las pacientes con resultados de Papanicolaou anormales

se les incluye una valoración colposcópica, la confirmación del diagnóstico mediante biopsia y el tratamiento de lesiones precancerosas usualmente con asa electroquirúrgica (Almonte *et al.*, 2010).

El tratamiento del cáncer es la serie de intervenciones (incluyendo apoyo psicosocial, cirugía, radioterapia, quimioterapia, entre otras) dirigidas a curar la enfermedad o prolongar considerablemente la vida del paciente al tiempo que se mejora su calidad de vida. El tratamiento del cáncer cervicouterino estará determinado por el tamaño tumoral, extensión de la invasión miocervical, invasión parametrial, extensión de la pared pelviana, afectación de los ganglios linfáticos y presencia de metástasis (Son *et al.*, 2010).

Cirugía: La cirugía es el método más empleado para aquellos tumores pequeños, tiene la ventaja de un tiempo más corto de tratamiento, conocimiento preciso de la extensión de la enfermedad, extirpación de la lesión primaria, lesión tisular más limitada, potencialmente preservar los ovarios y, en casos especiales, incluso la función reproductiva. El médico puede emplear uno de varios tipos de cirugía disponibles para el carcinoma *in situ* con el fin de destruir el tejido canceroso:

- La criocirugía consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- La cirugía con rayo láser consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.

El cirujano puede extraer el cáncer empleando una de las siguientes operaciones:

- La conización consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anomalía. La conización se emplea para extraer un pedazo de tejido para una biopsia, pero también puede utilizarse para el tratamiento del cáncer incipiente del cuello uterino.
- La histerectomía es una operación en la cual se extrae el útero y el cuello uterino además del cáncer. La operación se llama histerectomía vaginal, si el útero se extrae a través de la vagina; histerectomía abdominal total, si se extrae mediante un corte (incisión) en el abdomen; salpingooforectomía bilateral, cuando son extraídos los ovarios y las trompas de Falopio; durante la histerectomía radical se extrae el cuello uterino, el útero y parte de la vagina; cuando también se extrae los ganglios linfáticos de la región se denomina disección de los ganglios linfáticos (Junta de Andalucía, 2006).

Radioterapia: utiliza rayos X de alta energía u otras formas de radiación para matar células cancerosas o para evitar que crezcan. Para tratar el cáncer de cuello uterino

generalmente se utilizan dos tipos de radioterapia: la terapia de haz externo (EBT), la braquiterapia, o ambas. Las radioterapias se utilizan generalmente juntas o en combinación con la cirugía.

- **Terapia de haz externo:** Durante la terapia de haz externo, se aplican al tumor haces de electrones o rayos X de alta energía. Los haces son usualmente generados por un acelerador lineal y dirigidos a la destrucción de células cancerosas mientras se evita dañar los tejidos normales circundantes. Muchos pacientes reciben un tipo de terapia por haz externo llamada radioterapia de intensidad modulada (IMRT).
- **Braquiterapia o terapia de radiación interna:** La braquiterapia utiliza un aparato de colocación para colocar material radiactivo adentro de la paciente en forma temporal o permanente para dañar el ADN de las células cancerosas y destruir la capacidad de dichas células para dividirse y crecer. Este tipo de radiación solamente viaja distancias cortas en comparación con la radiación de haz externo (ACR, 2019).

Quimioterapia: La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para eliminar células cancerosas. Puede tomarse en forma de píldoras o vía intravenosa (IV). La quimioterapia se considera un tratamiento sistémico ya que el medicamento es introducido al torrente sanguíneo, viaja a través del cuerpo y puede eliminar células cancerosas fuera del cuello uterino. Se dispone de una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos, la elección y la dosificación de los cuales depende de los beneficios relativos de cada fármaco, como la combinación de varios de ellos. Dentro de las consideraciones previas a la elección del tratamiento es considerada la evolución natural de la neoplasia concreta, circunstancias y tolerancia de la paciente y la probabilidad de conseguir una respuesta beneficiosa. Entre los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer cervicouterino se encuentran la cisplatino, carboplatino, paclitaxel, gemcitabina, topecan y bleomicina (Markman, 2010).

Generalmente se requiere de la combinación de las terapias para obtener éxito, no obstante, generan efectos secundarios en el paciente, como pérdida de cabello, irritabilidad, vómito, mareo, por citar algunos. Estos tratamientos son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas sin dañar en forma simultánea a las células normales. Ante esta situación se buscan nuevos tratamientos y medidas de prevención que permitan una mejor calidad de vida del paciente.

Entre las nuevas alternativas para contrarrestar el cáncer se buscan compuestos que tengan potencial antiproliferativo y sean selectivos. Actualmente se ha encontrado que fármacos que además de presentar su acción biológica, presentan

actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer. Un ejemplo es el ácido zolodróico, un fármaco que se utiliza para el reforzamiento de huesos y que actualmente se le ha encontrado efecto apoptótico en mesotelioma (Okamoto *et al.*, 2013). Otro ejemplo es el ácido acetilsalicílico además de ser un antiinflamatorio tiene actividad de prevención para el cáncer de colon (Markowitz, 2007). O, el diclofenaco una droga antiinflamatoria que se le ha encontrado actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de colon (Smirnova *et al.*, 2012). En la búsqueda de este tipo de fármacos se ha encontrado el Disulfiram.

2.7 Disulfiram y sus metabolitos

El disulfiram (DSF) [bis (dietilcarbamoil) disulfuro] miembro de la familia de los ditiocarbamatos (Shen *et al.*, 2000), es un fármaco aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), y ampliamente utilizado para combatir el alcoholismo mediante la inhibición de la enzima aldehído deshidrogenasa ALDH2, enzima fundamental para el metabolismo del alcohol. El etanol se metaboliza a acetaldehído por la enzima alcohol-deshidrogenasa, y este acetaldehído se metaboliza a acetato por la enzima aldehído-deshidrogenasa (Koppaka *et al.*, 2012). El disulfiram al ser administrado previamente a una ingestión de alcohol, a 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, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo entre 5 a 10 veces mayor a lo normal (Salazar, 2010). Sin embargo, el DSF es considerado como una sustancia relativamente no tóxica cuando se administra en dosis terapéuticas (Suh *et al.*, 2006).

El Disulfiram se han utilizado clínicamente como antioxidante, antibacterial, antifúngico y vermicida. En la década anterior, la actividad antitumoral del disulfiram en células tumorales se ha investigado, encontrando que disminuye la proliferación de células de carcinoma pulmonar (Ryan y Wilding, 2000), melanoma (Brar *et al.*, 2004), y células de cáncer colorrectal (Wang *et al.*, 2003). Además ha mostrado reducir angiogénesis inhibiendo las interacciones con las metaloproteinasas y la actividad proteolítica (Shine-Gwo *et al.*, 2003; Gourley y Williamson, 2006), induce apoptosis en células de cáncer de mama (Chen *et al.*, 2006), carcinoma de ovario (Dazhi *et al.*, 2002), en células de leucemia mieloide U937 (Navrátilová *et al.*, 2009), en líneas celulares de cáncer de colón DLD-1 y RKO(WT) (Wang *et al.*, 2003), en la línea celular Hep3B de carcinoma hepatocelular (Hoda *et al.*, 2016) y promueve apoptosis en células de melanoma humano metastásico 46A-C81, C81-61 y C83-2C (Cen *et al.*, 2002). También presenta un efecto citotóxico en células de osteosarcoma humanas U2OS (Hyun-Ji *et al.*, 2007) y mostraron reducir la

angiogénesis (Gourley y Williamson, 2006). Se ha registrado que el efecto anticancerígeno se potencia con cobre (Cu^{2+}), ya que el cobre juega un papel crucial en reacciones redox y desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen la apoptosis en células humanas (Morrison *et al.*, 2010). Algunas de las propiedades atribuidas a los ditiocarbamatos demuestran que presentan acción antineoplásica sobre la línea celular U-937 (leucemia humana) y actividad antioxidante (Malaguarnera *et al.*, 2003). Todos estos estudios que respaldan la actividad antitumoral del DSF fueron realizados de manera *in vitro*.

En 1977, Cobby y colaboradores demostraron que el DSF no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol, ya que encontraron que después de ser ingerido, es reducido rápidamente a Dietilditiocarbamato (DDC) por acción de la enzima glutatión reductasa. Además, Zuben y colaboradores en 2005 reportan que la actividad inductora de apoptosis no es realizada por el DSF directamente, ya que éste es convertido rápidamente a otros metabolitos; lo que sugiere, que los responsables de la actividad biológica son los metabolitos resultantes, siendo más importantes que el DSF por sí solo. Por lo que existe un interés en la síntesis de análogos del DSF así como de sus metabolitos para su evaluación como agentes antiproliferativos e inductores de apoptosis.

In vivo, el DSF se metaboliza fácilmente siguiendo la ruta representada en la figura 6. En primer lugar, DSF se reduce a DDC por la glutatión reductasa. DDC se metila a MeDDTC, que se puede convertir a MeDDTC-SO o MeDTCSO. Los sulfóxidos se oxidan a las respectivas sulfonas: MeDDTC-SO₂ o MeDTC-SO₂ (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011).

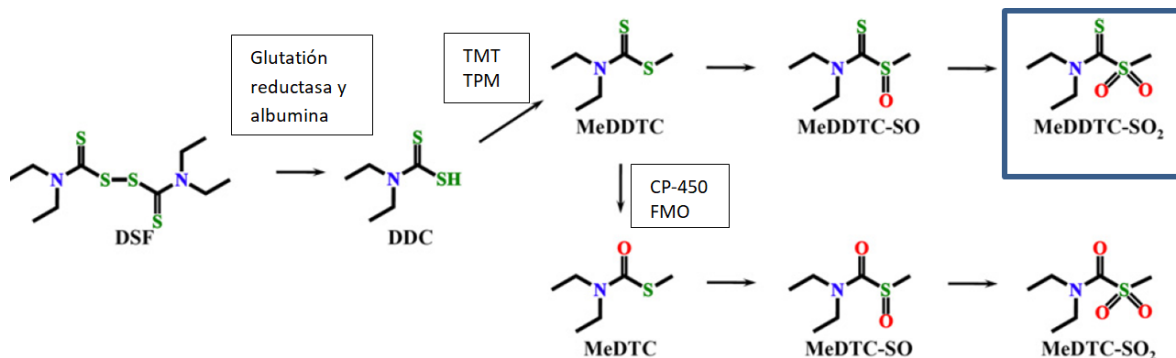


Figura 6. Vía metabólica del disulfiram: El DSF es reducido rápidamente a Dietilditiocarbamato (DDC) por acción de la glutatión reductasa, DDC, N,N-dietilditiocarbamato ácido; el cual, sufre una reacción de metilación sulfurada para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el MeDTC, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato; y respectivamente MeDTC-SO, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato sulfóxido; éste es el precursor de MeDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato sulfona; o bien el MeDDTC, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato puede sufrir una oxidación para formar MeDDTC-SO, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato sulfóxido; seguida de otra oxidación del sulfóxido para formar MeDDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato sulfona. En el recuadro azul el metabolito que se evaluó en este trabajo. En los recuadros negros: TMT, tiol metiltransferasa; TPMT, tiopurin metiltransferasa; CP-450: complejo citocromo P-450; FMO, flavina que contienen mono-oxigenasas (Modificada y tomada de Zaldívar-Machorro et al., 2011).

2.8 MeDDTC-SO₂

El S-metil-NN-dietilditiocarbamato Sulfona (MeDDTC-SO₂) es un metabolito del Disulfiram al cual no se le ha estudiado su actividad antiproliferativa en alguna línea celular tumoral. Se ha encontrado que de manera *in vitro* lleva a la inactivación enzimática de la betaína aldehído deshidrogenasa del patógeno oportunista humano *Pseudomonas aeruginosa*, por lo tanto, puede ser un fármaco con potencial biológico incluso mejor que sus metabolitos (Zaldívar-Machorro et al. 2011). Este compuesto resulta de la oxidación de su precursor sulfóxido (MeDDT-SO) (Figura 6).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los tratamientos como la quimioterapia y radioterapia utilizados contra el cáncer son poco selectivos, afectando a las células normales. Los quimioterapéuticos destinados para el tratamiento del cáncer cervicouterino tienen bajo éxito con pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad y tienen actividad necrótica, que desencadena en efectos secundarios que deterioran la calidad de vida de las pacientes. Generando la necesidad de buscar o sintetizar nuevos compuestos que presenten actividad antiproliferativa, baja actividad necrótica, inductores de muerte celular programada y de acción selectiva.

4 JUSTIFICACIÓN

El Cáncer cervicouterino constituye uno de los mayores problemas de salud individual y colectiva en el contexto mundial, debido a que es una de las neoplasias más común entre mujeres. La Organización Mundial de Salud (OMS) reconoce que es necesario mejorar los programas de detección y tratamiento del CaCu, sin los cuales podría aumentar índice de muertes por esta causa, siendo más afectados los países en desarrollo (Arzuaga-Salazar *et al.*, 2012). En México es la segunda causa de muerte por lo que cada año mueren más de 3500 mujeres por este cáncer (Ferlay *et al.*, 2018).

En este sentido, y ante la ineficiencia de los actuales tratamientos contra el cáncer cervicouterino, se han empleado compuestos como terapias alternativas, dentro de éstos se encuentra el Disulfiram y sus metabolitos, que han mostrado potencial anticancerígeno, por lo que resulta relevante evaluar el metabolito MeDDTC-SO₂ como posible candidato terapéutico.

5 HIPÓTESIS

Se tiene registro que el Disulfiram y algunos de sus metabolitos presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en diferentes tipos de cáncer, por lo que se espera que el metabolito MeDDTC-SO₂ presente actividad antiproliferativa, así como inductora de apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de CaCu.

6 OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo del S-metil-NN-dietilditiocarbamato Sulfona (MeDDTC-SO₂) así como su efecto inductor de apoptosis o necrosis en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo y en cultivos de células linfocíticas humanas.

6.2 PARTICULARES

- Determinar el efecto antiproliferativo del MeDDTC-SO₂, expresado como la cantidad requerida del compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular (IC₅₀), en cultivos de células de CaCu, HeLa, CaSki y ViBo, mediante la técnica de incorporación de Cristal Violeta.
- Evaluar el efecto necrótico del compuesto MeDDTC-SO₂ en cultivos de células de CaCu, mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH (Lactato Deshidrogenasa).
- Evaluar el efecto apoptótico del compuesto MeDDTC-SO₂ en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo a través de la observación de las características morfológicas propias de las células apoptóticas por microscopia de contraste de fases y tinción con DAPI, así como la inmunodetección de la caspasa-3 activa observada por microscopía de fluorescencia y cuantificada por citometría de flujo (# de células positivas a la caspasa 3 activa).
- Determinar si las IC₅₀ del compuesto MeDDTC-SO₂ obtenida para las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo afectan la capacidad proliferativa de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana por la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CFSE).
- Determinar si el compuesto MeDDTC-SO₂ induce muerte necrótica en linfocitos humanos mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH (Lactato Deshidrogenasa).

7 MÉTODO

7.1 Cultivo celular de las líneas tumorales

Las líneas tumorales de cáncer cervicouterino que se utilizaron son: HeLa, línea celular establecida de un adenocarcinoma proveniente del cérvix, estas células están infectadas con VPH 18 (ATCC, 2012). CaSki, línea celular establecida de células derivadas de metástasis en el intestino delgado, provenientes de carcinoma epidermoide de cérvix, estas células tienen integrado el genoma del VPH 16 (ATCC, 2012). ViBo, esta línea celular es un carcinoma de células epidermoides provenientes del cérvix, no metastásicas derivadas del cérvix, es VPH negativo (Monroy *et al.*, 1992).

Bajo condiciones de esterilidad se realizó el cultivo en una campana de flujo laminar. Las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las tres líneas (HeLa, CaSki y ViBo) se cultivaron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 mL de RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% con suero de neonato de ternera (NCS; Gibco, USA) previamente desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a una temperatura de 37°C y con 5% de CO₂.

7.2 Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación de Cristal Violeta para el cultivo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.

Se sembró en placas de cultivo celular de 96 pozos, de fondo plano (Corning, USA) 4000 células por pozo provenientes de CaCu, con 100 µL de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 horas para su adherencia. Después de las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto MeDDTC-SO₂ a probar en RPMI-1640 fresco (al 5 % de NCS) a las concentraciones deseadas, a partir de una dilución seriada. El ensayo contempló la cantidad de vehículo (concentración del disolvente: DMSO) para comprobar que el efecto obtenido en las diferentes pruebas es debido al compuesto y no al vehículo en el que éste está es disuelto.

El cultivo con el tratamiento de MeDDTC-SO₂ se mantuvo por 24 horas, dando un tiempo total de cultivo de 48 horas para el caso de las células tumorales. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta. Para ello, una vez concluido el tiempo de tratamiento con el compuesto, se retiró completamente el medio de cultivo de las placas de cultivo; inmediatamente después, las células fueron fijadas con 50 µL de glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Chemical, USA), por 20 minutos; posteriormente, se les retiró el fijador, se realizaron lavados con agua destilada y se dejó secar al aire, después, se procedió a teñir las células con 50 µL del colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-

Aldrich, USA) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM (Sigma-Aldrich, USA) pH 6 por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en 50 μ L ácido acético al 10 % (J.T. Baker, Mex.), por 20 minutos en agitación constante, para finalmente medir la absorbancia a 600 nm en un lector de placas de ELISA (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA).

Para calcular el decremento en un 50 % del número celular (IC_{50}) para cada línea tumoral, los datos obtenidos por el lector de placas fueron procesados en el programa Microsoft® Office Excel 2010; se obtuvieron gráficos, y posterior a esto, un análisis de regresión lineal para calcular las IC_{50} (para la obtención se usó la fórmula $IC_{50} = (50 - a)/b$, siendo a y b las constantes de la línea recta).

7.3 Evaluación de la muerte por necrosis basada en medición de la actividad de LDH (lactato deshidrogenasa)

En placas de 96 pozos de fondo plano se cultivaron 4000 células de las correspondientes líneas celulares de CaCu por pozo con 100 μ L de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con la concentración de IC_{50} según cada tipo celular por 24 horas adicionales para las células de CaCu; dando un total de 48 horas de cultivo. Posteriormente se colectó el medio de cultivo de cada condición en placas de fondo cónico y fueron centrifugados a 4000 rpm a 4°C para desechar cualquier resto celular.

Las condiciones para la evaluación fueron los siguientes controles: control basal (únicamente medio de cultivo sin células), control negativo (células sin tratamiento, con medio de cultivo y suero al 5 %), control positivo (células permeadas durante 1 hora con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 10 % en medio de cultivo fresco), vehículo (DMSO en la concentración utilizada para el tratamiento con MeDDTC-SO₂) y concentraciones de IC_{50} respectivas para cada línea; cada uno por triplicado.

Para la valoración: 40 μ L del sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 pozos de fondo plano, a cada pozo se adicionó 40 μ L de la mezcla de reacción del kit Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) y se dejó incubar por 25 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm usando lector de placas de ELISA (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA). Con los datos obtenidos de las lecturas del espectrofotómetro se calculó el porcentaje de la actividad de la enzima LDH, utilizando el programa Microsoft® Office Excel 2010 (los datos se analizaron tomando como referencia el control positivo como un 100%).

7.4 Evaluación de la morfología celular apoptótica por tinción con DAPI e inmunodetección de la caspasa 3 activa mediante microscopía de epifluorescencia

Se sembraron 4000 células por pozo de las líneas tumorales en una placa de 96 pozos de fondo plano en 100 μ L de RPMI-1640 al 5% de NCS; y el cultivo se mantuvo en una incubadora a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se estimularon las células con las siguientes condiciones: **a)** control (medio de cultivo fresco), **b)** vehículo (concentración máxima de DMSO correspondiente a cada IC₅₀ determinada para cada línea tumoral), **c)** concentraciones de IC₅₀ determinadas para cada línea tumoral y **d)** control positivo de muerte apoptótica con Camptotecina (Sigma-Aldrich, USA), con una concentración específica determinada para cada línea tumoral. La placa se mantuvo en incubación bajo esas condiciones durante 24 horas.

Acontecidas las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con 50 μ L/pozo de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4% en PBS por 2 horas en agitación constante. Se hicieron 5 lavados con 100 μ L/pozo de PBS estéril y filtrado, y se realizó la permeabilización celular con 50 μ L de Tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4°C durante 5 minutos, después de este tiempo se realizaron 5 lavados más con 100 μ L de PBS. Posteriormente se adicionó 30 μ L/pozo de anticuerpo 1° anti-caspasa 3 activa (hecho en conejo, SIGMA) con proporción 1 a 500 μ L de PBS, durante 24 horas en refrigeración. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron nuevamente 5 lavados con 100 μ L de PBS y se añadió 30 μ L/pozo de anticuerpo 2° anti-conejo (hecho en ratón, SIGMA) con proporción 1 a 1000 μ L de PBS, el cual lleva acoplado el fluorocromo FIT-C, a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 2 horas. Se lavó nuevamente 5 veces con 100 μ L de PBS y se agregaron 15 μ L de fluorocromo DAPI (Sigma-Aldrich, USA) protegido de la luz durante 1 minuto. Finalmente se realizaron los últimos 5 lavados con 100 μ L de PBS y las células contenidas en placa se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, Japón) y se fotografiaron, para posteriormente analizarse.

7.5 Evaluación de muerte por apoptosis mediante la detección de caspasa-3 activa por citometría de flujo

Por cada pozo se sembró un total de 200,000 células para cada una de las líneas tumorales de cáncer cervicouterino en una placa de 6 pozos de fondo plano en 2.5 mL de medio RPMI-1640 al 5% de NCS, por pozo; y se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 24 horas. Al término de estas, se estimularon las células teniendo un control (medio de cultivo fresco, correspondiente a cada línea tumoral), vehículo (concentración de DMSO, según la IC₅₀ obtenida, diluido en medio de cultivo), concentraciones de IC₅₀ obtenidas para cada línea tumoral y un control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA).

Trascurridas las 24 horas se recuperó el medio de los cultivos y se despegaron las células con verseno o tripsina (según la línea celular), de las diferentes condiciones pasándolas a tubos para citometría, a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con 500µl metanol al 50% en PBS filtrado durante 60 minutos a 4°C, acontecido el tiempo las células fueron lavadas tres veces por centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos cada lavado, después se le agregó 50µL de anticuerpo primario, anticaspasa-3 activa (anticuerpo hecho en conejo, SIGMA) en una relación 1:1000 en PBS filtrado y se dejó con el anticuerpo durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Posterior a las 24 horas las muestras se lavaron tres veces con PBS filtrado, se adicionaron 50µL de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (anticuerpo hecho en ratón, anti-conejo, SIGMA) en una relación de 1:500 de PBS. Durante 2 horas las muestras se mantuvieron protegidas de la luz a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo las muestras se lavaron tres veces con PBS filtrado. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACAS Aria II, USA).

7.6 Evaluación de la capacidad proliferativa de linfocitos humanos por la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)

Los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, se realizaron a partir de 20 mL de sangre obtenidos de un donador aparentemente sano, en tubos Vacutainer con heparina (BD Franklin Lakes NJ. USA).

En un tubo de vidrio de fondo cónico se colocó 5 mL de Ficoll-Hystopaque (Sigma-Aldrich, USA) y en seguida se agregó lentamente por la pared del tubo 5 mL de sangre (obteniendo una concentración de Ficoll-Sangre 1:1). Se centrifugó la muestra a 300 rpm por 5 minutos, y después de ese tiempo se fue aumentando a 600 rpm por 5 minutos, esto se realizó sucesivamente hasta que la velocidad alcanzó las 1500 rpm, donde se dejó por 30 minutos más, permitiendo una

separación de las células mononucleares por un gradiente de densidad. Una vez separados los diferentes componentes celulares, se recolectó el anillo células mononucleares (extrayendo la menor cantidad de Ficoll y de otras células diferentes a estas). El anillo se colocó en un tubo cónico de vidrio limpio y se agregó 10 mL de medio RPMI-1640 sin suero, para lavar los linfocitos y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, retirando el sobrenadante. Este procedimiento se realizó nuevamente para lavar dos veces las células.

Posteriormente el anillo de células se marcó con 2 μ M de carboxifluoresceína (se agregó 50 μ L de 200 μ M carboxifluoresceína en 5mL de RPMI sin suero (Sigma-Aldrich, USA) durante 15 minutos protegidos de la luz. Se realizaron dos lavados agregando 5mL de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SFB, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB. Los linfocitos se activaron con fitohemaglutinina (20 μ L fitohemaglutinina/ 1mL RPMI- 1640). Se cultivaron en una placa de 96 pozos 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ L de RPMI con 20% de SFB con los siguientes controles: control -,- (sin CSFE y sin fitohemaglutinina PHA), +,- (con CSFE y sin PHA), control -,+ (sin CSFE y con 20 μ L/mL de PHA) y control +,+ (con CSFE y con 20 μ L/mL de PHA). Los pozos con linfocitos para determinar el efecto de las respectivas IC₅₀ se mantuvieron con CSFE y con 20 μ L/mL de PHA. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂, a una atmosfera punto de rocío.

El cultivo se estimuló considerando las siguientes condiciones: control sin activar, control activado, control sin marca y activado, control sin activar y sin marca, vehículo (DMSO) e IC₅₀ correspondientes a cada línea tumoral del compuesto MeDDTC-SO₂.

Transcurridas las 24 horas(72 horas en total) se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 500 μ L/tubo de verseno, se realizaron dos lavados, y el botón celular se resuspendió en 500 μ L de PBS filtrado. Finalmente, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1.

7.7 Determinación de la necrosis en linfocitos humanos por medio de la cuantificación de la actividad de LDH (lactato deshidrogenasa)

Se sembró 200,000 linfocitos por pozo en 200 μL de RPMI al 20% de SFB y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA, en una placa de 96 pozos. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas a 37°C, 5% CO_2 y una atmosfera a punto de rocío. Al cabo de este tiempo, se retiraron 100 μL de medio de cultivo en todos los pozos de la placa de 96 pozos, el cual fue substituido por 100 μL de medio (RPMI 20% al SFB y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de PHA) de cada una de las respectivas condiciones: blanco, control positivo, control sin tratamiento, vehiculo (DMSO) y los tratamientos de MeDDTC- SO_2 con las IC_{50} correspondiente a cada linea celular de CaCu. La placa se incubó en condiciones de cultivo por otras 24 horas. Una hora previa a la cosecha, al control positivo se le agregaron 18 μL de tritón X-100 al 9%, con el objetivo de lisar las células y así liberar la enzima LDH al medio. Al cabo de 72 horas totales de cultivo, se recolectaron 60 μL de los medios a una placa de fondo cónico en donde se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, se pasaron 40 μL a un placa de 96 pozos de fondo plano a los cuales se les agregaron 40 μL de la mezcla de reacción de LDH del Kit Cyto Tox 96® Non-Radiactive Cytotoxicity Assay. Se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz y se evaluó la absorbancia a 490nm en un lector de placas tipo ELISA. El porcentaje de muerte necrótica fue calculado en Microsoft Office Excel 2010, tomando como el 100% al control positivo tratado con tritón X-100.

8 RESULTADOS

8.1 Actividad antiproliferativa del MeDDTC-SO₂ en células tumorales

Con el fin de establecer el efecto antiproliferativo del MeDDTC-SO₂ en las células tumorales, cultivos de células HeLa, ViBo y CaSki fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto y la concentración requerida del MeDDTC-SO₂ que induce un decremento del 50% en la densidad celular (IC₅₀) fue determinada (Tabla 1). El número celular fue evaluado por medio de la técnica de incorporación con cristal violeta (figura 7,8 y 9).

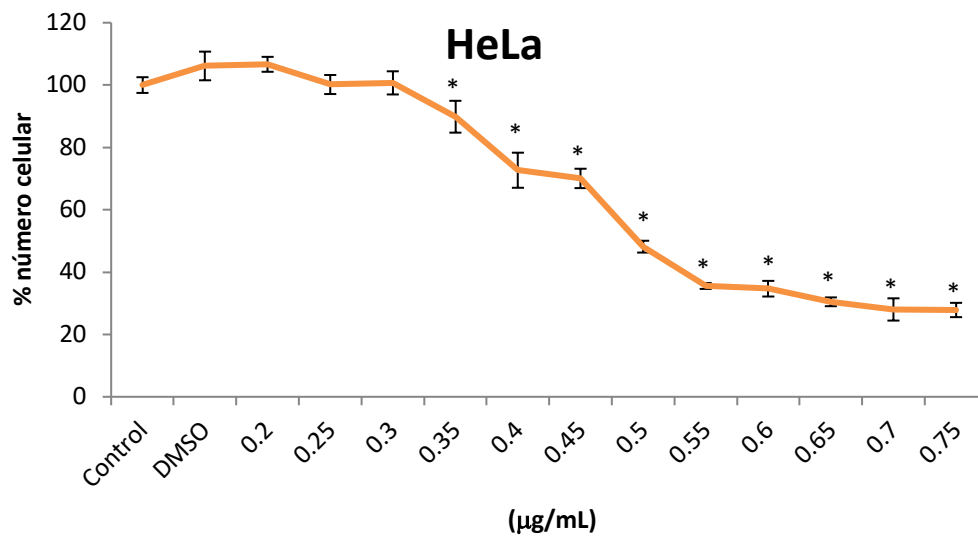


Figura 7. Efecto del MeDDTC-SO₂ en la proliferación de células HeLa. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA). Los asteriscos muestran las concentraciones que presentan diferencia significativa respecto al control.

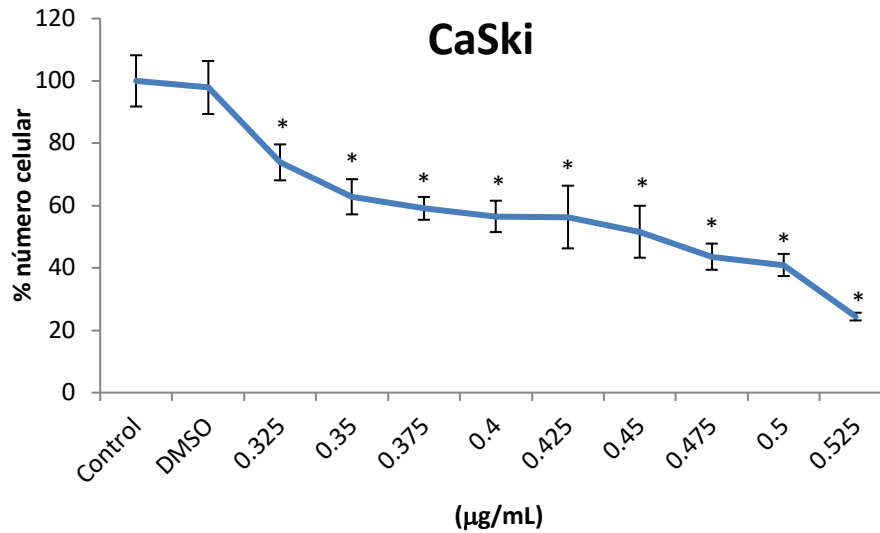


Figura 8. Efecto del MeDDTC-SO₂ en la proliferación de células CaSki. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA. Los asteriscos muestran las concentraciones que presentan diferencia significativa respecto al control.

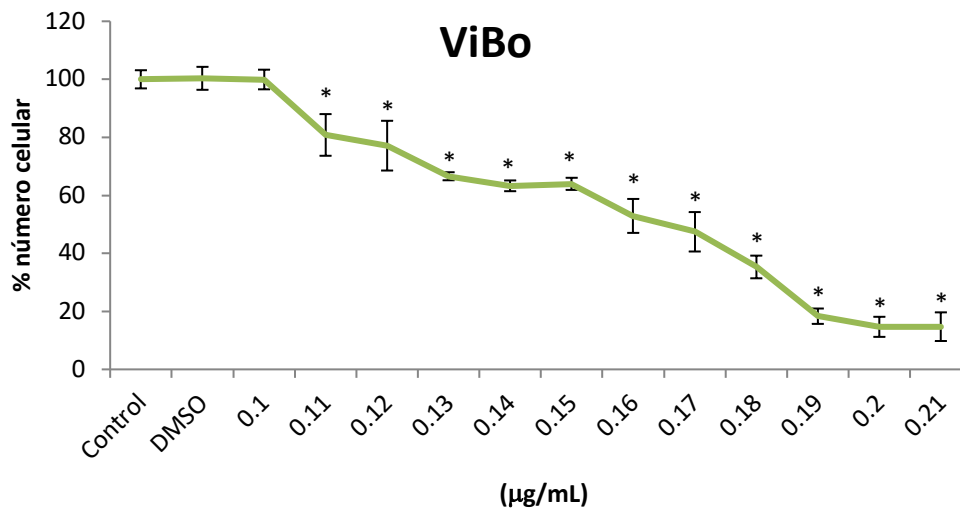


Figura 9. Efecto del MeDDTC-SO₂ en la proliferación de células ViBo. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA. Los asteriscos muestran las concentraciones que presentan diferencia significativa respecto al control.

LÍNEA CELULAR	IC ₅₀ µg/mL
HeLa	0.493
CaSki	0.452
ViBo	0.163

Tabla 1. Valores de la concentración del compuesto MeDDTC-SO₂ que inhiben en un 50% el número celular (IC₅₀), para las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo expresada en µg/mL.

Los resultados obtenidos en las figuras 7, 8 y 9 establecen que el MeDDTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo de una manera dependiente de la dosis con valores representados en la tabla 1 obtenidas mediante un análisis de regresión lineal.

8.2 Actividad necrótica del MeDDTC-SO₂ en células tumorales

Se conoce que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción necrótica, caracterizada principalmente por inducir la pérdida de la integridad de la membrana celular y con ello la salida del contenido citoplasmático. Con la intención de determinar si el MeDDTC-SO₂ presenta una actividad necrótica sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino; cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de IC₅₀ respectiva y la actividad de la enzima LDH fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Fig. 10) y tomada como un parámetro de la pérdida de la integridad de la membrana y como una característica primordial de la muerte necrótica.

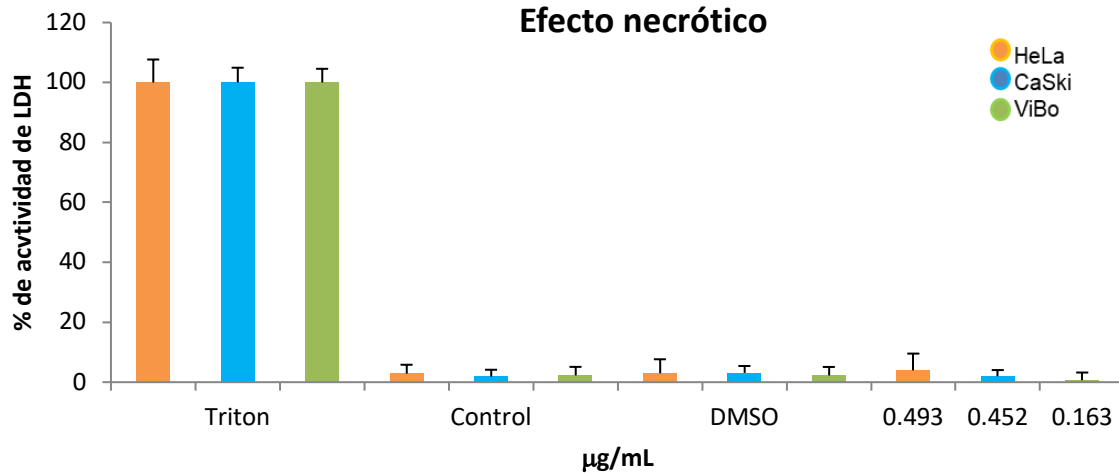


Figura 10. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el MeDDTC-SO₂. El control positivo consistió en células permeadas con Tritón X-100 y tomadas como el 100% de actividad necrótica; mientras que el DMSO, son células tratadas con la concentración requerida de DMSO utilizada para el tratamiento con MeDDTC-SO₂ correspondiente para cada línea celular. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. Se evaluó estadísticamente la diferencia significativa de los valores obtenidos (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los resultados mostrados en la figura 10, indican que el MeDDTC-SO₂, no induce a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a liberar LDH al exterior celular, indicando que este metabolito no induce a estas células a una muerte necrótica y que la actividad antiproliferativa observada es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

8.3 Actividad apoptótica del MeDDTC-SO₂ en células tumorales

Con la intención de establecer que el MeDDTC-SO₂ induce muerte celular apoptótica en células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las respectivas IC₅₀ del compuesto y características morfológicas propias de células apoptóticas fueron observadas por microscopia de contraste de fases y por microscopia de epifluorescencia con tinción con el fluorocromo DAPI, así como la determinación de células positivas a la caspasa 3 activa, determinada por inmunodetección y observada por microscopia de epifluorescencia (Fig. 11, 12 y 13).

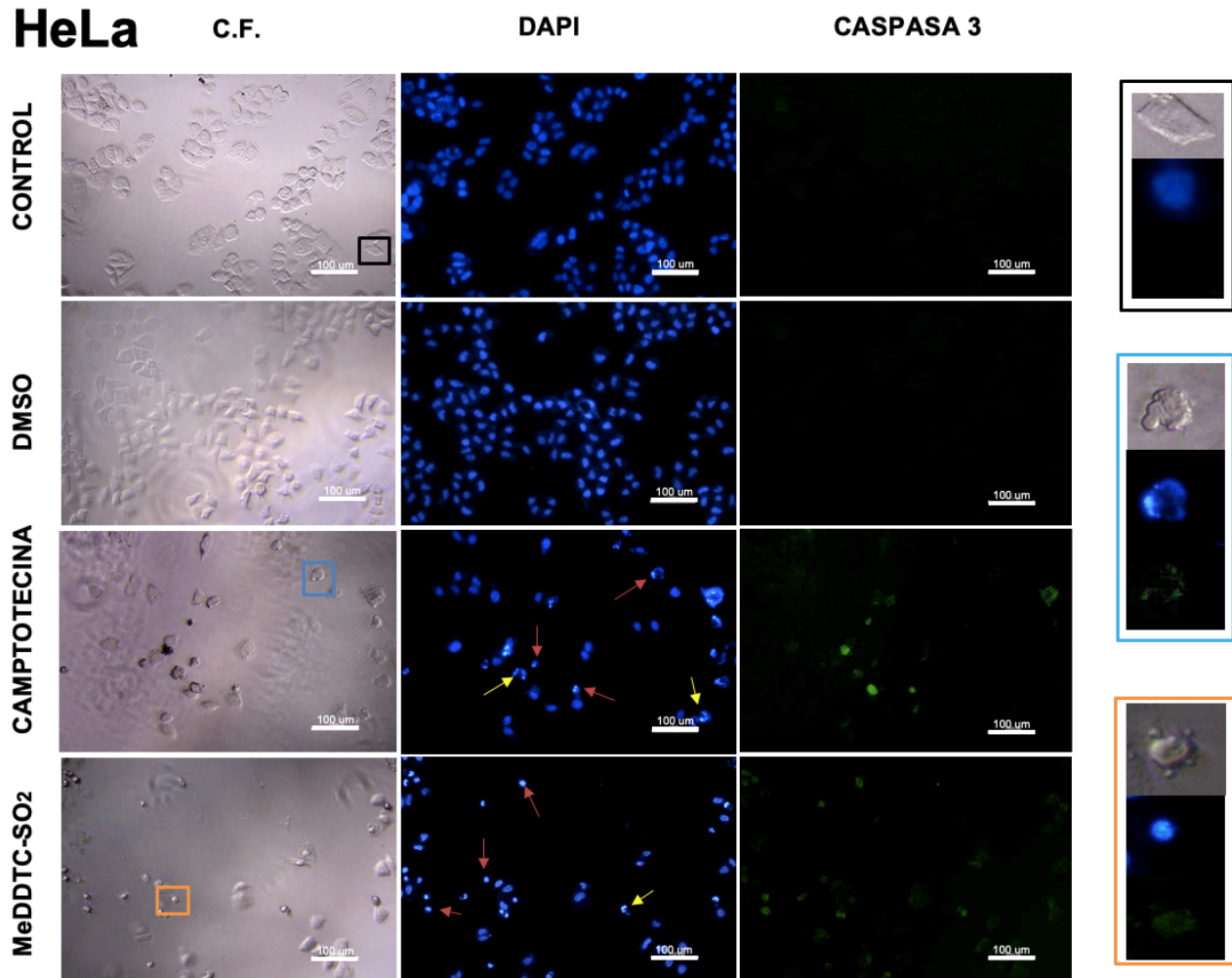


Figura 11. Efecto apoptótico del compuesto MeDDTC-SO₂ en células HeLa. La morfología se observó mediante microscopía de contraste de fases (C.F.). Efecto en la morfología nuclear del compuesto MeDDTC-SO₂ observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CAMPTOTECINA) y en el compuesto MeDDTC-SO₂. Ensayo representativo de tres repeticiones. Flechas rojas indican compactación nuclear; flechas amarillas indican fragmentación del ADN; Recuadros en azul y anaranjado representan la ampliación a la derecha de una célula con morfología apoptótica. Recuadro negro representa la ampliación a la derecha de una célula con morfología típica de la línea tumoral.

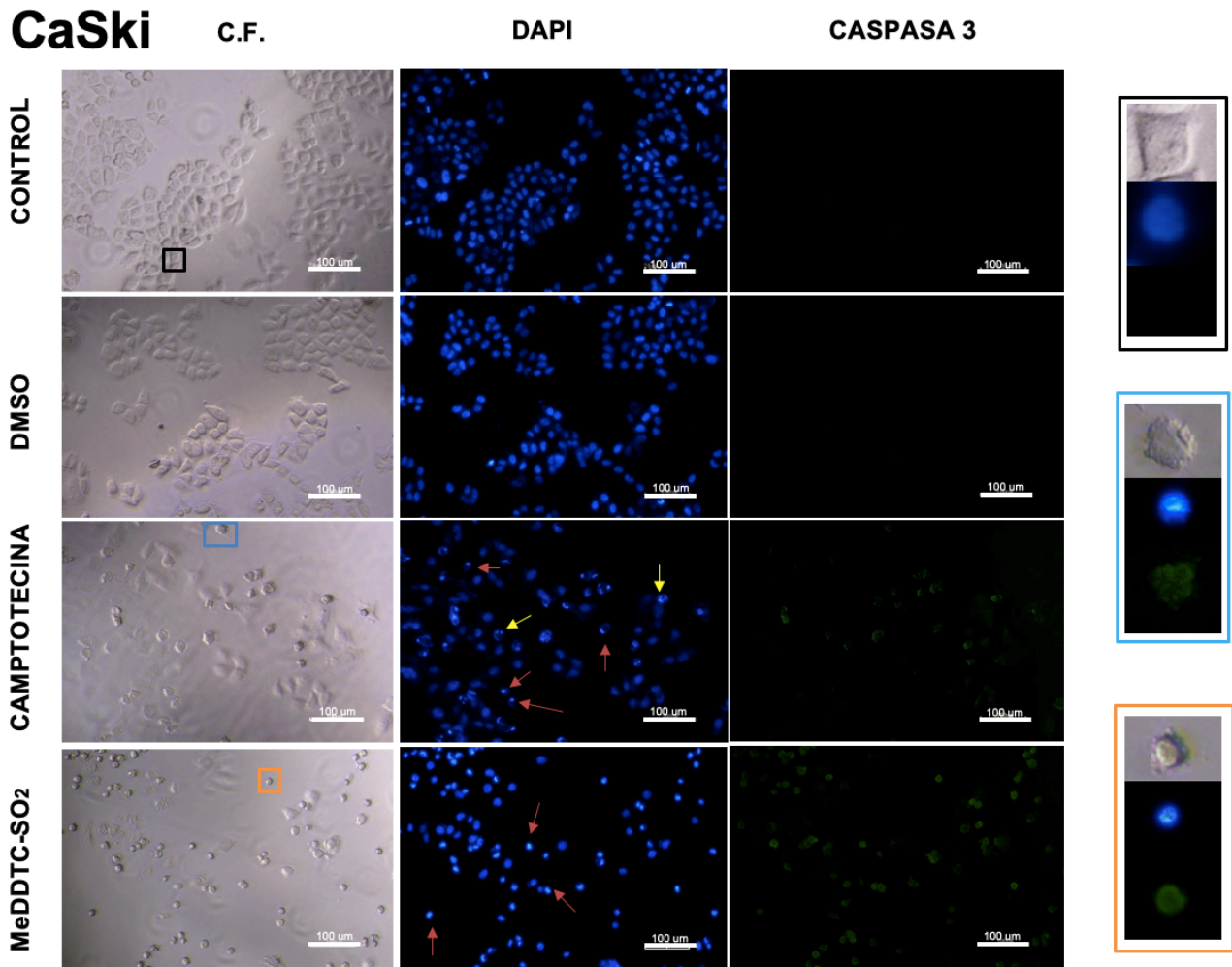


Figura 12. Efecto apoptótico del compuesto MeDDTC-SO₂ en células CaSki. La morfología se observa en contraste de fases (C.F.). Efecto en la morfología nuclear del compuesto MeDDTC-SO₂ observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CAMPTOTECINA) y en el compuesto MeDDTC-SO₂. Ensayo representativo de tres repeticiones. Flechas rojas indican compactación nuclear; flechas amarillas indican fragmentación del ADN; Recuadros en azul y anaranjado representan la ampliación a la derecha de una célula con morfología apoptótica. Recuadro negro representa la ampliación a la derecha de una célula con morfología típica de la línea tumoral.

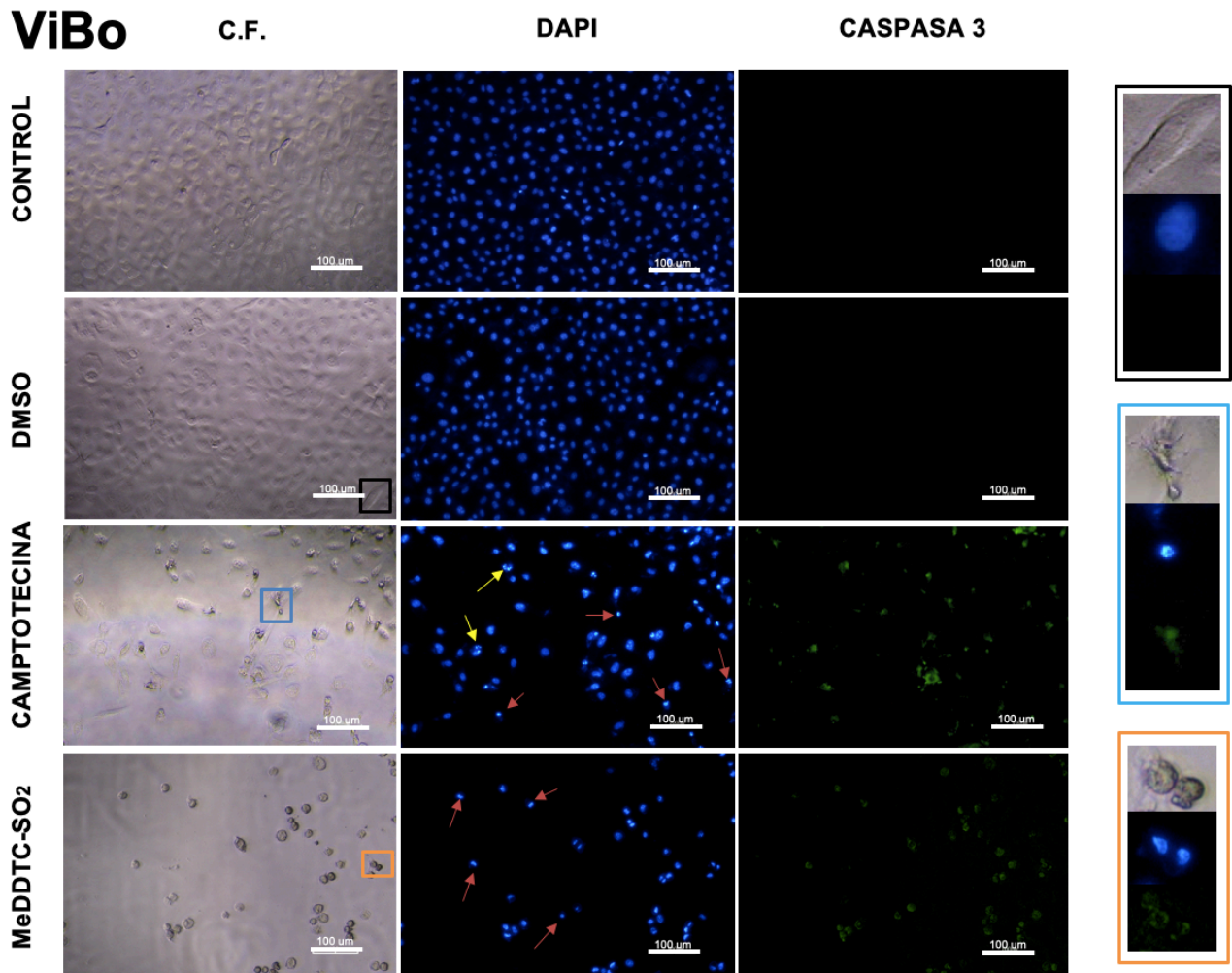


Figura 13. Efecto apoptótico del compuesto MeDDTC-SO₂ en células ViBo. La morfología de se observa en contraste de fases (C.F.). Efecto en la morfología nuclear del compuesto MeDDTC-SO₂ observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CAMPTOTECINA) y en el compuesto MeDDTC-SO₂. Ensayo representativo de tres repeticiones. Flechas rojas indican compactación nuclear; flechas amarillas indican fragmentación del ADN; Recuadros en azul y anaranjado representan la ampliación a la derecha de una célula con morfología apoptótica. Recuadro negro representa la ampliación a la derecha de una célula con morfología típica de la línea tumoral.

Las imágenes mostradas en las **Figuras 11, 12 y 13** indican que las células del control y DMSO (contraste de fases), se encuentran adheridas a la placa, con morfología poliédrica, citoplasma extendido conservando sus proyecciones citoplasmáticas y de tamaño homogéneo, los núcleos se conservan de tamaño normal con la cromatina dispersa en el nucleoplasma sin presentar fragmentación del DNA, por otro lado, en las células tratadas con camptotecina, así como con el compuesto MeDDTC-SO₂, se observa que las células presentan una forma esférica que indica una contracción celular, han perdido las proyecciones citoplasmáticas indicando una disminución de la adherencia, y en algunas se observan cuerpos

apoptóticos. En el marcaje con DAPI, la Camptotecina y el compuesto MeDDTC-SO₂ se observa reducción del tamaño del núcleo, condensación de la cromatina y fragmentación de ADN. El uso de anticuerpos permitió la detección de caspasa-3 activa en los cultivos celulares de las tres líneas tratadas con el compuesto MeDDTC-SO₂ y el control positivo sugiriendo que este metabolito induce muerte apoptótica.

Con el propósito de corroborar si el MeDDTC-SO₂ induce muerte apoptótica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo, fueron tratadas con MeDDTC-SO₂ durante 24 horas con la concentración de IC₅₀ respectiva para cada línea celular y las células positivas a la caspasa-3 activa fue determinada por citometría de flujo (Fig. 14).

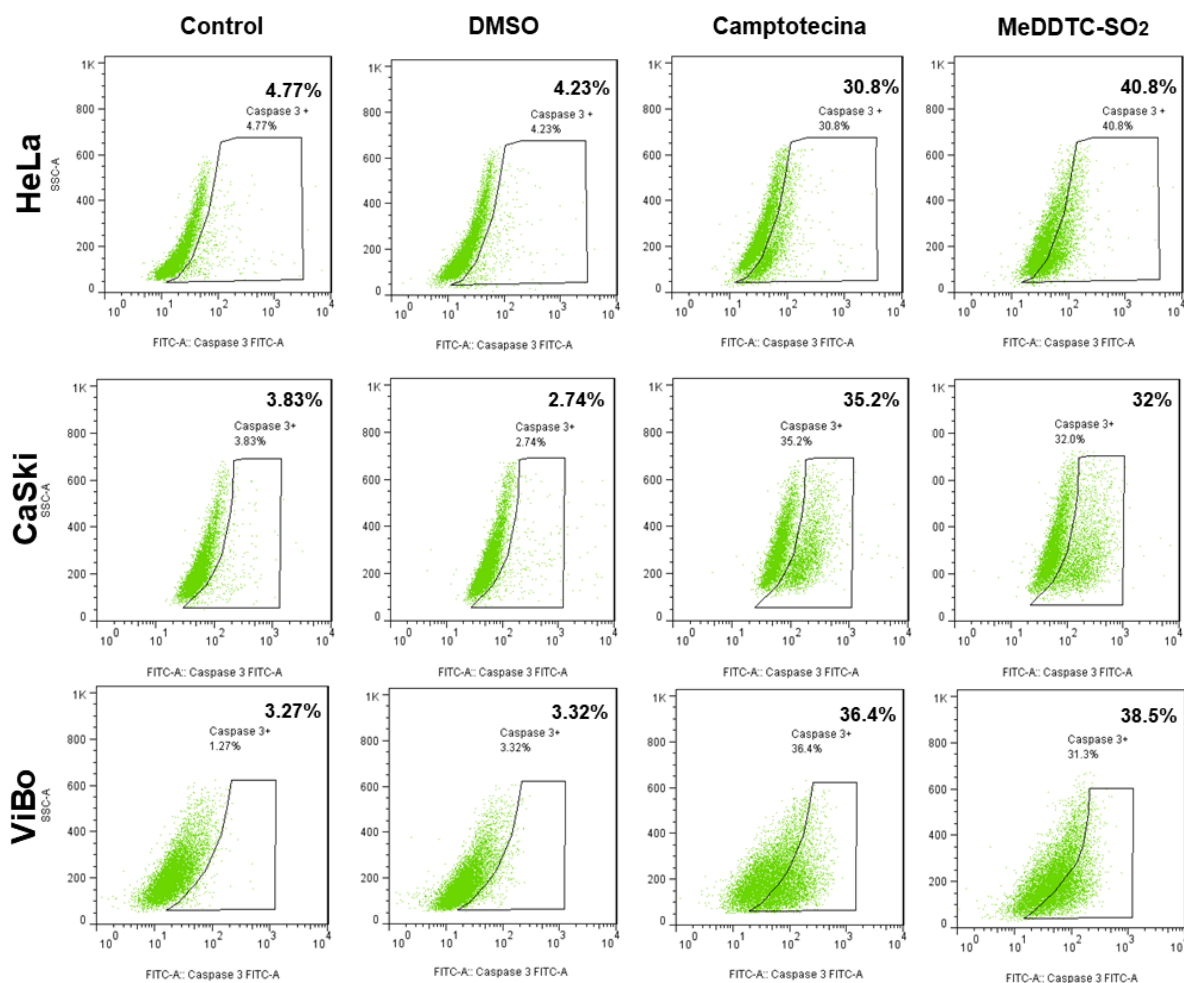


Figura 14. Cuantificación de células positivas a la caspasa-3 activa en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki tratadas con el compuesto MeDDTC-SO₂. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que el MeDDTC-SO₂ induce a las células tumorales de CaCu a presentar la caspasa 3 activa en porcentajes que van desde 32 a 40.8%, lo cual concuerda con la evaluación de inmunodetección de la caspasa 3 activa mediante microscopía de epifluorescencia, indicando que el proceso apoptótico se lleva a cabo con la participación de esta caspasa.

8.4 Actividad antiproliferativa de MeDDTC-SO₂ en células no tumorales

Con la intención de establecer si el compuesto MeDDTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana fueron tratadas con las concentraciones de IC₅₀ correspondientes a cada línea celular y el efecto antiproliferativo fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (Fig. 15).

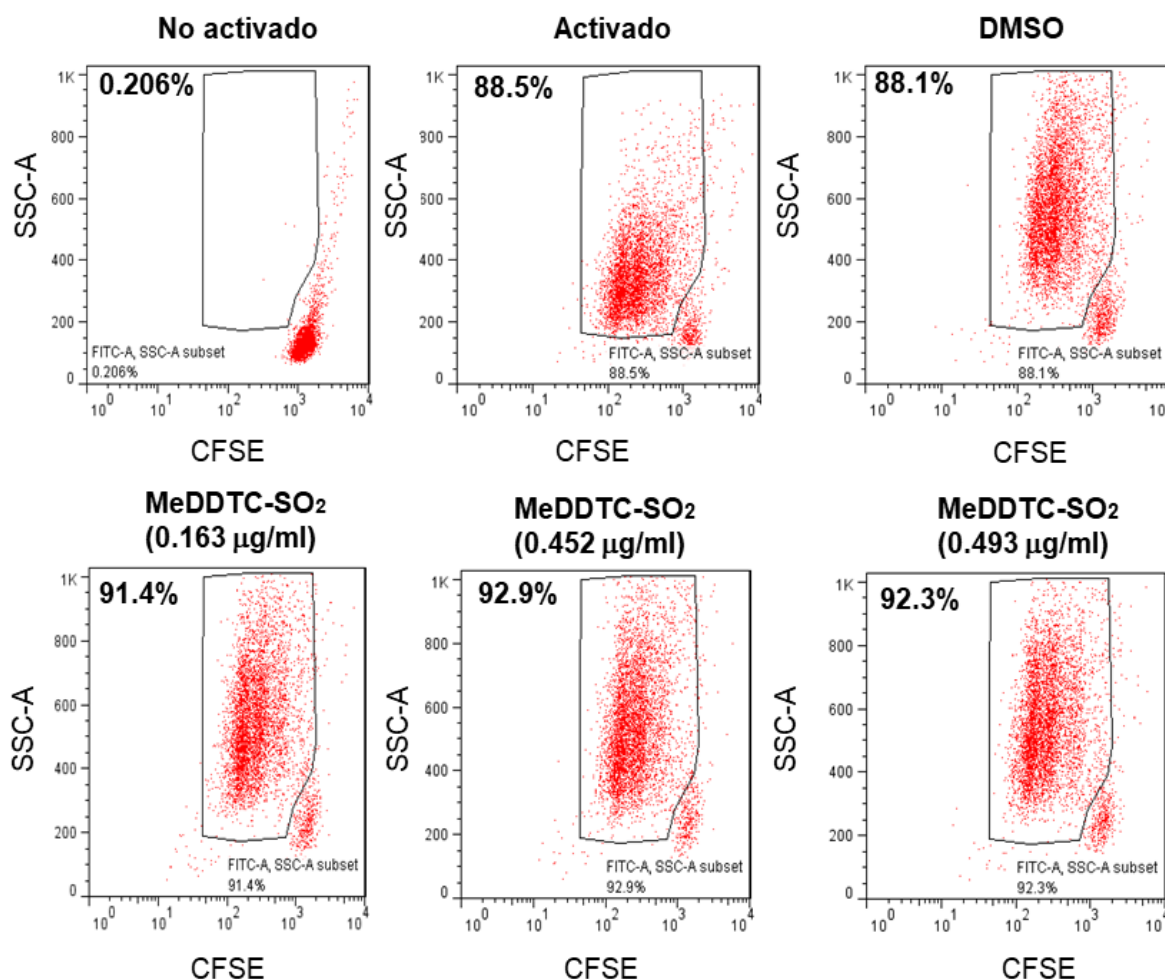


Figura 15. Efecto antiproliferativo del compuesto MeDDTC-SO₂ en cultivos de linfocitos humanos mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, evaluada por citometría de flujo. Los linfocitos fueron tratados con el compuesto MeDDTC-SO₂ en las concentraciones de IC₅₀ correspondientes a cada línea celular. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 15 establecen que el MeDDTC-SO₂ a las concentraciones de 0.163, 0.452 y 0.493 µg/mL no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas, sugiriendo que este compuesto podría ser de acción selectiva.

8.5 Actividad necrótica del MeDDTC-SO₂ en linfocitos humanos

Para determinar si el compuesto MeDDTC-SO₂ tiene un efecto necrótico en las células linfocíticas, se evaluó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de células linfocíticas.

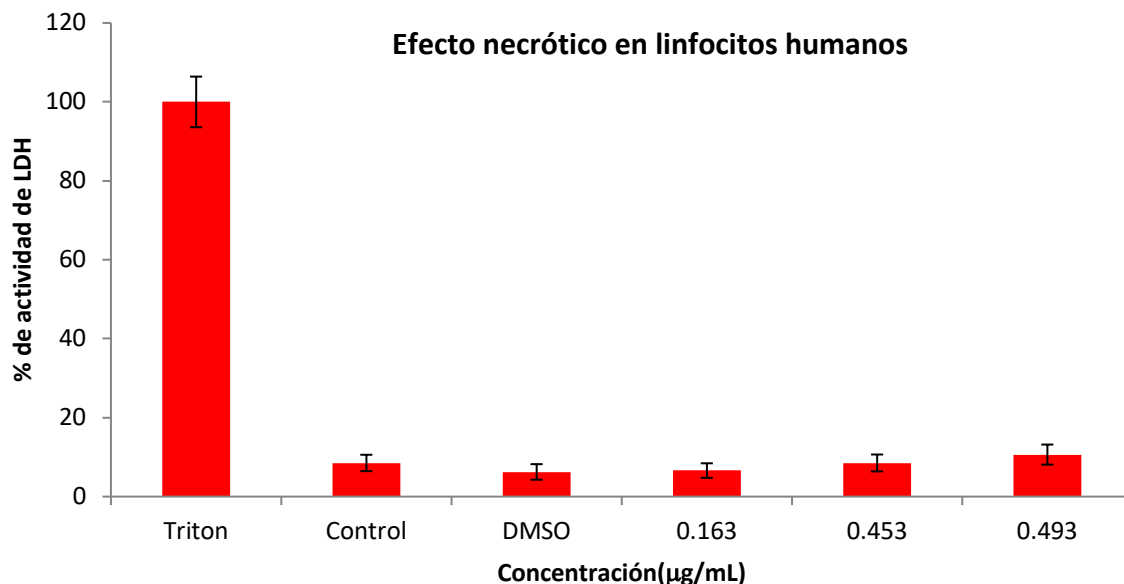


Figura 15. Determinación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos tratados con las tres concentraciones del compuesto MeDDTC-SO₂. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. Se evaluó estadísticamente la diferencia significativa de los valores obtenidos (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos muestran que el MeDDTC-SO₂ no induce a las células linfocíticas a liberar la enzima LDH de manera significativa respecto al control, sugiriendo que el compuesto MeDDTC-SO₂ no presenta efecto necrótico en los cultivos de linfocitos.

9 DISCUSIÓN

La búsqueda de compuestos de origen vegetal, animal o sintético con propiedades antitumorales ha generado un fuerte interés en los últimos años, sobre todo, en aquellos que son derivados de fármacos conocidos y usados clínicamente con otros fines, dando origen a derivados o análogos de éstos (Arvelo *et al.*, 2008). Esto, debido a que los quimioterapéuticos utilizados sobre las células cancerosas, tienen una efectividad limitada por su actividad citotóxica, siendo poco tolerados por los pacientes en fase terminal, debido a las dosis altas que se requieren para el tratamiento. Por tal razón se han investigado nuevos compuestos con actividad antitumoral y con baja actividad citotóxica además de presentar una acción selectiva que dañe en menor grado a las células sanas del cuerpo humano.

Estudios recientes acerca de los Ditiocarbamatos (el DSF y sus metabolitos), indican que poseen diversas actividades biológicas, entre las que destaca la inhibición del crecimiento tumoral (Chen *et al.*, 2006; Lin, *et al.*, 2011), de factores de transcripción como NFκB (Guo *et al.*, 2010), y la inducción de apoptosis en varias líneas tumorales (Wickström *et al.*, 2007). No obstante, desde el punto de vista metabólico y apoyándonos en la ruta metabólica del DSF propuesta por Zaldívar-Machorro y colaboradores (2011), es importante notar que el Disulfiram se va descomponiendo a causa de enzimas en varios metabolitos (Faiman *et al.*, 1984), esto alude pensar que sus metabolitos son posiblemente los responsables del efecto antitumoral. Es por ello la necesidad de evaluar cada uno de ellos, y de los cuales ya se ha visto que tienen potencial antiproliferativo y apoptótico de manera *in vitro* (DDTC, MeDDTC y MeDDTC-SO) (Hernández-Cruz, 2013; Mejía-Montoya, 2019). Y para continuar con el estudio en este trabajo se evaluó el metabolito MeDDTC-SO₂, para poder dilucidar cuál de estos metabolitos presenta mejores características antitumorales.

Con base a los resultados obtenidos experimentalmente del compuesto MeDDTC-SO₂, revelan que este compuesto presenta un efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 0.493, 0.452 y 0.163 µg/mL respectivamente. En las tres líneas se observa que con un aumento de concentración, presentan un comportamiento dosis-dependiente, a mayor concentración menor número celular. Las concentraciones utilizadas de MeDDTC-SO₂ para las células tumorales, se ha observado que son similares e inclusive más bajas, comparadas con el Disulfiram (DSF) el cual tiene valores de IC₅₀ de 0.5, 0.7 y 0.6 µg/mL para las líneas de CaCu HeLa CaSki y ViBo respectivamente (Mejía-Montoya, 2019). Y frente a los otros metabolitos la diferencia de concentraciones de IC₅₀ es muy marcada: el DDTC tiene valores de 95 µg/mL para HeLa, 35 µg/mL para CaSki, 200 µg/mL para ViBo; el MeDDTC tiene valores de 42 µg/mL para HeLa, 43 µg/mL para CaSki, 50 µg/mL para ViBo; y MeDDTC-SO tiene valores de 4.5 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL para las mismas líneas celulares respectivamente) (Hernández-Cruz, 2013; Mejía-Montoya, 2019), siendo estas concentraciones de IC₅₀ muy altas en comparación con las del MeDDTC-SO₂, por lo anterior llama la atención la utilización de concentraciones mínimas de

este compuesto para tener la misma actividad antiproliferativa que sus similares. El hecho de que el MeDDTC-SO₂ afectó las tres líneas celulares de CaCu, donde HeLa y CaSki están infectadas con el HPV, mientras que ViBo no presenta este virus, sugiere que el efecto antiproliferativo del compuesto es independiente del virus.

A diferencia del DSF que provoca necrosis en células de melanoma c83-2c, observando una incorporación de IP (ioduro de propidio) a un 48 % (Cen *et al.*, 2002); el MeDDTC-SO₂ no presentó actividad necrótica en las líneas de cáncer cervicouterino. En este sentido estudios han demostrado que el contenido de células necróticas mejora la angiogénesis, la proliferación de células cancerosas y un estado inflamatorio (Karsch-Bluman *et al.*, 2019), mismos que hacen que este tipo de muerte no sea viable, determinando que el compuesto MeDDTC-SO₂ podría presentar una mejor tolerancia para el paciente, minimizando los efectos colaterales.

En la actualidad, el enfoque en la búsqueda de nuevos compuestos dirigidos contra el cáncer se centra en identificar de manera específica la inducción de apoptosis contra células tumorales (Pardo *et al.*, 2005). El MeDDTC-SO₂ induce a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a presentar una morfología celular apoptótica y la participación de la caspasa 3 activa, confirmando que este metabolito induce a las células de CaCu a ser eliminadas por este proceso de muerte celular programada y sugiere que este compuesto presenta el mismo potencial inductor de apoptosis que el Disulfiram (Cen *et al.*, 2002; Dazhi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Navrátilová *et al.*, 2009; Hoda *et al.*, 2016). Es importante resaltar que el efecto inductor de apoptosis presente en este ditiocarbamato, genera la ventaja de no inducir un estado inflamatorio, ya que no se activa la respuesta inmunológica (Torrella y García, 2004). Tal efecto inductor de apoptosis permite una acción antitumoral silenciosa, además de que es un evento crítico para mantener la homeostasis tisular que asegura el estado de salud de los organismos (Ortega *et al.*, 2001), lo cual hace aún más atractivo el estudio del MeDDTC-SO₂ como agente quimioterapéutico.

Debido a que varios agentes terapéuticos usados contra el cáncer afectan tanto a células normales como a células tumorales, es importante evaluar diferentes aspectos para poder catalogar si el compuesto es eficiente. El MeDDTC-SO₂, sorprendentemente no presentó un efecto necrótico en células tumorales y tampoco generó este efecto en células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana), indicando que este compuesto induce a las células tumorales a ser eliminadas por una muerte apoptótica, mientras que a las células no tumorales no les causó efecto alguno, muestra de esto, es que el compuesto MeDDTC-SO₂ permitió la capacidad proliferativa de los linfocitos, en comparación con DSF, DDTC y el metabolito

MeDDTC-SO que afectan fuertemente la proliferación de linfocitos humanos (Hernández-Cruz, 2013; Mejía-Montoya, 2019). Cabe resaltar que el compuesto también genera la ventaja ante varios quimioterapéuticos al no producir una inmunosupresión como muchos de estos lo hacen (Torrella y García, 2004), sugiriendo una acción selectiva contra las células tumorales de cáncer cervicouterino.

Se ha visto que DSF al ser inicialmente metabolizado a DDTC disminuye su actividad antiproliferativa y apoptótica, las cuales se van recuperando cuando es metilado a MeDDTC, así mismo cuando se oxida a MeDDTC-SO (Hernández-Cruz, 2013; Mejía-Montoya, 2019), y su actividad antiproliferativa y apoptótica son recuperadas por completo cuando llega a ser metilado al MeDDTC-SO₂, lo que lleva a proponer al MeDDTC-SO₂ como el principal responsable de la actividad antitumoral que distingue a estos ditiocarbamatos, además este potencial llama la atención, ya que coincide con su actividad biológica inhibitoria *in vitro* de la enzima Betaína aldehído deshidrogenasa del patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, siguiendo un orden de potencia: MeDDTC-SO₂ > DSF > MeDTC-SO₂ > MeDDTC-SO > MeDTC-SO (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011).

En conjunto, los resultados indican que el MeDDTC-SO₂ es un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* como agente anticancerígeno con posible potencial terapéutico.

10 CONCLUSIONES

- El compuesto MeDDTC-SO₂ afecta el potencial proliferativo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo con valores de IC₅₀ de 0.493, 0.452 y 0.163 µg/mL respectivamente
- El MeDDTC-SO₂ no induce muerte por necrosis en los cultivos de células de cáncer cervicouterino a las concentraciones de 0.493, 0.452 y 0.163 µg/mL .
- El MeDDTC-SO₂ induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis.
- El MeDDTC-SO₂ no afecta la proliferación de linfocitos humanos, ni induce en ellos muerte por necrosis a concentraciones de 0.493, 0.452 y 0.163 µg/mL.

11 PERSPECTIVAS

Respecto a los siguientes avances en el estudio del metabolito MeDDTC-SO₂, sería relevante determinar la ruta de señalización por la que este compuesto induce la apoptosis, así como la evaluación en más líneas tumorales con la finalidad de que el compuesto pueda ser usado contra diferentes tipos de cáncer, de igual forma sería interesante realizar ensayos para evaluar su efecto antimigratorio debido al proceso metastásico que desencadena el cáncer y probar este compuesto en modelos *in vivo* para ser evaluado como agente terapéutico contra esta enfermedad.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACR (2019) Radioterapia para el cáncer cervical. American College of Radiology. Obtenido de: <https://www.radiologyinfo.org/sp/info.cfm?pg=cervical-cancer-therapy>
2. Alberts, B., y Bray, D. (2006). Introducción a la biología celular. Médica Panamericana. Argentina. Pp.1.
3. Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G. I., Jerónimo, J., Salmerón, J., Ferreccio, C., y Herrero, R. (2010). Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud Pública de México*, 52, 544-559.
4. Arzuaga-Salazar, M. A., de Souza, M. D. L., y de Azevedo Lima, V. L. (2012). El cáncer de cuello de útero: un problema social mundial. *Revista Cubana de Enfermería*, 28(1), 63-73.
5. Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177.
6. Arvelo, F., Suárez, A., Galindo, I., Compagnone, R., Usubilaga, A. (2008) Productos naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 5:69-72
7. Baynes, J. W., y Dominiczak, M. H. (Eds.). (2019). *Bioquímica médica*. Elsevier. Pp. 417.
8. Brar S., Grigg C., Wilson S., Holder D., Drau D., Austin C., Foster M., Ohio J., Wharton R., Stowell W., Whit tall B., Whittle R., White P. y Kennedy.(2004). Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Molecular Cancer*. 3: 1049-1060
9. Burgués, J. P., Moreno, J. L., Vera, C. D., Jiménez, J. F., & Ozonas, M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*, 29(9), 846-859.
10. Cen, D., Gonzalez, R. I., Buckmeier, J. A., Kahlon, R. S., Tohidian, N. B., y Meyskens, F. L. (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Molecular cancer therapeutics*, 1(3), 197-204.
11. Cen, D., Brayton, D., Shahadah, B., Mickens, F. y Farmer, P. (2004). Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J. Med. Chem.*, (47): 6914-6920.
12. Chan, F. K. M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In *Immune Homeostasis* (pp. 65-70). Humana Press, Totowa, NJ.
13. Chen, D., Cui, Q., Yang, H. y Dou, P. (2006). Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and 61 Xenografts via inhibition of the Proteasome Activity. *Cancer Research*, (66): 10425- 10433.

14. Cobby, J., Mayersohn, M. y Selliah, S. (1977). The rapid reduction of Disulfiram in blood and plasma. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 202 (3): 724-731.
15. Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326(1)–16.
16. Cruz, M. D. C. L., Mendiola, A. V., y Soto-Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107.
17. Cuello, F., Kato, C., Sadarangani, K., Saez, S., Gejman, E., Owen, G. y Lipkowitz, S. (2006). Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando “TRAIL” en cánceres ginecológicos (*Boletín escuela de medicina Universidad de Chile*, 31(1): 5-15.
18. Dazhi, C., González, R., Buckmeier, J., Kahlon, R., Tohidian, N. y Meyskens, F. (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 1 (3): 197-204.
19. De la Garza, J. G., y Juárez, P. (2013). El cáncer. México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pp.50-56.
20. Degterev A. y Yuan J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (9): 378-390.
21. Faiman, M. D., Jensen, J. C., y Lacoursiere, R. B. (1984). Elimination kinetics of disulfiram in alcoholics after single and repeated doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 36(4), 520-526.
22. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I. y Bray, F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
23. Goldman, A. (2009). *Manual de Enfermería Oncológica*. Argentina: Instituto Nacional del Cáncer. Pp. 12-13.
24. Gourley, M. y Williamson, J. (2006). Angiogenesis inhibitors: New agents in cancer therapy. *Drugs Aging*, (17): 249-255.
25. Guo, X., Xu, B., Pandey, S., Goessl, E., Brown, J., Armesilla, A., Darling, J. y Wang, W. (2010). Disulfiram/copper complex inhibiting NFκB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Letters*, 290 (1): 104-113.
26. Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
27. Hernández-Cruz, V.C. (2013) Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
28. Hoda, M., Pajaniradje, S., Shakya, G., Mohankumar, K., y Rajagopalan, R. (2016). Anti-proliferative and apoptosis-triggering potential of disulfiram and disulfiram-loaded polysorbate

80-stabilized PLGA nanoparticles on hepatocellular carcinoma Hep3B cell line. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), 1641-1650.

29. Hyun-Ji, C., Tae-Sung, L., Jae-Bok, P., Kwan-Kyu, P., Jung-Yoon, C., Doo-II, S., Yoon-Yub, P., Yong-Suk, M., Kwang-Gill, L., Joo-Hong, Y., Sang-Mi, H., Young-Su, C., Myeong-Rak, C., Nam-Gyu, P., Yun-Sik, L. y Young-Chae, C. (2007). Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (6): 1069-1076.

30. Lizarbe, M. I. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 101, 2-33.

31. Lin, J., Haffner, M. C., Zhang, Y., Lee, B. H., Brennen, W. N., Britton, J., & Yegnasubramanian, S. (2011). Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *The Prostate*, 71(4), 333-343.

32. Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., y Periwai, V. (2009). Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLoS computational biology*, 5(3), 1000324.

33. Junta de Andalucía (2006). Protocolo Cáncer de cérvix: Cribado, diagnóstico y tratamiento. Córdoba: *Hospital Universitario Reina Sofía*. Servicio Andaluz de Salud.

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

35. Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular* (7ª ed). México. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 561.o

36. Karsch-Bluman, A., Feiglin, A., Arbib, E., Stern, T., Shoval, H., Schwob, O., & Benny, O. (2019). Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene*, 38(11), 1920.

37. Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., ... & Pani, P. (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis. *International journal of oncology*, 21(1), 165-170.

38. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.

39. Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Vasiliou, V. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520–539.

40. Kunapuli, S., Rosanio, S., & Schwarz, E. R. (2006). "How do cardiomyocytes die?" Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *Journal of cardiac failure*, 12(5), 381-391.

41. Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
42. López, A. y Lizano, M. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del Papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología* (1ª ed.) México: *Instituto Nacional de Cancerología*. Pp. 31- 55.
43. López-Marure, R. (2003) La Regulación del Ciclo Celular y el Cáncer. Vertientes. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1).
44. Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z. Q. y Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Molecular biology of the cell*, 13(3), 978-988.
45. Malaguarnera, L., Pilastro, M., DiMarco, R., Scifo, C., Renis, M., Mazzarino, M. y A. Messina. (2003). Cell death in human acute myelogenous leukemic cells induced by pyrrolidine dithiocarbamate. *Apoptosis* 8: 539-545.
46. Mandal, A. (2014). News medical. Cancer Classification. *Disponible en: www.news-medical.net/health/causes-of-eye-cancer.aspx* . Recuperado el 2 Agosto del 2019.
47. Markman M; (2010). Quimioterapia (Capítulo 3). En: *Oncología ginecológica de Berek J. y Hacker N.*, (5ª ed.) España: Wolters Kluwer, Lippincott Williams y Wilkins. Pp. 57-82.
48. Markowitz SD. (2007). Aspirin and colon cancer--targeting prevention? *N Engl J Med*. 356(21): 2195-8
49. Medina-Villaseñor, E.A., Martínez-Macías, R. 2009. *Fundamentos de oncología*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F., México. Pp. 355-356.
50. Mejía-Montoya, M. E. (2019). Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO del disulfiram en células de cáncer cervicouterino. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
51. Montero, F. (2017) Curso de oncología. Obtenido de <https://docplayer.es/45249165-Tema-5-muerte-celular-programada-tipos-de-muerte-celular-apoptosis-necrosis-y-autofagia.html>
52. Monroy, A, Rangel. R., Rocha, Z., Trejo, B., Ramírez, G., Martínez, R. y Weiss-Steider, B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, Vol. 7, pp.69.
53. Morrison, B. W., Doudican, N. A., Patel, K. R., & Orlow, S. J. (2010). Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma research*, 20(1), 11-20.
54. Müller, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Reverte. España. Pp. 453-456.

55. Nanji, A. A., & Hiller-Sturmhöfel, S. (1997). Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health & Research World*, 21(4), 325-30.
56. Navrátilová, S., Jungová, P., Vanhara, J., Knichy, V. y Smarda, J. (2009). Copper ions regulate cytotoxicity of disulfiram to myeloid leukemia cells. *International journal of molecular medicine*, 24: 661-670.
57. Okamoto S., Jiang Y., Kawamura K., Shingyoji M., Fukamachi T., Tada Y., Takiguchi Y., Tatsumi K., Shimada H., Hiroshima K., Kobayashi H. y Tagawa M. (2013). Zoledronic Acid Produces Combinatory Anti-Tumor Effects with Cisplatin on Mesothelioma by Increasing p53 Expression Levels. *Plos One*. 8(3): 1-9.
58. Pardo, G., Hernández, P., y Delgado, R. (2005). La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Revista Cubana de Medicina*, 44(1-2), 0-0.
59. Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics* (2a ed) Universidad de Oxford. Reino Unido.
60. Porter, A., y Urbano, A. (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death?. *Bioessays*, 28 (8): 834-843.
61. Ryan, C. y Wilding, G. (2000). Angiogenesis inhibitors: New agents in cancer therapy. *Cancer*, 17 (4): 249-255.
62. Salazar, M. (2010). *Tratado de Psicofarmacología: Bases y Aplicación clínica*, Médica Panamericana. España. Pp. 315.
63. Salazar, A. M., Sandoval, A. S., & Armendáriz, J. S. (2013). *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (1a. ed.). México. McGraw Hill. Pp.197.
64. Sanabria, J. G. (2009). Virus del Papiloma humano. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 13(4), 168-187.
65. Secretaría de Salud. (2015). Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 - 2018. Encuesta Intercensal. Microdatos. Consultado el 9 de agosto de 2019: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino>
66. Shen J., Lipsky J. y S. Naylor. (2000). Role of Disulfiram in the In Vitro Inhibition of Rat Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Biochemistry and Pharmacology*. 60: 947-953
67. Shen, H. y Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution. *Faseb J.*, 20 (10): 1589-1598.
68. Shine-Gwo, S., Yu-Rung Kao, Felicia Ying-Hsiueh Wu, y Cheng-Wen Wu (2003). Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol* 64: pp. 1076–1084.
69. Smirnova A., Lazebnik L., Trubitsina I., Tkachenko E., Varvarina G., Drozdov V., Kim V., Baryshnikova A. y Sokolova Z. (2012). Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksp Klin Gastroenterol*. 5: 66-69.

70. Son, H., Kositwattanarek, A., Hayes, M. P., Chuang, L., Rahaman, J., Heiba, S., y Kostakoglu, L. (2010). PET/CT evaluation of cervical cancer: spectrum of disease. *Radiographics*, 30(5), 1251-1268.
71. Suh, J. J., Pettinati, H. M., Kampman, K. M., y O'brien, C. P. (2006). The status of disulfiram: a half of a century later. *Journal of clinical psychopharmacology*, 26(3), 290-302.
72. The Open University (2019). Apoptosis and necrosis. Obtenido de : <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology>
73. Velázquez M., Andrade M., Lagunas M. y Zajgla M., (2004). SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis. *Revista de Educación Bioquímica*, 23 (2): 64-70
74. Vicuña, N. C., Hernández, G. A., Alcázar, L. F., Garrón, G. W. M., & Zúñiga, I. P. (2009). Cáncer cervicouterino. In *Anales de Radiología, México* (Vol. 8, No. 1, pp. 61-79).
75. Wang, W., McLeod, H. L., y Cassidy, J. (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *International journal of cancer*, 104(4), 504-511.
76. Wickström, M., Danielsson, K., Rickardson, L., Gullbo, J., Nygren, P., Isaksson, A., Larsson, R. y Löuborg, H. (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*, 71: 25-33
77. Zaldívar-Machorro, V. J., López-Ortiz, M., Demare, P., Regla, I. y Muñoz-Clares, R. A. (2011). The disulfiram metabolites S-methyl-N, N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N, N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie*, 93(2), 286-295.
78. Zuben, E., Suneet, S. y Suresh, V. (2005). Disulfiram and old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Molecular Biosystems*, 2 (1): 127-134.

13 APENDICE

Preparación de reactivos

- **Medio de cultivo RPMI-1640**

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.00 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 μm . El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de neonato. Se almacena a 4°C.

- **Desactivación del suero**

El suero de ternera neonatada se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca en baño maría a 56°C durante 30 minutos.

- **Verseno**

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Una vez disueltos completamente se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL con agua bidestilada. El verseno se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

La solución fue utilizada para desprender los cultivos de las líneas celulares HeLa y CaSki.

- **Tripsina**

Preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

La tripsina se utilizó para el desprendimiento de la línea celular ViBo.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

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

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se filtra por medio de membranas con diámetro de 22 μm . La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

- **Glutaraldehído**

Se utilizan 1.57 mL de Glutaraldehído (70% v/v) se agregan 98.43 mL de agua bidestilada.

- **Solución de Cristal Violeta**

Hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.00 g

Se preparan 500 mL de Cristal Violeta en una concentración de 0.1%

Previamente se prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el Cristal Violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

- **Solución de ácido acético**

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

- **Paraformaldehído**

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60°C.

- **Camptotecina**

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1 mL de DMSO. Se almacena a temperatura ambiente.

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
y
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la presente



Constancia

a:

Aparicio Sánchez Uriel Yair, María Elena Mejía Montoya, Hugo López Muñoz, María Luisa Escobar Sánchez, Octavio Daniel Reyes Hernández, Luis Sánchez-Sánchez

Por la presentación del trabajo:

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DEL METABOLITO DEL
DISULFIRAM MEDDTC-SO₂ EN LÍNEAS TUMORALES PROVENIENTES DE CÁNCER
CÉRVICO UTERINO.

en el XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 30 de Septiembre al 04 de Octubre del 2019


Dr. José Luis Gómez Olivares
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud


Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Coordinadora


Dra. Elsa Cervantes Ríos
Coordinadora

