



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

(LAB. N° 2 PLANTA BAJA DEL EDIFICIO DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN  
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)).

**Efecto antitumoral del *S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido*  
(MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ELIZABETH CAMACHO ZAVALA

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Lo más bello que podemos experimentar es el lado misterioso de la vida. Es el sentimiento profundo que se encuentra en la cuna del arte y de la ciencia verdadera.*

*Albert Einstein*

*Darí­a todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro.*

*René Descartes*

*A mis padres a quienes admiro y amo  
Por su esfuerzo y dedicación en todo momento.*

*A mis hermanos, por lo que me enseñan todos los días y no se aprende  
en los libros.*

*A Eliceo, Karla, Reynaldo, Mariana, Magib, Lucero, Araceli,  
Yolanda, Itzel y Gabriela, quienes representan verdaderos amigos,  
confidentes y cómplices en esta etapa de mi vida.*

*A Moisés por estar en el momento precisó.*

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez, por sus enseñanzas y brindarme todo lo necesario para construir un peldaño más en la escalera de mi formación profesional.

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

A la M. en C. María Luisa Escobar, por su ayuda y contribuciones para la realización de este trabajo.

Al Biol. Vicente Hernández, porque su enseñanza fue fundamental en mi aprendizaje. Uno de los mejores maestros que he tenido y admiro.

Al M. en C. Hugo López, porque con su conocimiento e interrogantes me ayudaron a disipar muchas dudas.

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

Al Dr. Benny Weiss Steyder y a la Dr. Lourdes Mora García, Carlos Bautista Reyes, porque sus observaciones contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

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

# ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Marco Teórico	
	A. Proliferación celular.	4
	B. Ciclo celular.	4
	C. Muerte celular.	6
	D. Necrosis.	7
	E. Apoptosis.	8
	F. Vías de señalización.	10
	G. Cáncer.	12
	H. Tipos de cáncer.	13
	I. Cáncer cervicouterino.	14
	J. Cáncer cervicouterino en México.	16
	K. Prevención, diagnóstico y tratamiento.	16
	L. Disulfiram y sus metabolitos.	18
	M. Vía metabólica de Disulfiram	20
	N. Linfocitos humanos in vitro.	22
IV.	Planteamiento del problema	23
V.	Justificación	24
VI.	Hipótesis	25
VII.	Objetivo general	26
VIII.	Objetivos particulares	26
IX.	Metodología	27
X.	RESULTADOS	34
XI.	DISCUSIÓN	47
XII.	CONCLUSIONES	51

XIII.	ABREVIATURAS	52
XIV.	APÉNDICE	53
XV.	REFERENCIAS	58

## RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. Dentro de los principales tipos de cáncer en mujeres, el cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar, sólo superado por el cáncer de mama. Actualmente, se cuenta con diferentes alternativas terapéuticas para contrarrestar esta enfermedad, sin embargo, éstas son poco selectivas, ineficientes en estados avanzados y provocan efectos secundarios que deterioran la calidad de vida del paciente, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, sobre todo en aquellas basadas en compuestos conocidos.

Dentro de las estrategias de prevención y tratamiento del cáncer se ha contemplado la valoración de compuestos sintéticos con un historial clínico, como los miembros de la familia de Ditiocarbamatos: Disulfiram, Pirrolidinditiocarbamato y Dietilditiocarbamato, compuestos que actualmente son utilizados clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, anti fúngicos y principalmente en el tratamiento de adicciones como el abuso del alcohol y cocaína. Recientemente han sido propuestos como anti cancerígenos e inductores de apoptosis en células cancerosas de pulmón, mama y próstata; además en diferentes líneas celulares, han resultado ser inhibidores de la activación de NF $\kappa$ B (Factor de Transcripción  $\kappa$ B) y del proteosoma, pese a esto son pocos los reportes en relación a cáncer cervicouterino y células no tumorales.

En base a lo anterior, estos compuestos podrían servir de modelos estructurales para sintetizar análogos o derivados que mantengan las propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis, potencializando su efecto, con acción selectiva, de tal manera que induzcan un fuerte daño a las células tumorales, afectando en lo menos posible a las células normales. Al respecto, se han sintetizado análogos de los metabolitos del Disulfiram y se ha estudiado su actividad citotóxica, pero no su actividad anti cancerígena y mucho menos su actividad selectiva, por lo que en el presente trabajo se realizó una evaluación del efecto antitumoral del *S-Metil-pirrolidinditiocarbamato-S-óxido* (MePTC-SO), análogo del metabolito del Disulfiram *S-metil-N,N-dietilditiocarbamato sulfóxido* (MeDTC-SO), en células de cáncer cervicouterino, CaSki y HeLa, así como en células no tumorales. La valoración de la actividad biológica de estos compuestos contempló el efecto sobre el potencial proliferativo de las células tumorales, encontrándose una IC<sub>50</sub> (disminución del número celular en un 50%) de 25  $\mu$ g/ml de MePTC-SO para ambas líneas celulares. La disminución del potencial proliferativo es debido a una detención del ciclo celular en la fase S para ambas líneas celulares, como lo

indica la evaluación de la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo celular, realizada por Citometría de flujo para las células CaSki y HeLa. El incremento en la expresión de la procaspasa 3, la caspasa 3 activa y la fragmentación de ADN, sugieren que el MePTC-SO induce una muerte por apoptosis. El ensayo de detección de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos tumorales, indica que este ditiocarbamato no presenta una actividad citotóxica en células tumorales ni en las células linfocíticas. Sorprendentemente estas concentraciones de MePTC-SO no afectaron el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano, sin embargo afectaron la proliferación de linfocitos en un 26%. En conjunto, los resultados indican que el MePTC-SO es un digno candidato para ser evaluado como agente con potencial anti cancerígeno.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer de mujeres mexicanas (INEGI, 2009). Los factores de riesgo involucran el inicio de una vida sexual a edad temprana, haber tenido varias parejas sexuales, el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos. Considerándose también como las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión de este cáncer (Lira, 2001). El cáncer cervicouterino, en un 99.7 % (Doorbar, 2006) está asociado al Virus de Papiloma Humano (VPH) y en particular los tipo 16 y 18 que corresponden en un 70% de los casos de esta patología, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 (Muños & Bosch, 1997) y sólo un mínimo porcentaje (1%) es negativo a VPH. En los últimos años el estudio de la biología del cáncer cervicouterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla y manifiesta, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatirlo no se tiene una medida adecuada para disminuir la incidencia en la población mexicana.

En los últimos años la investigación ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal y animal, para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, además de compuestos sintéticos con un historial clínico. Entre tales compuestos se tiene a los miembros de los Ditiocarbamatos como el Disulfiram (DSF) y sus metabolitos como el Pirrolidinditiocarbamato (PDTC) (Della *et al*, 2000) a los cuales, se les ha reportado actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama,

próstata, pulmón así como leucemias (Wickström *et al*, 2007). Actualmente se han descrito que estos compuestos son capaces de inducir apoptosis e inhibir el proteosoma (Yu *et al*, 2007) y factores de transcripción como NFκB (Liu *et al*, 1998). También se ha reportado que el DSF es rápidamente metabolizado en el organismo y que el efecto antiproliferativo puede deberse a sus metabolitos. Se piensa que el DSF puede ser tóxico ya que al ser administrado genera efectos secundarios como náuseas, vómito, escalofríos (Phillip, 2009). Ante esta situación se han generado análogos de sus metabolitos con la finalidad de conservar su efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis y que además pueda presentar mayor estabilidad, potencializar su efecto, ser selectivos y menos tóxicos. Se tienen pocos estudios sobre la actividad de estos compuestos en líneas provenientes de cáncer cervicouterino, por lo que es relevante su evaluación sobre este tipo de cáncer.

## MARCO TEÓRICO

### PROLIFERACIÓN CELULAR

De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “las células sólo provienen de células”. Las células existentes y se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y orgánulos), duplica su material genético y finalmente se divide (Alberts *et al*, 2004). Dando paso a un proceso denominado proliferación, el cual está definido como el incremento del número de células o resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte (Sánchez, 2001).

### CICLO CELULAR

La célula se reproduce mediante una secuencia ordenada de procesos, en la que duplica su contenido y luego se divide en dos células hijas generalmente iguales (Alberts *et al*, 2004). Estos procesos en conjunto son denominados ciclo celular y presenta dos etapas bien definidas: división celular propiamente dicha (por mitosis para células somáticas y por meiosis para células germinales) y la interfase (común en ambas) (Luque & Herráez, 2001).

El ciclo celular comienza cuando se forman dos nuevas células hijas, por la división de una única célula madre, y finaliza cuando una de estas dos células se divide de nuevo en otras dos células hijas (Luque & Herráez, 2001).

En la interfase la mayor parte de los componentes celulares se sintetizan continuamente, de tal manera que la masa celular aumenta gradualmente conforme se acerca la división. Contempla la fase G<sub>1</sub>, periodo que sigue a la mitosis y la separa de la fase S, en ella se presenta una activa síntesis de ARN y proteínas como las ADN helicasas, primasas y polimerasas involucradas en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), así como factores de transcripción y enzimas denominadas ciclinas, además de otros componentes celulares, por lo que la célula aumenta de tamaño (Garret, 2001). La fase S es el periodo que

transcurre con la síntesis del ADN, formándose una copia exacta del material genético. La fase G<sub>2</sub> es el periodo que sigue a la fase S, en este estadio tiene lugar un crecimiento, pero además actúa como un periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta. M es la fase que sigue a G<sub>2</sub> y se designa como mitosis, su inicio está marcado por una condensación (enrollamiento y plegamiento) de la cromatina de la célula, que hace que los cromosomas sean lo suficientemente densos como para que se puedan observar al microscopio. La mitosis consta de 5 etapas propiamente dichas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Luque & Herráez, 2001). Como producto de esta división se obtendrán dos células hijas con idéntico contenido genético. Existe otra fase alterna al ciclo celular denominada G<sub>0</sub> y se refiere a las células que se encuentran temporal o permanentemente fuera del ciclo (Fig. 1).

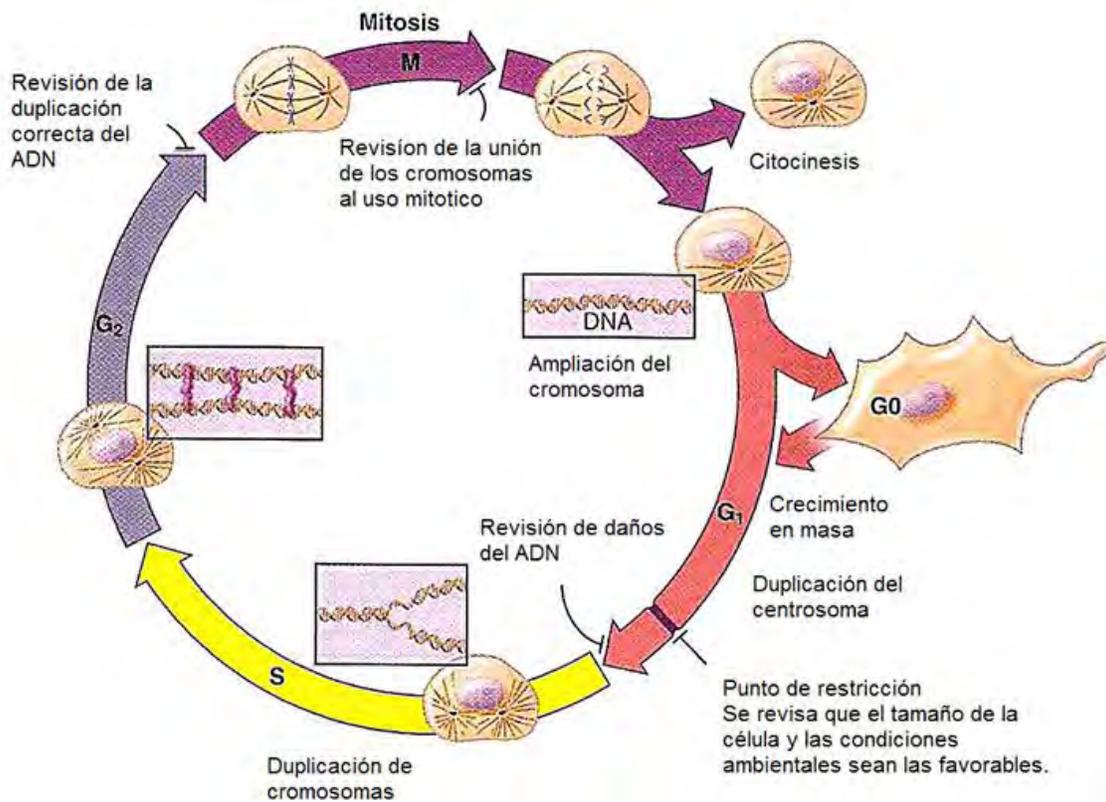


Figura 1. Ciclo celular. (Imagen tomada y modificada de Pollard & Earnshaw, 2004)

De manera general durante el ciclo celular se deben completar los eventos de cada fase antes de pasar a la siguiente, por lo que existen puntos de control que monitorean la integridad del ADN y se encuentran en puntos estratégicos del ciclo celular, como son en la fase tardía de G<sub>1</sub> y en la interfase G<sub>2</sub>/M, para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas (Mathews & Van, 1998).

Durante estos intervalos la célula monitorea los ambientes intracelulares y extracelulares para asegurarse de que las condiciones sean las apropiadas, de no ser así la célula debe decidir si pasa a la siguiente fase o efectúa una pausa que permita ganar tiempo y reparar daños o mandar a muerte a la célula (Alberts *et al*, 2004).

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de complejos enzimáticos, que controlan la entrada y la progresión de las células a lo largo de las distintas fases del ciclo, entre estos se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina) (Peralta *et al*, 1997). Por ejemplo, las ciclinas D1, D2 y D3 se sobreexpresan gracias a estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y se unen a las CDKs 4 y 6 que fosforilan parcialmente a la proteína retinoblastoma (pRb) haciendo que la célula progrese en la fase G1 temprana y no quede detenida en G0. Los complejos ciclina E-CDK2 se activan en la fase G1 tardía completando la fosforilación de la pRb. El Factor de maduración-promoción (maturation-promoting factor o MPF), interviene en la transición de G2 a M. De la misma forma estos complejos enzimáticos también son inhibidos, por Inhibidores de las CDK (cyclin-dependent kinases inhibitors o CDKIs) cuando su participación está concluida. Existen dos familias de inhibidores las INK4 (INK4A, INK4B, INK4C e INK4D) que inhiben específicamente a la CDK4 y la CDK6 en G1 y la familia de CIP / KIP (CIP1, KIP1 y KIP2) que inhiben a las CDKs en todas las fases del ciclo (Gasió *et al*, 2005).

En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis celular mantiene el estado de diferenciación de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación, su tiempo de supervivencia y su territorialidad, de acuerdo con las necesidades del organismo, eliminando aquellas que no son indispensables mediante un proceso de muerte, por ejemplo en el recambio continuo de algunos epitelios y en el funcionamiento del sistema inmune (Jiménez, 2003). De esta manera la muerte celular toma un papel fundamental que es necesario examinar.

## MUERTE CELULAR

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, ese número resulta de la suma de dos procesos a) la multiplicación celular y b) la muerte o eliminación de un número igual de células. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo los más importantes necrosis y

apoptosis, estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica. Si bien ambos tipos son ordenados, la apoptosis presenta una mayor relevancia por ser un proceso natural a diferencia de la necrosis (Dubin & Stoppani, 2000).

## NECROSIS

La necrosis es definida frecuentemente como un fenómeno pasivo y degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, puede ser una consecuencia de un trauma ambiental como temperaturas extremas, isquemia, daño mecánico y generalmente como respuesta a una lesión grave, por una sobredosis de agentes citotóxicos (Fink & Cookson, 2005). Además puede implicar un carácter patológico que se desencadena tras un daño celular extremo que daña irreversiblemente el funcionamiento de las células. La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por un aumento en el volumen celular (oncosis), hinchazón de orgánulos, la rotura de la membrana plasmática y la subsiguiente pérdida o salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Kroemer *et al*, 2008).

La permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior (principalmente de iones de calcio) que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta y algunas rutas metabólicas se alteran debido a las nuevas concentraciones iónicas que se establecen. Así la mayor concentración intracelular de calcio inhibe la producción de ATP, a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas, la cromatina nuclear pierde su conformación original y constituye pequeños agregados, mientras que algunos orgánulos membranosos, como el retículo endoplásmico o las mitocondrias, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Como etapa final, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior y promueve una respuesta inflamatoria, posteriormente las células fagocíticas degradan los restos (Paniagua, 2007).

## APOPTOSIS

El tipo de muerte más importante ocurre en células que están sujetas a recambio o son senescentes, células dañadas que ya no son requeridas y que se eliminan a través de muerte celular programada denominada apoptosis, del griego antiguo apo-toe-sis, que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. Kerr en 1972 retomó el término y lo aplicó a la pérdida de las células por los tejidos para la sobrevivencia del hospedero (Elinos *et al*, 2003).

Los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis incluyen la pérdida de contacto celular y estructuras membranales especializadas (por ejemplo, microvellosidades), así como la formación de protuberancias. Asociada a estos cambios se da una disminución de la turgencia, aparentemente debido a la pérdida de líquido intracelular e iones. (Jiménez, 2003). En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos que van de 200 a 100 y 50 kilopares de bases para finalmente cortarse cada 180 pares de bases o sus múltiplos siguiendo los espacios internucleosomales (Elinos *et al*, 2003). Asimismo el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, orgánulos y retículo endoplásmico. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o por fagocitos, impidiendo que moléculas citoplásmicas, orgánulos y material genético queden libres entre las células, de esta manera no se genera una respuesta inflamatoria como en la necrosis (Fig. 2). A nivel bioquímico, ocurre la activación de proteasas específicas denominadas caspasas.

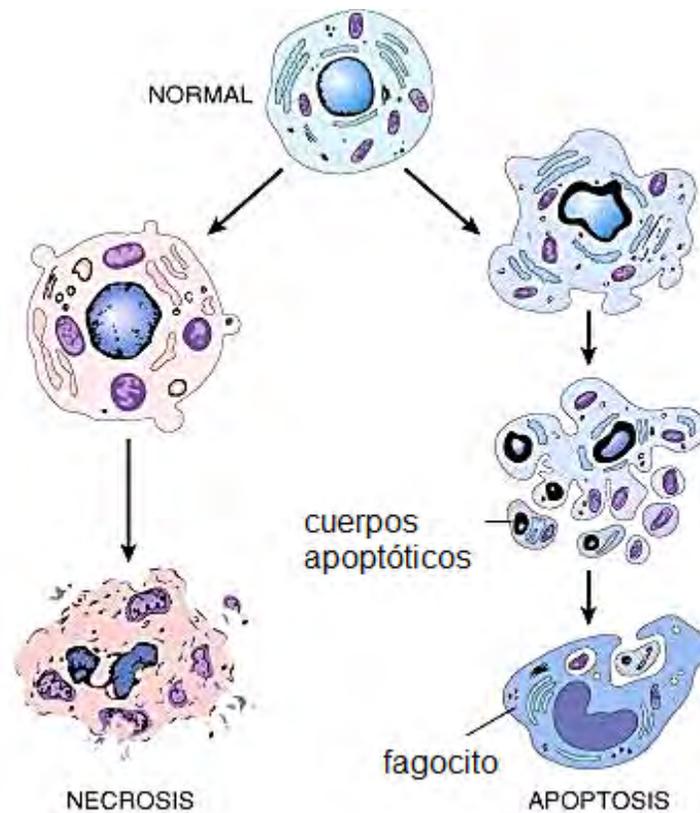


Figura 2. Esquema de necrosis y apoptosis (Imagen tomada y modificada de Van, 2002).

Las caspasas existen en las células normales como zimógenos inactivos, dentro sus funciones destacan, la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica de aquellas involucradas en la reparación del ADN y las encargadas de la organización del citoesqueleto, participan en la destrucción de la lámina nuclear en la activación de CAD (caspase activated Dnase) e induce a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas. Se clasifican en tres grupos: I) mediadores de la inflamación que incluyen a las caspasas -1,-4,-5,-11,-12,-13 y -14; II) efectoras o ejecutoras de la apoptosis que incluyen a las caspasas- 3,-6 y-7; y el grupo III) activadoras de caspasas apoptogénicas que incluyen a las caspasas-2, -8, -9 y -10 (Fan *et al*, 2005). Cuando las células inician la apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos cortes proteolíticos que cortan el péptido precursor en las subunidades grande y pequeña que constituyen la enzima activa desencadenando el proceso apoptótico.

Dentro de la apoptosis existen dos tipos generales de vías de señalización, que permiten el inicio de la activación de caspasas; estas vías son la intrínseca y extrínseca y existen diferencias entre ellas, la primera depende de la

participación de la mitocondria y la segunda implica a los receptores de muerte como son el factor de necrosis tumoral (TNF) y Fas (CD95) (Jiménez, 2003).

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Por un lado cuando la célula sufre estrés o daño por el calor, o por radiaciones, hipoxia, agentes víricos, exceso de glucocorticoides u otros factores, la apoptosis puede activarse por vía intracelular. Estas señales hacen que las mitocondrias liberen el citocromo C, hacia el citosol donde participa en la formación del apoptosoma junto con la molécula adaptadora Apaf-1, para reclutar y activar a la caspasa 9, la cual a su vez activa a las procaspasas 3 y 7, siendo estas caspasas las responsables del clivaje de varias proteínas que llevan a una muerte por apoptosis (Fig. 3). (De Toro, 2006).

No obstante, esta vía puede ser inhibida por la familia Bcl-2, dentro de estos miembros se encuentran moléculas pro y anti-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) inhibe la apoptosis al impedir la salida del citocromo c e inactivar el factor Apaf-1. Mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bad, Bax y Bak) se translocan a la mitocondria después de recibir la señal de muerte y promueven la liberación del citocromo C; Bad por su lado, inactiva a los inhibidores de la apoptosis (Caballero & Morán, 2002)

Mientras que en la vía extrínseca, se puede ejemplificar con la señal pro-apoptótica que se desencadena mediante la molécula denominada Fas y su ligando FasL, miembro de la familia receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Al ser estimulado, el Fas se une a unas proteínas adaptadoras denominadas FADD (del inglés, Fas-Associated protein with Death Domain) que a su vez se unen a la procaspasa 8 y ésta activa a la caspasa 3, produciendo una reacción en cadena que culmina con la apoptosis (Fig. 3) (Díaz et al, 2005). También la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C, generando con Apaf-1 el apoptosoma y activación de la vía intrínseca.

Por otro lado el factor de necrosis tumoral (TNF), actúa de la siguiente manera, se une a un receptor de la misma familia, el TNFR-1, éste se une a las proteínas activadoras denominadas TRADD (del inglés TNF receptor-associated death domain) que, a su vez se unen a las FADD, continuando el mismo proceso que Fas (Fig. 3). Sin embargo, hay factores intracelulares que pueden unirse a las TRADD de modo que éstas, en vez de activar las FADD, activan el factor de

transcripción nuclear NFκB, cuyo efecto es inhibir la apoptosis al transcribir y mandar señales de supervivencia (Paniagua, 2007).

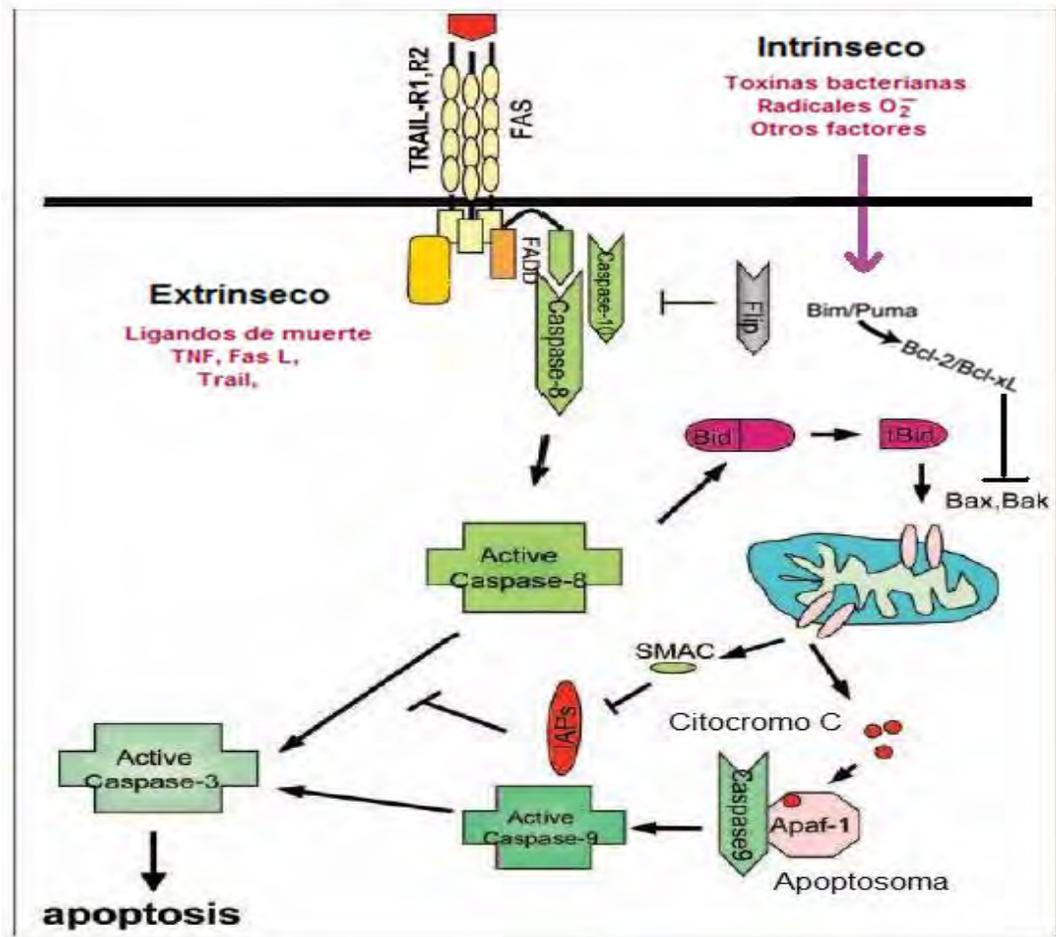


Figura 3. Vías de señalización, intrínseca y extrínseca respectivamente (Imagen tomada y modificada de Jin & El-Deiry, 2005)

El desequilibrio del proceso apoptótico determina efectos que pueden ser letales, como exceso en la destrucción celular, atrofia de tejidos, hiperplasias o neoplasias por lo que se relaciona de forma directa a la apoptosis con enfermedades como Alzheimer, Parkinson y cáncer (Dubin & Stoppani, 2000).

No obstante, la acumulación de una serie de alteraciones en el ADN (mutaciones puntuales, amplificaciones, deleciones, translocaciones, inserciones víricas e hipometilaciones) que afectan a un grupo particular de genes (los proto-oncogenes y los genes supresores) da lugar al fenotipo de células transformadas con las siguientes características: 1) diferenciación aberrante; 2) proliferación celular descontrolada; 3) supervivencia prolongada, y 4) tendencia a la invasión de tejidos adyacentes y metástasis. En conjunto, estos puntos citados anteriormente,

describen las características de células tumorales que dan origen al cáncer de manera general (Karp, 2006).

## EL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células provocada por modificaciones en la información genética subyacente de las mismas. Debido a estas alteraciones las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva (metástasis: las células se desprenden de la masa original entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo, donde establecen tumores secundarios) destruyendo tejidos y órganos normales (Karp, 2006). (Fig. 4).

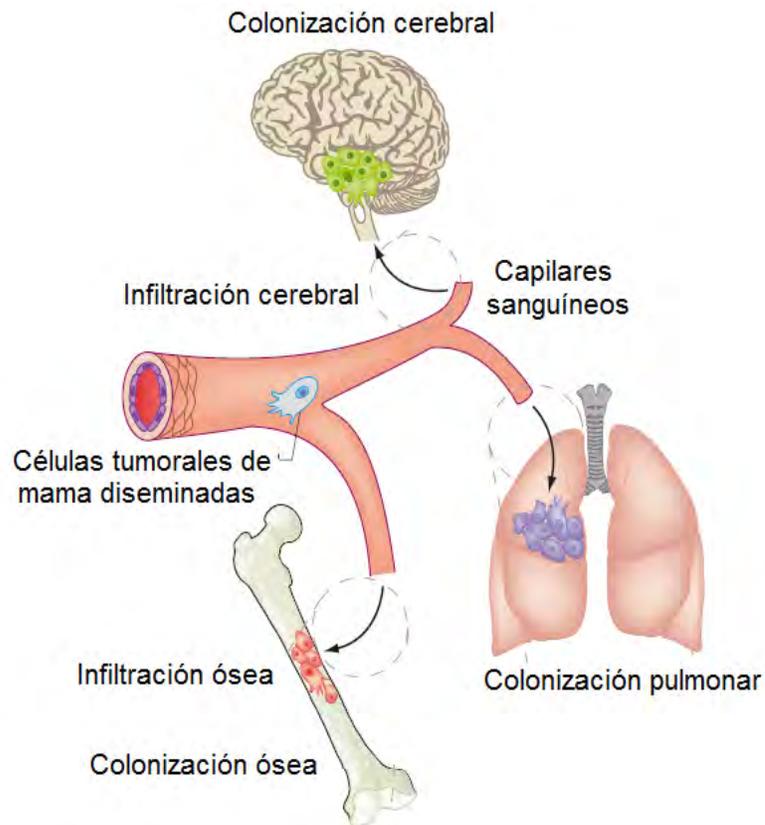


Figura 4. Metastasis (Imagen tomada y modificada de Massagué, 2009)

La característica más importante de la célula tumoral es la pérdida del control de su crecimiento, además se apilan unas sobre otras para formar grumos a diferencia de las células normales que forman una capa simple o monocapa,

esto es porque las células responden a influencias inhibitoras de su ambiente. Las alteraciones más notables después de la transformación ocurren en los cromosomas. En general las células normales conservan su dotación cromosómica diploide normal conforme crecen y se dividen tanto in vivo como in vitro. Mientras que las células cancerosas con frecuencia presentan dotación cromosómica muy aberrante, alteración denominada aneuploidia. Los cambios morfológicos más notables ocurren en el citoplasma, casi siempre afectan al citoesqueleto. La célula normal por lo general tiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, mientras que el citoesqueleto de la célula cancerosa a menudo está reducido, desorganizado o ambas cosas. Las células cancerosas son aparentemente inmortales en el sentido de que continúa dividiéndose de manera indefinida mientras las condiciones de nutrientes y de cultivo sean adecuadas para su sobrevivencia (Karp, 2006).

Existen factores tanto biológicos como químicos y físicos que contribuyen al desarrollo del cáncer, dentro de los biológicos se encuentran los virus, en los químicos se puede mencionar sustancias cancerígenas como el benceno y dentro de los físicos se encuentra los rayos UV, todos muestran una propiedad común, provocan cambios en el genoma, sin embargo la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen (Hernández & Ríos, 1999). De la misma manera en que existe una clasificación para los factores que contribuyen a la formación de células cancerosas existe una clasificación para los diferentes tipos de cáncer en base al tipo de tejido del cual provengan, así como con el tipo normal de células que más se asemejan.

## TIPOS DE CÁNCER

El primer grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.

El segundo grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas y los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.

En el tercer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras (Pardo, 1998).

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI, 2009). Siendo el cáncer cervical una de las principales causas de muerte y una enfermedad que se puede prevenir es relevante su análisis.

### CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu).

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un carcinoma, las células cancerosas se ubican en los tejidos del cuello uterino, se desarrolla en el cérvix, en la porción inferior estrecha del útero de una mujer. Entre algunos de los factores que contribuyen al desarrollo de CaCu, se encuentran el bajo nivel socioeconómico; el inicio temprano de la vida sexual; el antecedente de haber tenido dos o más parejas sexuales; la edad temprana del primer embarazo; tres o más partos; el uso de anticonceptivos hormonales, el tabaquismo y el más relevante la presencia de VPH (Tirado *et al*, 2005).

Los eventos tisulares en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con el cáncer *in situ* denominado Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión Intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de esta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (Hernández, 2004).

A partir de la década de los años ochenta se ha identificado al virus del papiloma humano (VPH) como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad; no obstante CaCu invasor se asocia con la presencia de VPH en un 99.7% de los casos (Doorbar, 2006). Existen 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo (AR), por encontrarse asociadas al CaCu en

más de 95% de los casos. Por otra parte, los de tipo 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación con CaCu denominándose, por tanto, de bajo riesgo (Alonso, 2000).

El virus papiloma humano (VPH) corresponde a un virus ADN, que infecta piel y mucosas, altamente especie específico. Tomando como modelo el VPH 16, para esquematizar el mapa genómico, presenta una estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región de control largo (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF). La infección por VPH, comienza con un microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permitiendo la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de HPV, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1. Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped (endocitosis). Posteriormente la cápside viral experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfido que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de virones (Quisehuatl, 2009).

En la primera etapa conocida como no productiva, la población viral localizada en el estrato basal, mantiene la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extra cromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético. Se postula que durante esta etapa se aseguraría que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune. Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula; esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva. En este proceso de replicación del ADN viral participan factores de replicación como las proteínas E1 y E2 que forman complejos que se unen a secuencias en el origen de replicación viral y que utilizan las polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las proteínas E4 y E5 se piensa están involucradas en la regulación de funciones virales posteriores. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas que han de provocar que la célula hospedera entre continuamente a ciclo celular y se divida. (Rivera *et al*, 2006).

En el año 2007 se reportaba un diagnóstico de 500, 000 nuevos casos de CaCu al año en el mundo y se reportaba como la principal causa de muerte por neoplasia en mujeres de países en vías de desarrollo (INEGI 2007). Siendo México un país en vía de desarrollo, con bajo nivel socioeconómico y carencias en el sector salud, la enfermedad representa un importante problema, por lo que requiere de atención por parte de investigadores, estadistas y médicos.

## CÁNCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO

En México los tumores malignos se encuentran entre las principales causas de defunción. El CaCu, uno de los de mayor incidencia en nuestro país, contaba en el 2007 con una tasa de mortalidad de 13.3%, y registraba 4,000 muertes anuales representando así la primera causa de mortalidad en mujeres por cáncer, dentro de un rango de edad de 35 a 64 años por encontrarse en una etapa hormonal fluctuante (INEGI, 2007). Actualmente el CaCu, ocupa el segundo lugar solo superado por el cáncer de mama (INEGI, 2009).

## PREVENCIÓN

Existen diversos métodos para prevenir este tipo de cáncer, entre los que se encuentran (Villa *et al*, 2006):

- ▣ Realizar la prueba de Papanicolaou en forma regular
- ▣ Práctica Sexual Segura
- ▣ No fumar
- ▣ No beber
- ▣ Vacunación contra HPV (tipo 16 y 18)

No obstante a pesar de ser una enfermedad de detección temprana no existe una cultura que permita su diagnóstico y tratamiento oportuno, no es hasta una etapa avanzada o la extensión de la enfermedad cuando se trata. El motivo de dejar avanzar la enfermedad puede ser que los síntomas del CaCu por lo general no aparecen hasta que células anormales se vuelven cancerosas e invaden tejido cercano (Hazzard, 2005).

Cuando esto sucede, el síntoma más común es el sangrado anormal, que puede incluir:

- ◆ Sangrado entre periodos menstruales regulares.
- ◆ Sangrado después de las relaciones sexuales.

- ◆ Sangrado menstrual que dura más tiempo y es más abundante de lo normal.
- ◆ Sangrado después de la menopausia.

Para tener un diagnóstico definitivo usualmente requiere un examen histológico, aunque las primeras indicaciones de cáncer pueden ser dadas a partir de síntomas o radiografías.

## DIAGNÓSTICO

Los exámenes para diagnosticar CaCu incluyen:

- ◆ Examen de Papanicolaou: detecta cáncer cervical así como tejido pre canceroso en el cérvix, llamada displasia cervical. El médico colecta una muestra de células del cérvix para su examinación. La realización de un frotis o examen anual de Papanicolaou permite la reducción de cáncer en países en vías de desarrollo.
- ◆ Examen de HPV: se puede examinar el mismo material de la prueba de Papanicolaou para detectar virus de HPV (subtipos de alto riesgo).
- ◆ Colposcopia
- ◆ Biopsias

Según la extensión del cáncer en base al diagnóstico, el tratamiento puede consistir en una o más terapias (Lowy & Schiller, 2006).

## TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer que se proporciona actualmente se fundamenta en tres pilares básicos: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

- Cirugía: extirpación quirúrgica de un tumor canceroso y tejido cercano, y posiblemente nódulos linfáticos cercanos. Si el cáncer ha alcanzado capas más profundas del cérvix pero no se ha propagado más allá del cérvix. La razón de que la cirugía siga siendo la principal opción para el tratamiento inicial de muchas formas de cáncer se debe, en parte, al uso de terapias neo adyuvantes que, con la combinación de radioterapia y quimioterapia, logran reducir la masa del tumor antes de la extirpación quirúrgica.
- Terapia de Radiación (Radioterapia): el tumor es irradiado con rayos X o gamma, que originan iones en las células neoplásicas y bajo la influencia de dicha radiación los iones pueden romper las hebras de ADN, dando

lugar así a muchas mutaciones, lo que causa suficiente daño al ADN para eliminar directamente las células, o bien, para inducir muerte celular.

- Quimioterapia: Generalmente los medicamentos empleados son agente alquilantes y ejerce su acción mediante la producción de aductos y enlaces intra e inter cadenas de ADN, generando especies reactivas de oxígeno, activación de p53, esto resulta en rompimiento de la cadena del ADN, y uniones cruzadas de cadenas complementarias que previene la síntesis del ADN. La ARN polimerasa dependiente del ADN también es inhibida, disminuyendo la transcripción. Este agente puede llevar a mutaciones en el ADN para posteriormente mandar a muerte las células como la radioterapia.

La mayoría de las veces se requiere de la combinación de las terapias para obtener éxito. Sin embargo estos tratamientos son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas sin dañar en forma simultánea a las células normales puesto que, tanto células sanas como cancerosas se encuentran ciclando y exponiendo su material genético ante el tratamiento, generándose así efectos secundarios en el paciente, como pérdida de cabello, irritabilidad, vómito, mareo, por citar algunos. (Goldwein & Vachani, 2006). 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 a diferencia de la quimioterapia tradicional y radioterapia. Actualmente se ha encontrado que compuestos con aplicación para determinadas patologías no tumorales, presentan actividades antiproliferativas e inductoras de apoptosis. Un ejemplo de estos compuestos son los Ditiocarbamatos, particularmente el DSF, droga que ha sido utilizado por décadas en el tratamiento del abuso del alcohol, inhibiendo la enzima aldehído deshidrogenasa y recientemente propuesto como un agente anti cancerígeno al igual que sus metabolitos (Chen *et al*, 2006).

## DISULFIRAM Y SUS METABOLITOS

Los Ditiocarbamatos son una clase de metal-quelante, con varias aplicaciones en medicina como, el tratamiento de infecciones por bacterias u hongos además de actuar como antioxidantes. Particularmente el DSF, fue aprobado como medicamento hace décadas para combatir el alcoholismo (Zuben *et al*, 2005) y más recientemente, se ha sugerido en el tratamiento de la dependencia de cocaína (Wickström *et al*, 2007), sin embargo se ha distinguido por ser un compuesto, que al ser administrado previamente a una ingestión de alcohol, provoca una serie de malestares como son náuseas, vómito, taquicardia e

hipotensión, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo. No obstante investigaciones recientes han propuesto un potencial antitumoral de este compuesto y sus metabolitos.

Se han reportado que miembros de la familia de Ditiocarbamatos como DSF, PDTC y Dietilditiocarbamato (DDTC), actúan como agentes anti cancerígenos e inductores de apoptosis en células cancerosas de pulmón, mama y próstata. Algunos estudios demuestran que presentan acción antineoplásica sobre líneas celulares U-937 (leucemia humana) y actividad antioxidante (Wickström *et al*, 2007).

El DSF droga de tiocarbamatos ha sido propuesto como agente antitumoral basado en la capacidad de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares, así como reductor del crecimiento de células glía, carcinoma pulmonar y melanoma en ratones. Además ha mostrado reducir angiogénesis, inhibir ADN topoisomerasa (Yakishich *et al*, 2001) e inhibir el factor nuclear Kappa-B (NFκB) en hepatomas, líneas celulares de cáncer colorectal y células endoteliales. En melanomas humanos metastásico (células 46A-C81, C81-61 y C83-2C) tratados con DSF, en una dosis de 25-50 ng / ml, causó muerte celular por apoptosis. Sin embargo la misma dosis de DSF resultó no significativa en melanocitos (Cen *et al*, 2002).

También se ha propuesto que el efecto del DSF está limitado por sí mismo, pero al formar un complejo con cobre se activa y finalmente puede actuar como un inhibidor del proteosoma 26S. No obstante el mecanismo no ha sido establecido completamente y todo parece indicar que el DSF actúa de manera no selectiva. También se ha reportado que DSF puede tener actividad antitumoral y quimio sensitiva. En cuanto a su toxicidad se ha reportado en líneas celulares y células tumorales de pacientes de cáncer de mama, ovario y células pulmonares (Wickström *et al*, 2007). Un efecto citotóxico, se ha atribuido a una pro-apoptosis, reacción redox y permeabilización de la membrana mitocondrial.

También ha resultado ser más activo en células hematológicas que en tumores sólidos. Además de mostrar un efecto citotóxico alto en células de leucemia linfocítica crónica comparado con linfocitos normales, lo que indica una selectividad en algunos tumores (Yu, *et al*, 2007).

Por otro lado, PDTC metabolito de DSF, ha sido propuesto como un agente antitumoral basado en la capacidad de inducir apoptosis, se ha estudiado su efecto en la proliferación y supervivencia de la línea celular promielocítica HL-60, a concentraciones bajas como 10 μM de PDTC, induciendo una significate reducción del crecimiento celular (Della *et al*, 2000). Además de inducir muerte celular programada mediante la activación de pro-caspasa 3 y el rompimiento de

la Poli-ADP-Ribosa-Polimerasa (PARP) y la contemporánea activación del proceso apoptótico, mediante la liberación de el citocromo c de la mitocondria. También se tienen reportes de ser inductor de apoptosis en una variedad de líneas celulares de cáncer humano, de colon, mama y pulmón. No obstante PDTCC también causa muerte celular en células endoteliales normales de diversas especies, timocitos de rata, puercos y células musculares humanas (Burkitt *et al*, 1998).

Otros trabajos sugieren que metabolitos de PDTCC y DDTCC, pueden ser biotransformados a prolinetiuramdisulfido y DSF, respectivamente. Se ha encontrado que estos metabolitos inducen apoptosis después de detener en la fase G1/S del ciclo celular y decrecer el nivel de bcl-2, además de incrementar el nivel de p53. En contraste Prolineditiocarbamato y Dietilditiocarbamato, no inducen apoptosis y detienen en la fase G1 del ciclo celular. Este trabajo sugiere una apoptosis, modulada por efectores intracelulares como son NFκB AP-1, bcl-2 y la activación de p53 en estados tempranos (Liu *et al*, 1998).

Por otro lado existe una relación entre los Ditiocarbamatos y el cobre; el cual ha mostrado ser esencial para el proceso de angiogenesis tumoral, constantemente niveles de cobre se han encontrado en suero y tejidos en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo, mama, próstata y cerebro, sugiriendo que el cobre puede usarse como un marcador tumoral específico. En relación a esto se ha reportado que el complejo de DSF y PDTCC con cobre inhiben potencialmente la actividad proteosomal, en cultivos de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y células MCF10DCIS.com, pero no en normales o células inmortalizadas MCF-10A antes de inducir a muerte celular apoptótica (Chen *et al*, 2006). Los mismos autores encontraron en ratones marcados con tumores (MDA-MB-231), tratados con los complejos de cobre-DSF y cobre-PDTCC, inhibición significativa del crecimiento del tumor en un 74%, y lo asociaron a la inhibición de la actividad proteosomal, a una sobre expresión de ubiquitina y muerte por apoptosis.

## VÍA METABÓLICA DE DISULFIRAM

En 1977, Cobby y col. demostraron que el DSF no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol pues encontraron que, después de ser ingerido, es reducido rápidamente a Dietilditiocarbamato (DDTC) por acción de la glutatión reductasa (Cobby *et al*, 1977).

La vía metabólica para la biotransformación del DSF se muestra en la figura 5. donde son utilizadas las siguientes abreviaturas: DSF, bis(dietiltiocarbamoil)disulfuro; DDC, N,N-dietiltiocarbamato ácido; el cual sufre una reacción de metilación para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el MeDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato; y MeDTC-SO, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido; Éste es el precursor de MeDTC-SO<sub>2</sub>, S-metil-N, N-dietiltiocarbamato sulfona; TMT, tiol metiltransferasa; TPMT, tiopurina metiltransferasa; CP-450, complejo citocromo P-450 (Zaldívar *et al*, 2006). MePTC-SO, S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido, análogo del metabolito MeDTC-SO.

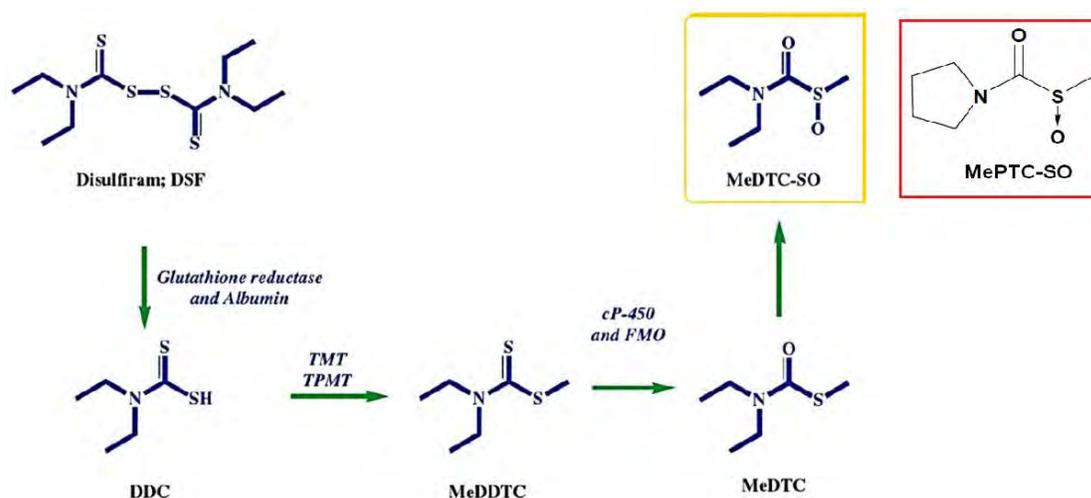


Figura 5. Vía metabólica para la biotransformación del DSF, y estructura del MePTC-SO (Imagen tomada y modificada de Zaldívar *et al*, 2006).

De manera particular S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) análogo del metabolito del DSF S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido (MeDTC-SO), ha sido evaluado, en cultivos *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* (bacteria oportunista, dependiente de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa “BADH”, que infecta tejidos de las vías urinarias, el ojo, las heridas causadas por quemaduras y los pulmones de individuos con fibrosis quística), mostrando actividad similar al DSF y otros metabolitos de éste, al inhibir la enzima BADH además de presentar una mayor estabilidad molecular (López, 2009).

En conjunto los antecedentes sugieren que DSF y algunos de sus metabolitos presentan efectos citotóxicos, antioxidante, actividad inhibitoria de la enzima BADH, inductora de apoptosis entre otras, en diferentes líneas celulares y modelos experimentales. Por ello S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) puede ser considerado un candidato para evaluar su efecto antiproliferativo

en células de CaCu, al presentar la estructura base del DSF y sus metabolitos con el fin de encontrar un compuesto con potencial antiproliferativo, selectivo e inductor de apoptosis en células cancerígenas.

Dentro de los trabajos de investigación es importante seleccionar modelos experimentales que permitan la evaluación de la actividad tóxica de las moléculas propuestas con fines terapéuticos, con la finalidad de detectar los posibles efectos indeseables de los compuestos antes de ser empleados como medicamentos, dependiendo del compuesto, referencias y enfoque de la investigación. Dentro de los más recomendados, se utiliza a los epitelios, fibroblastos y linfocitos.

## LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Los linfocitos T y B son las células encargadas de la defensa específica del sistema inmune, derivan de la médula ósea (linfocitos B) o del timo (linfocitos T), respectivamente. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos, mientras que los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células, así como de funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes, incluida la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

Los cultivos de linfocitos ofrecen grandes ventajas al ser indicadores extremadamente sensitivos de cambios mutagénicos, representan una parte del cuerpo con exposición continua a los productos metabólicos vertidos en la sangre con una vida media de 2-4 años, lo que permite observar lesiones en su ADN por exposiciones crónicas a bajas dosis, presentan una actividad de reparación baja en comparación con otras células que ciclan normalmente, la mayoría de los linfocitos están en la fase G0 del ciclo celular, y en cultivos tratados con un mitógeno con o sin activación metabólica, permite analizar aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) y estructurales (ACE) y los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), el índice mitótico (IM), la cinética del ciclo celular (CCC), el índice de replicación (IR), tasa de proliferación linfocítica (TPL), etc. Por todo lo anterior son un modelo experimental más utilizado para evaluar la actividad de fármacos de reciente creación, así como el posible impacto biológico en el hombre al administrar tales fármacos. (Rodríguez, 1995).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007 (INEGI, 2009). No obstante los tratamientos actuales para combatir esta enfermedad, resultan ser pocos selectivos, tóxicos, e ineficientes en estados avanzados, generando la necesidad de buscar nuevas estrategias basadas en compuestos que presenten una acción selectiva, con una citotoxicidad mínima. Dentro de estas estrategias, en los últimos años se han explorado compuestos conocidos que presentan un historial clínico y actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo del cáncer. Entre estos compuestos figuran los análogos del DSF y sus metabolitos.

## JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer cervicouterino representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres (INEGI, 2009); se asocia con la presencia de VPH en un 99.7% de los casos (Doorbar John, 2006), donde el tipo 16 y 18 se consideran los de mayor incidencia y por tanto de alto riesgo (Lewis, 2004). Pese a los resultados obtenidos en la investigación de la biología del carcinoma de cérvix, tratamientos y prevención, éste ha mantenido su incidencia en la población mexicana.

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

## HIPÓTESIS

Es conocido que el DSF y sus metabolitos poseen propiedades antitumorales, antioxidantes e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares, abriendo la posibilidad de que el análogo del metabolito del DSF *S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido* (MePTC-SO) presente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antiproliferativo del S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO), su efecto en el ciclo celular así como su capacidad de inducir apoptosis en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cultivar las líneas celulares CaSki y HeLa y fibroblastos no tumorales.
- Determinar la concentración de MePTC-SO, requerida para disminuir en un 50% ( $IC_{50}$ ) la densidad celular en las líneas tumorales CaSki y HeLa.
- Determinar la actividad citotóxica del MePTC-SO en cultivos de células de Ca Cu y linfocitos humanos.
- Establecer si el MePTC-SO afecta el ciclo celular de las líneas tumorales CaSki y HeLa, a través de la distribución de ADN en las fases del ciclo celular, determinada por citometría de flujo.
- Evaluar si el MePTC-SO, induce un incremento en la expresión de procaspasa 3, y caspasa 3 activa en las líneas tumorales CaSki y HeLa mediante la técnica de inmunocitoquímica.
- Determinar si el compuesto MePTC-SO induce fragmentación del ADN en las células tumorales CaSki y HeLa a través de la técnica de TUNEL.
- Determinar si las  $IC_{50}$  obtenidas para las células tumorales CaSki y HeLa, afectan el potencial proliferativo de fibroblastos no tumorales de cérvix y linfocitos humanos.

## **METODOLOGÍA**

### *Cultivo de células tumorales CaSki y HeLa*

Células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki, ambas líneas provenientes de American Type Culture Collection (ATCC), fueron sembradas en cajas petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 10 % de suero neonato de ternera (NCS; Gibco, USA) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera a saturación húmeda. Se permitió la proliferación de los cultivos hasta alrededor de un 70 % de confluencia para realizar los ensayos posteriores (Morgan & Darling 1995).

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

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco, USA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en escindir el tejido en trozos pequeños (5mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.1 %. La cual se lleva a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex, USA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37 °C en un baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vierte a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. El filtrado se centrifuga (centrifuga; Dinac, USA) por 5 minutos a 1500rpm, se decanta el sobrenadante y el botón celular es cultivado en cajas petri de 60 mm (Pirex, USA), se mantienen en una incubadora (Nuair, USA) al 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante dos días máximo, después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio (totalmente), de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continúa así hasta obtener un 70% de confluencia. En este momento se obtienen poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular.

### *Proliferación de linfocitos humanos con Carboxifluoresceina (CSFE).*

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

Para el ensayo de Carboxifluoresceina; se agregó en cada tubo eppendorf la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 células/ml de medio total (tubos por condición; activados y marcados con Carboxifluoresceina, vehículo y tratamiento). Se realizan dos lavados con PBS libre de suero. Para marcar con Carboxifluoresceina (Zigma-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en 4ml de PBS con 10 $\mu$ l de Carboxifluoresceina (12 $\mu$ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron 15 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 5% SFB, centrifugaron a 1500rpm (dos veces) y se resuspendieron en 4 ml de RPMI al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos eppendorf a una densidad de 1 000 000 células/ml de RPMI suplementado con 20% de SFB y 25  $\mu$ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con MePTC-SO se trataron las células con la IC<sub>50</sub> (decremento en un 50% del número celular). Las células contenidas en cada tubo eppendorf fueron siembran en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un

volumen de 200 $\mu$ l e incubadas hasta su evaluación. Ver condiciones en el anexo tabla 2. Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y resuspendió en 1 ml de Verseno frío por 5 min, se centrifugó y retiró el Verseno, posteriormente se resuspendió con 500  $\mu$ l de PBS (dos veces), y 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 2%, para leerse en el citómetro de flujo.

#### *Preparación del MePTC-SO*

Se partió de un stock de 2000 microgramos de MePTC-SO disueltos en 50 $\mu$ l de etanol.

Para los ensayos de curva dosis-respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 200 a 0.37  $\mu$ g/ml para la obtención de una IC<sub>50</sub>. Del stock se tomaron 5  $\mu$ l y se llevaron a 1 ml con medio RPMI al 5% suero neonato de ternera (NCS; Gibco, USA) en tubos eppendorf de 1.5 ml para tener una concentración 200 $\mu$ l /ml del cual se tomaron 500  $\mu$ l y llevaron a 1 ml con medio RPMI 5% de NCS para obtener una concentración de 100 $\mu$ l/ml y se continuó de la misma manera hasta llegar a una concentración de 0.37  $\mu$ g/ml.

Para el resto de los ensayos, la concentración utilizada fue tomada de manera directa del Stock.

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

7500 células provenientes de cáncer cérvico uterino, fueron sembradas en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), con 100 $\mu$ l de medio RPMI al 5% de NCS, por 24hrs. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto a probar en RPMI fresco (5% de NCS) a partir de una dilución seriada (concentraciones que van desde 200 hasta 0.37  $\mu$ g/ml). El ensayo control contempló la cantidad de vehículo (disolvente) utilizada en la concentración máxima a probar. El cultivo con el compuesto se mantuvo por 24 hrs. más, dando un tiempo total de 48 hrs. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Kueng *et al*, 1989), para ello, se retiró el medio de cultivo, se dejó secar al aire. Inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA), por 15 minutos, al

cabo del tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) 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 fue solubilizado en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 %, por 20 minutos en agitación, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Imagen Tecan Spectra).

Para calcular las  $IC_{50}$ , los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dosis respuesta, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. Posteriormente se realizaron ensayos a partir de los datos obtenidos, hasta obtener el intervalo que revelara la  $IC_{50}$  observada.

#### *Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad de LDH*

7500 células provenientes de cáncer cérvico uterino fueron sembradas en placa de 96 pozos (Corning, USA), con 100 $\mu$ l de medio RPMI al 5% de suero (NCS; Gibco, USA), por 24hrs. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó  $IC_{50}$  obtenida en RPMI fresco 5% de NCS, contemplando los siguientes controles: Control basal (únicamente medio de cultivo), Control negativo (células con medio y suero al 5%), Control positivo (Tritón X-100 al 1 %,) y vehículo (Etanol) cada uno por triplicado. El cultivo se mantuvo por 24 hrs. más, dando un tiempo total de 48 hrs. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y centrifugó a 1500 rpm (conservando el sobrenadante), se transfirió 100  $\mu$ l/pozo, del sobrenadante de cada uno de los controles y del tratamiento a otra placa de 96 pozos, para adicionarle 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción (Bio Vision, California) a cada pozo e incubar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para finalmente medir la absorbancia a 490 nm usando lector de placas (Imagen Tecan Spectra). (Roche Applied Science Apoptosis).

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007. Obteniendo gráficos, que muestran el efecto citotóxico del compuesto sobre la población celular.

### *Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo*

750,000 células de CaCu fueron sembradas en cajas de plástico de 60 mm (Pirex, USA), con medio RPMI al 5% de NCS. Se dejaron 24hrs. para permitir su adherencia, posteriormente, fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> del MePTC-SO cada una de las líneas celulares. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas con Verseno, se centrifugaron y lavaron con buffer salino de fosfatos, pH =7.3 (PBS). El botón celular fue fijado y resuspendido con 1ml de una solución 1:1 metanol/PBS, pasados 20 minutos se centrifugaron y se lavaron con PBS. El botón fue resuspendido con 500 µl de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 10 µl de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l), se mezcló y se protegió de la luz. Para finalizar se analizaron las muestras en un citómetro de flujo (Coulter, USA).

### *Evaluación de la Procaspasa-3.*

2 500 células fueron sembradas en portaobjetos de teflón, en un volumen de 20 µl de RPMI al 5 % de NCS en cámara húmeda por 24hrs. Al término del tiempo, se procedió a tratar cada pozo con las IC<sub>50</sub> obtenidas para cada línea celular. A continuación, se realizó la detección de la procaspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% de PBS de 15 a 30 minutos, a temperatura ambiente al término de el tiempo se lavaron 3 veces con PBS, a continuación se permearon con Tritón X-100 0.5% durante 5 minutos a 4°C.) Nuevamente se lavaron 3 veces con PBS, después se adicionó 5µl de Anticuerpo primario policlonal de conejo anti procaspasa 3, 1:100 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA) durante un periodo de 24 hrs. en cámara húmeda, al término del tiempo, se lavaron con PBS y cubrieron con anticuerpo secundario con fluorocromo anticuerpo de cabra anti conejo con FIT-C (Invitrogen, USA), 1:200 en PBS en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, después se aplicó DAPI (Sigma-Aldrich, USA), durante 1 min. Nuevamente se lavaron las muestras con PBS. Finalmente fueron montadas las muestras con medio de montaje (Vector Laboratories, USA) y sellaron con esmalte de uñas. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de alta definición (Nakon, JAP), para su posterior análisis.

### *Evaluación de la caspasa-3 activa.*

Se sembraron 300 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas. Al término del tiempo, se procedió a tratar con las IC<sub>50</sub> obtenidas para cada línea celular. A continuación, se realizó la detección de la caspasa-3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 20 minutos, al término de el tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS y a continuación se permearon con Tritón (X-100 0.5 %) durante 5 minutos a 4 °C. Nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y sucesivamente se adicionó el Anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3, 1:100 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA) durante un periodo de 24 horas en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C (Invitrogen, USA), 1:200 en PBS en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ horas. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS, después se aplicó el un fluorocromo afín al ADN DAPI (Sigma-Aldrich, USA), durante 1 minuto. Nuevamente se lavaron las muestras con PBS. Finalmente se montaron las muestras con medio de montaje (Vector Laboratories, USA) y se sellaron con esmalte para uñas. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió tomar fotografías en un microscopio de alta definición (Nakon, JAP), para su posterior análisis.

### *Detección específica de fragmentos del ADN a través de la técnica de TUNEL.*

Fueron sembradas 300 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas, bajo las mismas condiciones que se realizó para la determinación de la caspasa-3 activa. Al término, las células fueron fijadas con paraformaldehído (al 2% en PBS). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y permearon con Tritón X-100 al 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4° C. Posteriormente fueron lavadas con PBS, y se adicionó el buffer de equilibrio en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejarlas secar. Enseguida fueron incubadas por 1 hora con enzima Tdt (1:3 enzima/buffer de reacción), en cámara húmeda. Al término del tiempo se detuvo la reacción con buffer de paro (Chemicon international, USA), (1ml de buffer de paro en 34 ml de agua Milli Q), por 10 minutos en agitación suave y en cámara

húmeda. Nuevamente se lavaron con PBS e incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon international, USA) (68  $\mu$ l de solución de bloqueo más 62  $\mu$ l de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavaron otra vez con PBS en cámara húmeda y se adicionó el fluorocromo DAPI (Sigma-Aldrich, USA) por 1 min. A continuación, fueron lavadas las muestra con PBS en cámara húmeda y montadas con medio de montaje (Vector Laboratories, USA), se sellaron con esmalte de uñas, etiquetaron y guardadas en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de alta definición (Nakon, JAP), para su posterior análisis.

#### *Análisis estadístico*

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

## RESULTADOS

### Determinación de la IC<sub>50</sub> en células CaSki y HeLa.

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un fuerte interés, sobre todo en aquellos que son de origen biológico y aquellos que son usados dentro de la medicina como tratamientos para otras enfermedades. En el caso particular del DSF y sus metabolitos, se ha reportado que han mostrado acción antiproliferativa e inductora de apoptosis sobre células cancerosas de mama, pulmón y de próstata, entre otras. Sin embargo, su empleo o aplicación se encuentra limitada debido a sus características tóxicas, generando la necesidad de desarrollar análogos que mantengan su acción biológica sin presentar dichas propiedades negativas. Al respecto, el laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM) recientemente ha sintetizado análogos sintéticos de los metabolitos del DSF, particularmente se generó el S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO), análogo del metabolito S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido (MeDTC-SO), modificando el anillo amino con la finalidad de generar mayor estabilidad en la molécula. Con la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo del MePTC-SO así como el determinar la concentración requerida del compuesto que induzca un decremento del 50 % en el número celular (IC<sub>50</sub>), cultivos de células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa y CaSki) fueron tratadas con diferentes concentraciones de MePTC-SO (Fig. 6).

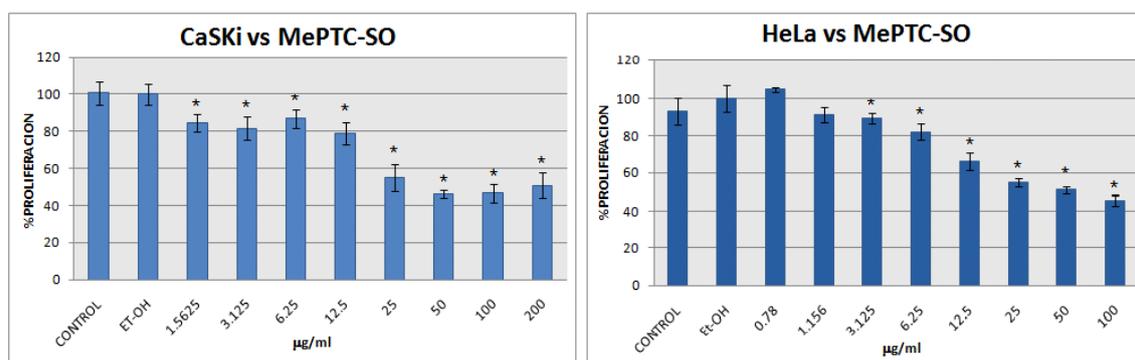


Figura 6. Curva dosis-respuesta. Efecto del MePTC-SO sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares provenientes de cáncer cervico-uterino CaSki y HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 hrs para su adherencia y tratadas con las diferentes concentraciones de MePTC-SO durante 24 hrs. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos dos ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. \* $p < 0.05$  Vs Et-OH (ANDEVA).

Los resultados obtenidos en la figura 6, indican que el efecto del MePTC-SO sobre el potencial proliferativo de las células tumorales CaSki y HeLa es dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración, la densidad celular disminuye. También se puede observar que la concentración a la cual se induce un decremento aproximado del 50 % en la densidad celular para ambas líneas celulares es de 25  $\mu\text{g/ml}$ . Con el fin de corroborar la IC<sub>50</sub> obtenida, cultivos de ambas líneas tumorales fueron tratadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  de MePTC-SO y el número celular fue determinado por la técnica de cristal violeta (Fig. 7).

### Confirmación IC 50

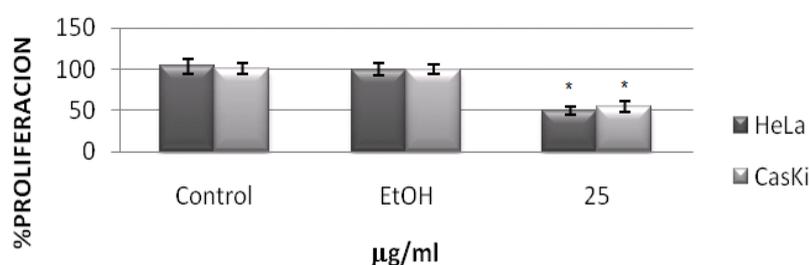


Figura 7. Confirmación de la IC<sub>50</sub> para la línea celular CaSki y HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 horas para su adherencia y tratadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  de MePTC-SO durante 24 hrs. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. \*p<0.05 Vs Et-OH (ANDEVA).

Los resultados observados en la figura 7, confirman que para ambas líneas tumorales, la IC<sub>50</sub> corresponde a 25  $\mu\text{g/ml}$  por lo que esta concentración fue utilizada para los ensayos siguientes en ambas líneas celulares.

### Efecto del MEPTC-SO sobre la morfología celular.

Para evaluar el efecto del MePTC-SO sobre la morfología celular, cultivos de células CaSki y HeLa fueron tratadas con el MePTC-SO (IC<sub>50</sub>) y al término del estímulo, los cultivos fueron observados al microscopio invertido y fotografiados con una cámara digital SONY (Fig. 8).

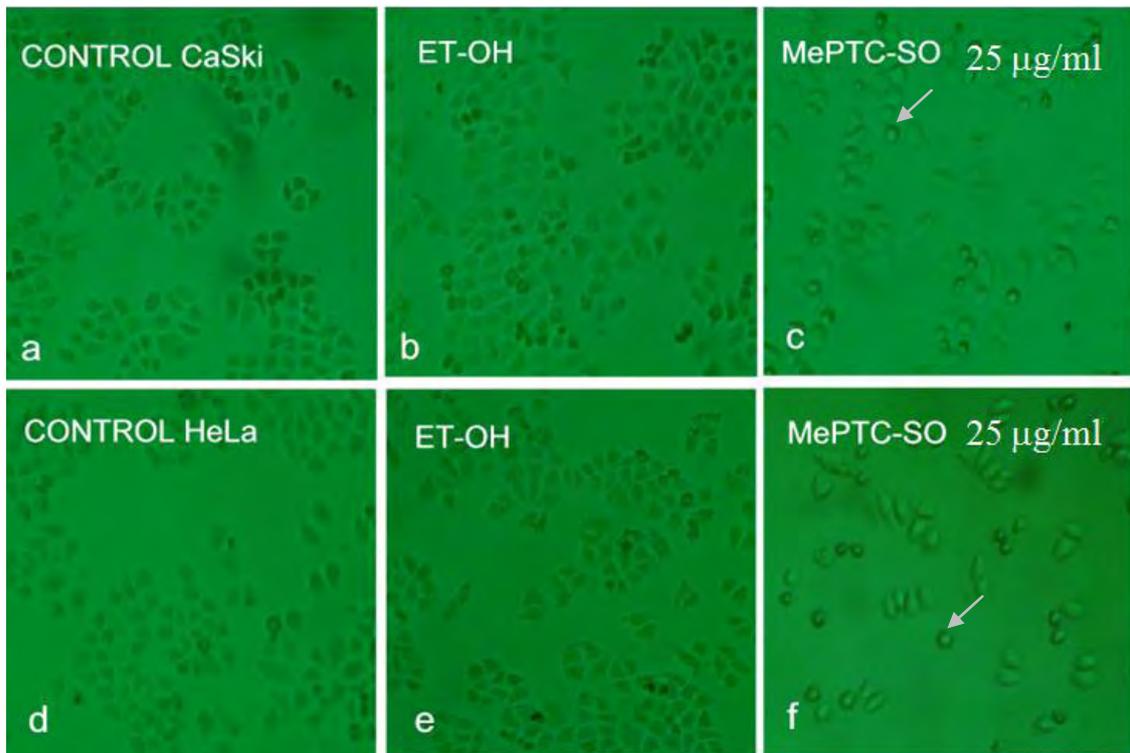


Figura 8. Efecto del MePTC-SO en la morfología celular de células CaSki y HeLa. Las células fueron cultivadas y tratadas con 25 µg/ml de MePTC-SO por 24 hrs y fotografiadas en un microscopio invertido con un aumento de 10X. La primer columna muestra a la línea celular CaSki y la segunda la línea celular HeLa (a y d son Controles; b y e son el vehículo ET-OH; c y f células tratadas con MePTC-SO). El cambio en la morfología es marcado con una flecha, en las fotografías c y f.

En las fotografías (Fig. 8 c y f), se puede observar que para ambas líneas celulares, el MePTC-SO induce un cambio en la morfología poliédrica de las células a una morfología redondeada, características de células que pierden gradualmente la adhesión al plato de cultivo; además una posible condensación de la cromatina nuclear.

### **Efecto citotóxico del MePTC-SO.**

Con la intención de determinar si el MePTC-SO presenta una actividad citotóxica sobre las células tumorales, cultivos de células HeLa fueron tratadas con 25 µg/ml de compuesto y la actividad citotóxica fue determinada mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo (Fig. 9).

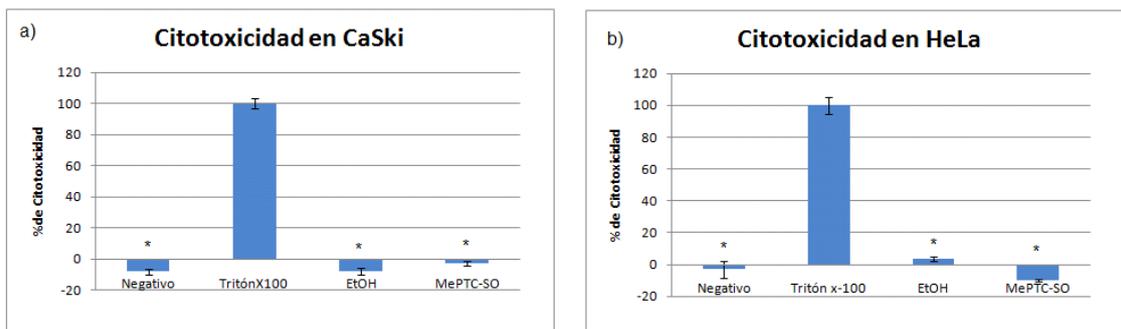


Figura 9. Determinación de la actividad citotóxica del MePTC-SO en cultivos de células HeLa. 7500 células HeLa fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. La actividad citotóxica fue determinada por LDH y expresada en porcentaje. a) muestra a la línea celular CaSki y b) la línea celular HeLa; Negativo: células sin tratamiento; Tritón: células tratadas con 1% de tritón x-100; ET-OH: células tratadas con 1 % de etanol puro; MePTC-SO: células tratadas con 25µg/ml de MePTC-SO.

Como se muestra en la figura 9, el MePTC-SO no presenta un efecto citotóxico en las células HeLa ni CaSki, indicando que este compuesto no es citotóxico ni induce a las células tumorales a una muerte por necrosis en las condiciones antes citadas, sugiriendo que el decremento en el número celular observado en los cultivos de ambas líneas tumorales es debido a un efecto del MePTC-SO sobre alguna fase del ciclo celular o a una muerte por apoptosis.

Antes de evaluar el efecto del MePTC-SO en el ciclo celular o como inductor de muerte celular por apoptosis, es necesario estimar la toxicidad de este compuesto en células no tumorales y muy en particular en células linfocíticas, ya que éstas son utilizadas como indicadores extremadamente sensitivos de cambios mutagénicos, además de representar una parte importante del cuerpo en exposición continua a los productos metabólicos vertidos en la sangre, entre otras características (Figura 9a).

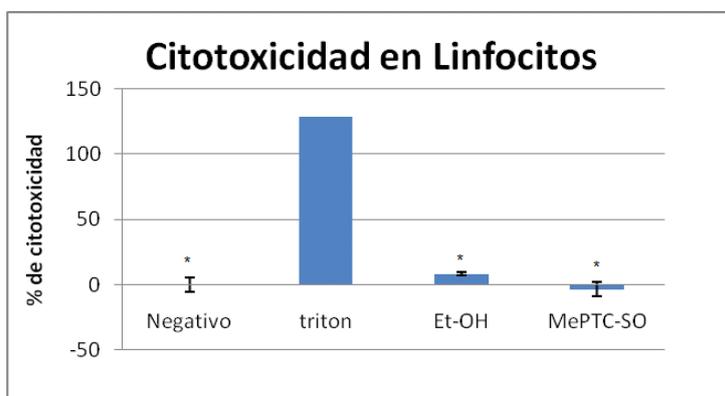


Figura 9 a. Determinación de la actividad citotóxica del MePTC-SO en cultivos de células Linfocíticas. 200000 células linfocíticas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y la actividad de la enzima LDH fue evaluada a las 72 hrs. Negativo: células sin tratamiento; Tritón: células tratadas con 1% de tritón x-100; ET-OH: células tratadas con 1 % de etanol puro;

MePTC-SO: células tratadas con 25µg/ml de MePTC-SO. La actividad citotóxica fue determinada por la actividad de la enzima LDH y expresada en porcentaje.

### Efecto del MePTC-SO en el ciclo celular.

Con la intención de precisar, sí el decremento en el número celular observado, en los cultivos de células CaSki y HeLa tratadas con MePTC-SO es debido a la detención en alguna fase del ciclo celular, cultivos de células CaSki y HeLa fueron tratadas con MePTC-SO y posteriormente la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular, fue determinada por citometría de flujo (Tabla 1, Fig. 10).

CaSki/MePTC-SO						
FASE	Control	DESVEST	ET-OH	DESVEST	MePTC-SO	DESVEST
Sub G1	4.035	1.87	3.455	1.24	5.805	3.49
G1	56.275	5.16	56.505	5.24	47.02	1.13
S	20.715	0.16	16.395	0.29	24.525	1.18
G2/M	11.595	0.55	15.54	1.36	17.21	2.21
HeLa/MEPTC-SO						
FASE	control	DESVEST	ET-OH	DESVEST	MePTC-SO	DESVEST
Sub G1	13.93	2.93	6.965	1.55	12.105	7.84
G1	57.12	5.34	54.285	2.54	48.37	1.86
S	18.13	1.65	18.73	1.61	23.12	1.12
G2/M	10.715	0.56	12.655	1.57	11.545	1.77

Tabla 1. Distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular, en cultivos de células CaSki y HeLa tratadas con y sin MePTC-SO. La tabla muestra el promedio de cuatro eventos independientes para cada línea celular expresados en porcentaje.

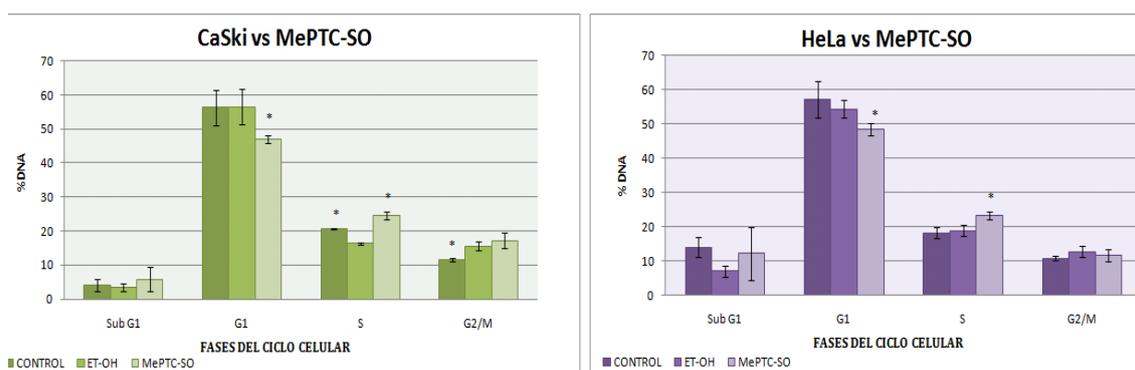


Figura 10. Efecto de MePTC-SO sobre la progresión del ciclo celular, de las líneas celulares CaSki y HeLa. 750,000 células fueron sembradas en cajas de plástico de 60 mm con medio RPMI al 5% de NCS, y tratadas con la IC<sub>50</sub> obtenida durante 24 hrs. La distribución del ADN en las fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo. La gráfica representa el promedio de cuatro eventos independientes. (\*. p<0.05 vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se muestra en la tabla 1 y figura 10, se observa en ambas líneas tumorales un decremento en el porcentaje de células que están en la fase G1 así como un incremento en las células que están en la fase S cuando son tratadas con MePTC-SO, sin embargo, en la fase G2/M no se presenta una diferencia significativa con respecto a los controles, indicando que las células son inducidas a salir de la fase G1, y ser detenidas en la fase S. Generalmente las células detienen su ciclo celular cuando existe un daño en su ADN o daño en la estructura celular, tomándose el tiempo necesario para reparar el daño o para activar la muerte celular programada (apoptosis), que elimina a la célula sin generar un estado de inflamación o de respuesta inmune.

### **Efecto apoptótico del MePTC-SO**

Una vez determinado que el efecto antiproliferativo del MePTC-SO en las células HeLa y CaSki es dependiente del ciclo, es pertinente determinar si el decremento en el número celular es debido a la inducción de una muerte apoptótica.

Un evento biológico que se da como parte de la muerte por apoptosis es la condensación de la cromatina, por lo que cultivos de células HeLa y CaSki fueron tratados con MePTC-SO (25 µg/ml) y los núcleos fueron marcados con el fluorocromo Dapi, para ser observados en un microscopio de epifluorescencia (Fig. 11).

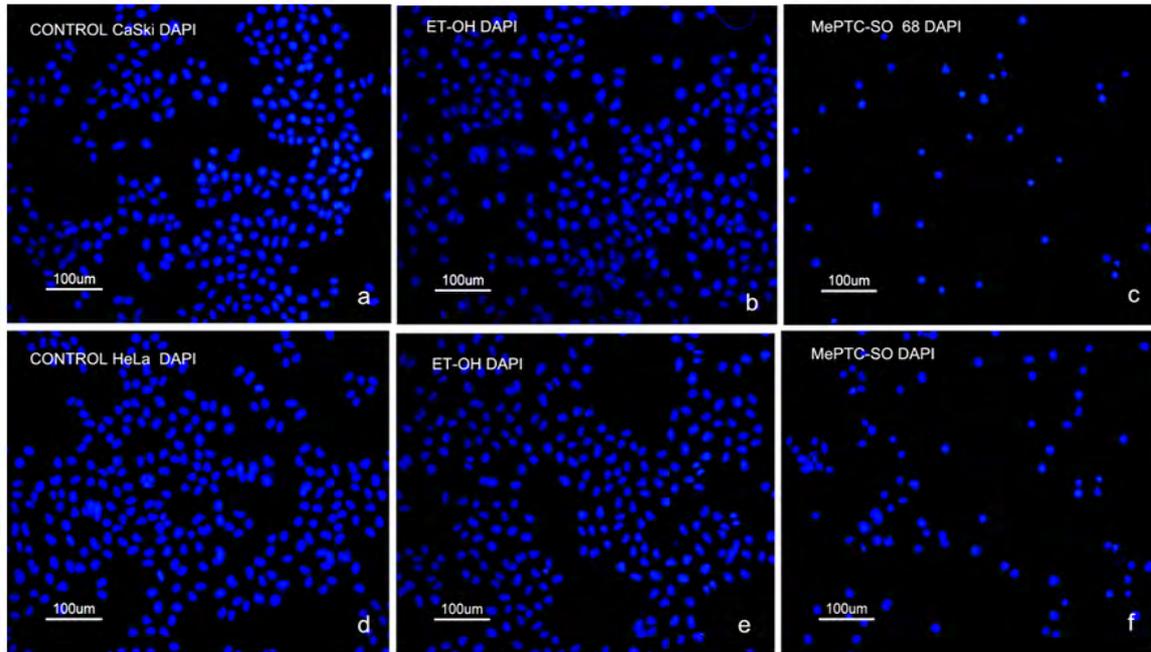


Figura 11. Inducción de la condensación de la cromatina por el MePTC-SO en cultivos de células tumorales CaSki y HeLa. Fueron sembradas 300,000 células CaSki y HeLa en cubreobjetos de 1 x 1 cm<sup>2</sup>, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5% de NCS y se trataron con la IC<sub>50</sub> (25 μg/ml) de MePTC-SO, por 25 hrs. Las fotografías muestran los núcleos en color azul (marcados con Dapi). La primer columna muestra a la línea celular CaSki y la segunda la línea celular HeLa a y d) Controles; b y e) ET-OH; c y f) MePTC-SO.

Las fotografías de los cultivos marcados con Dapi muestran un cambio en la forma y tamaño de los núcleos de las células tratadas con el compuesto MePTC-SO (25 μg/ml), observándose núcleos redondos y compactos (Fig. 11, c y f), que implican una condensación de la cromatina nuclear, indicando una probable inducción de muerte por apoptosis en las células de la línea CaSki y HeLa. No obstante estos resultados, la condensación de la cromatina no es por sí solo un indicador concluyente de la apoptosis, ya que en el proceso de muerte por necrosis, también existe una condensación de la cromatina, por lo que fue necesario realizar otras pruebas que permitieran continuar la caracterización del proceso apoptótico.

Para ello, cultivos de células CaSki y HeLa fueron tratados con MePTC-SO (25 μg/ml) y la expresión de procaspasa-3 (Fig.12 y 13) fue evaluada, ya que se conoce que esta procaspasa se incrementa cuando se activa el proceso de muerte por apoptosis.

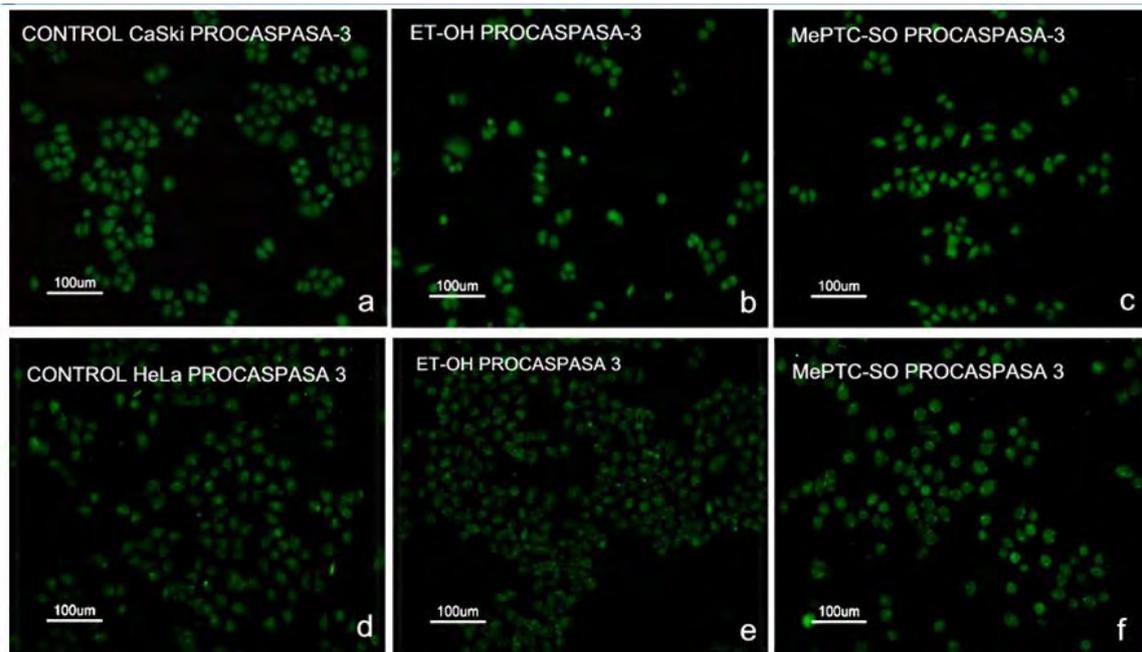


Figura 12. Determinación de la expresión de la procaspasa-3. 2,500 células CaSki y HeLa fueron sembradas en portaobjetos en pozos con 20 µl de RPMI al 10% de suero fetal bovino y se trataron con la IC<sub>50</sub> (25 µg/ml) de MePTC-SO por 25 hrs. Posteriormente las células fueron evaluadas por inmunocitoquímica. Las fotografías muestran la expresión de procaspasa-3 acoplada al fluorocromo FIT-C. La primer columna muestra a la línea celular CaSki y la segunda la línea celular HeLa a y d) Controles; b y e) ET-OH; c y f) MePTC-SO.

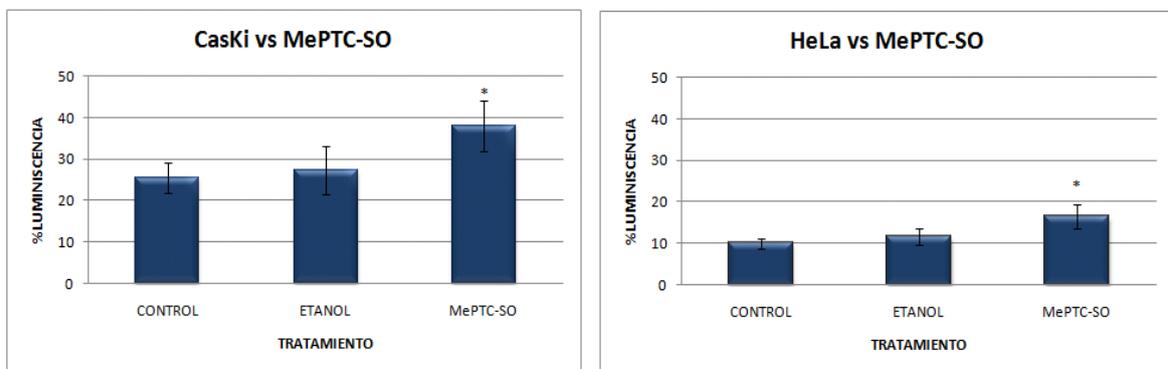


Figura 13. Las graficas muestran el analisis de la expresión de luminiscencia de las fotografías tomadas apartir del ensayo de procaspasa 3. El aumento en la luminiscencia reflejara un incremento en la expresión de procaspasa-3. (\*.  $p < 0.05$  vs ETANOL., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se muestra en la figura 12 y 13, la expresión de la procaspasa 3 se incrementó, indicando que el proceso apoptótico se ha activado. Sin embargo, se sabe que cuando el proceso apoptótico se activa, la procaspasa 3 es convertida a caspasa 3 activa, por lo que fue necesario determinar, si el MePTC-SO induce en cultivos de células tumorales CaSki y HeLa la expresión

de la caspasa 3 activa. Al respecto, cultivos de células CaSki y HeLa fueron tratados con (25 µg/ml) de MePTC-SO y la expresión de la caspasa 3 activa fue determinada (Fig. 14 y 15).

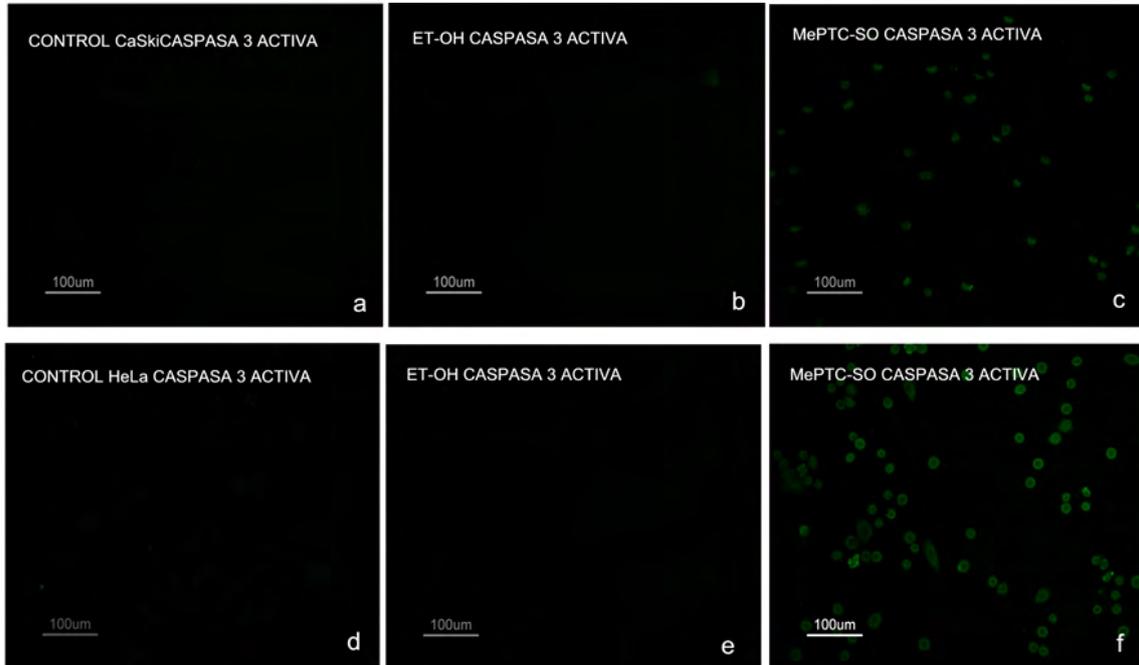


Figura 14. Determinación de la expresión de la caspasa-3 activa. Fueron sembradas 300,000 células CaSki y HeLa en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5% de NCS y se trataron con la  $IC_{50}$  (25 µg/ml) de MePTC-SO, por 25 hrs. Posteriormente las células fueron evaluadas por inmunocitoquímica. Las fotografías muestran la expresión de caspasa-3 activa acoplada al fluorocromo FIT-C. La primer columna muestra a la línea celular CaSki y la segunda la línea celular HeLa a y d) Controles; b y e) ET-OH; c y f) MePTC-SO.

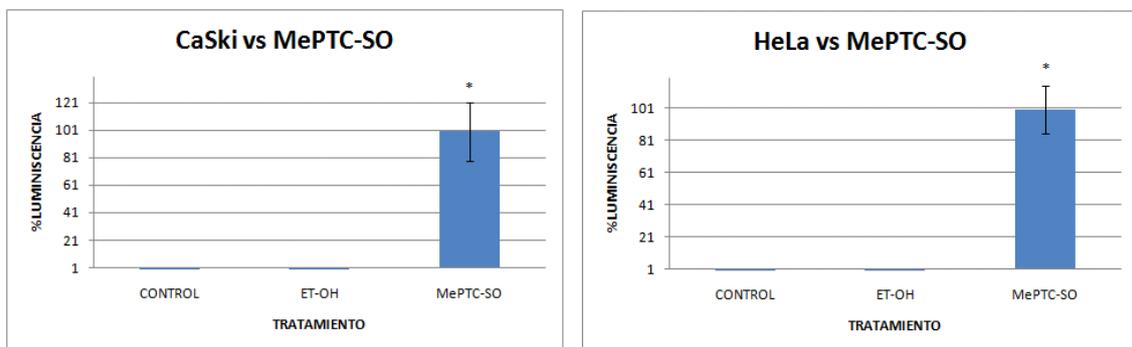


Figura 15. Las graficas muestran el analisis de la expresión de luminiscencia de las fotografías tomadas a partir del ensayo de caspasa 3 activa. El aumento en la luminiscencia reflejara un incremento en la expresión de caspasa-3 activa. (\*.  $p < 0.05$  vs ETANOL., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados indican un incremento en la expresión de la caspasa 3 en las células CaSki y HeLa tratadas con el compuesto MePTC-SO, sugiriendo que dichas células son inducidas a morir por apoptosis con la participación de la caspasa 3.

Con el fin de concluir, se evaluó la inducción de la fragmentación del ADN inducida por el MePTC-SO en las células tumorales HeLa y CaSki como un evento final y determinante de la apoptosis (Fig. 16 y 17).

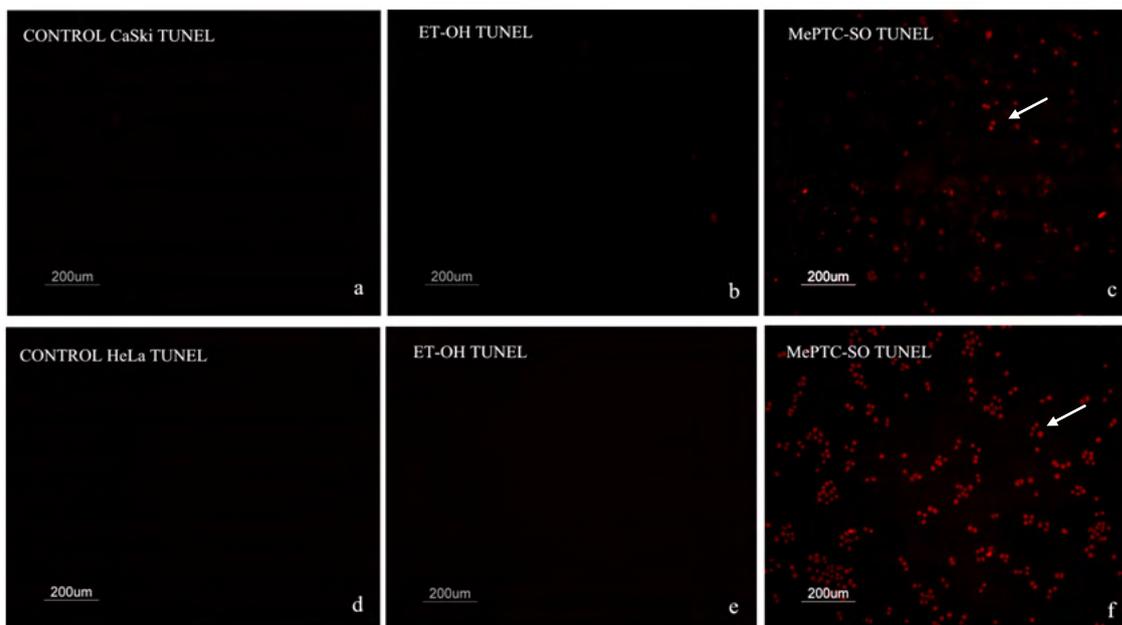


Figura 16. Fragmentación del ADN inducida por el MePTC-SO. Fueron sembradas 300,000 células CaSki y HeLa en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5% de NCS y se trataron con la  $IC_{50}$  (25  $\mu\text{g/ml}$ ) de MePTC-SO, por 25 hrs. Posteriormente las células fueron evaluadas mediante la técnica de TUNEL. La primer columna muestra a la línea celular CaSki y la segunda la línea celular HeLa a y d) Controles; b y e) ET-OH; c y f) MePTC-SO. Las flechas indican ADN fragmentado marcado con rodamina.

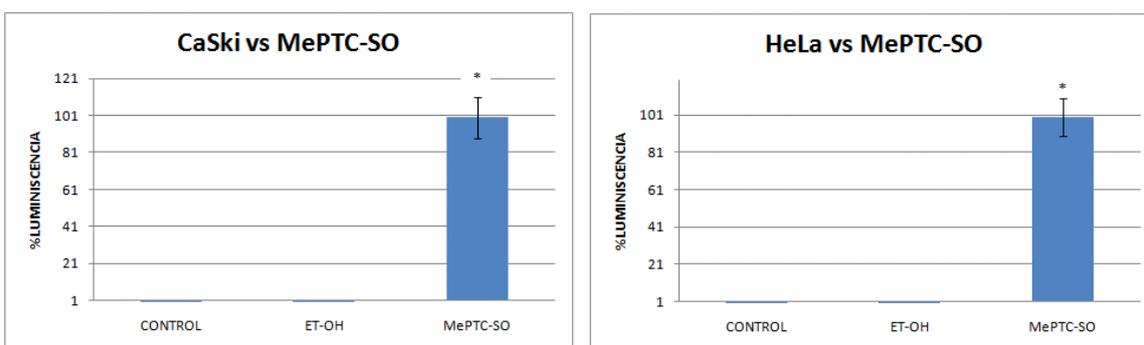


Figura 17. Las graficas muestran el analisis de la expresion de luminiscencia de las fotografias tomadas apartir del ensayo de TUNel. El aumento en la luminiscencia reflejara un incremento en la expresion de fragmentos de ADN. (\*.  $p < 0.05$  vs ETANOL., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se aprecia en la figura 16 y 17, los cultivos tratados con los compuestos MePTC-SO, presentan fragmentación de ADN (Fig. 16 c y f), confirmando que el MePTC-SO induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. Estos resultados, generan la inquietud de saber si el MePTC-SO en la concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  afectan el potencial proliferativo de células no tumorales.

### Efecto del MePTC-SO en células no tumorales.

*Células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano.*

Con el propósito de establecer si el MePTC-SO afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células fibroblásticas del cérvix humano no tumorales, fueron tratadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  de MePTC-SO y el número celular fue determinado por cristal violeta así como el efecto en la morfología celular (Fig. 18 y 19).

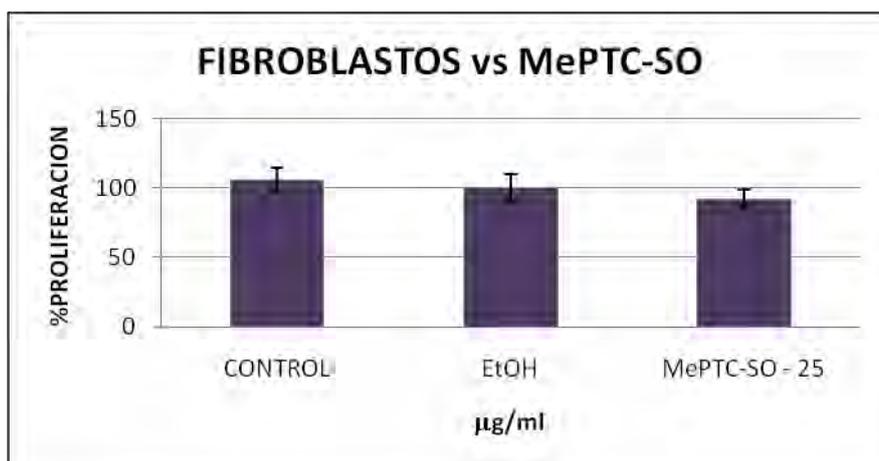


Figura 18. Efecto del MePTC-SO sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales, provenientes de cérvix humano. 7500 células fibroblásticas fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI al 10% de NCS y fueron tratadas con MePTC-SO por 24 hrs. La densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. Control, Etanol y 25  $\mu\text{g/ml}$  concentración de MePTC-SO. Los resultados de tres eventos independientes. (\*.  $p < 0.05$  vs ETANOL., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la figura 18, establecen que fibroblastos tratados con la misma concentración con la que se trató a las células tumorales (25  $\mu\text{g/ml}$  de MePTC-SO) no afectó el potencial proliferativo, sin embargo, afectó su morfología, observándose células con citoplasma retraído, acortadas y algunas con emisión de prolongaciones citoplásmicas (Fig. 19).

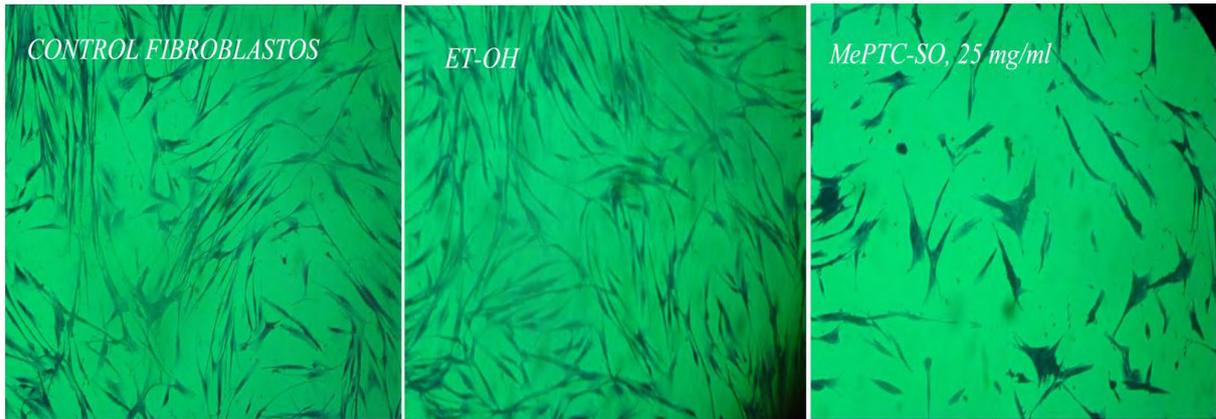


Figura 19. Efecto del MePTC-SO sobre la morfología de células fibroblásticas no tumorales, provenientes del cérvix humano. Control, Etanol y 25  $\mu$ g/ml de MePTC-SO respectivamente.

*Células linfocíticas no tumorales provenientes de sangre periférica de donadores sanos.*

Es conocido que en el tratamiento contra el cáncer, las células del sistema inmunológico son severamente afectadas, de tal forma que algunos pacientes requieren de trasplante de médula ósea. Con la intención de determinar si el MePTC-SO afecta a las células del sistema inmunológico, células linfocíticas provenientes de la sangre periférica de donadores sanos fueron tratadas con 25  $\mu$ g/ml de MePTC-SO y su potencial proliferativo fue evaluado mediante el marcaje con carboxifluoresceína, por citometría de flujo (Fig. 20).

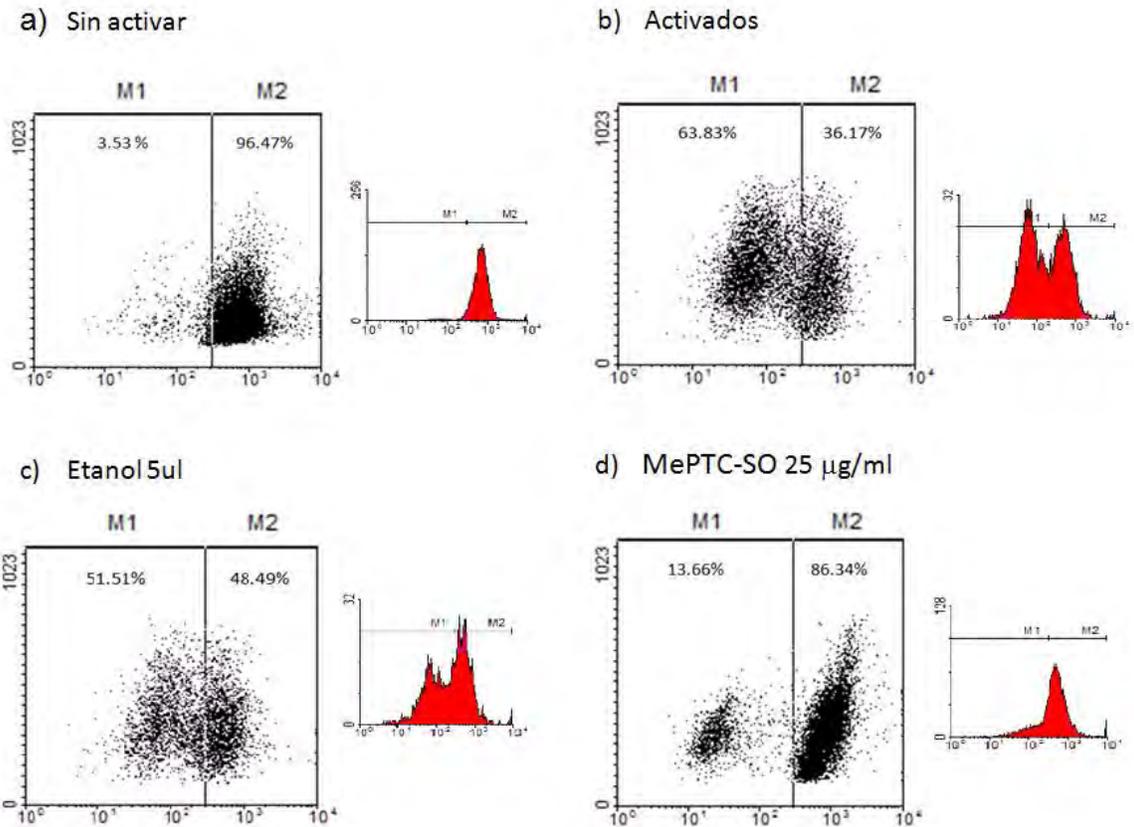


Figura 16. Efecto del MePTC-SO en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de Linfocitos fueron marcados con carboxifluoresceína y el potencial proliferativo fue evaluado con y sin el MePTC-SO. La proliferación fue medida mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y evaluada por citometría de flujo. M1: Región de células en proliferación. M2: Región de células no proliferantes. a) Linfocitos Sin activar; b) Linfocitos Activados; c) Etanol 5ul y d) MePTC-SO 25µg/ml, respectivamente.

Los resultados obtenidos en la figura 20, muestran que el MePTC-SO ( $IC_{50}$  25µg/ml) afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas, induciendo un decremento en el número de células en proliferación de un 37.85 %.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La búsqueda de compuestos de origen vegetal o animal con propiedades antitumorales a generado un fuerte interés en los últimos años, sobre todo, en aquellos que son derivados de fármacos conocidos y usados clínicamente con otros fines, a los cuales se le ha realizado modificaciones estructurales, dando origen a derivados o análogos de éstos. Investigaciones recientes acerca de los Ditiocarbamatos como el DSF y sus metabolitos, a los cuales se les ha encontrado diversas actividades biológicas, entre las que destacan la de al inhibir al proteosoma en células tumorales (Yu *et al*, 2007), inhibir el crecimiento tumoral (Chen *et al*, 2006), inhibir factores de transcripción como el NFκB (Liu *et al*, 1998), y lo más relevante, inducir una muerte por apoptosis en diferentes líneas celulares (Wickström *et al*, 2007). Además, se ha descrito que el DSF así como el Dietilditiocarbamato son capaces de formar complejos con el  $\text{Cu}^{2+}$ , incrementando su actividad inhibidora del proteosoma así como de su actividad inductora de apoptosis (Chen *et al*, 2006). Sin embargo, Zuben y colaboradores, reportan que la actividad inductora de apoptosis es realizada no por el DSF directamente, ya que éste es convertido rápidamente a Dietilditiocarbamato y éste a su vez a otros metabolitos que según este grupo son los responsables de dicha actividad (Zuben *et al*, 2005), sugiriendo que los metabolitos del DSF pueden tener un papel más significativo en estos procesos que el DSF 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.

En el caso particular del S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO), los datos obtenidos revelan que este compuesto presenta una actividad antiproliferativa sobre las células de cáncer cérvico-uterino CaSki y HeLa, a una concentración  $\text{IC}_{50}$  de  $155.2 \mu\text{M}$  ( $25 \mu\text{g/ml}$ ). Esta concentración comparada con las reportadas para otros metabolitos, resulta ser muy alta. Sin embargo, en el caso del DSF, se le ha descrito con actividad inductora de caspasa 3 y 7 en células HeLa a una concentración de  $0.4 \mu\text{M}$  y una actividad citotóxica a una concentración de  $40 \mu\text{M}$  (Wickström *et al*, 2007). También se ha descrito que el Pirrolidin Ditiocarbamato en células HL-60 presenta una actividad antiproliferativa del 40 % a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  (Della *et al*, 2000). Estos resultados muestran que el MePTC-SO conserva la actividad antiproliferativa descrita en el DSF y en el metabolito Pirrolidin Ditiocarbamato. Cabe resaltar que el MePTC-SO no presentó actividad citotóxica ni en las células tumorales ni en los linfocitos humanos, implicando que el decremento observado en el número celular (actividad antiproliferativa) no es causado por un proceso necrótico. La relevancia

de este resultado es que en la mayoría de los metabolitos analizados no se ha evaluado su actividad citotóxica, sólo existen reportes de una inducción predominante de necrosis, en timocitos de rata tratados con DSF a una concentración de 5 $\mu$ M, evaluadas por exclusión de azul tripano (Burkitt *et al*, 1998), sugiriendo que el MePTC-SO podría ser un metabolito cuya modificación estructural generó la pérdida de la actividad citotóxica a la concentración de 155.2  $\mu$ M en las células tumorales HeLa y CaSki así como en linfocitos humanos.

Con respecto al efecto en el ciclo celular, los resultados indican que el MePTC-SO induce a las células tumorales a salir de la fase G1 para detenerlas en la fase S del ciclo celular. Es conocido que las células al presentar un daño en el ADN o en su estructura son capaces de detener el ciclo, con la intención de reparar el daño. Sin embargo, cuando no es imposible de repararlo, la célula activa un mecanismo de muerte programada (apoptosis), que lleva a la célula a morir sin alterar al sistema y a ser restituida por una célula nueva. Se ha descrito que el DSF, el Dietilditiocarbamato y el metabolito Prolintiamdisulfido, detienen a la línea celular Hep G2 (Hepatoma Humano) en la fase G1/S a una concentración de 400  $\mu$ M y 800  $\mu$ M respectivamente, en un tiempo de 24 y 48h, coincidiendo con el efecto en el ciclo celular del MePTC-SO (Liu *et al*, 1998).

La sobre expresión de procaspasa-3 y caspasa-3 activa en las líneas celulares CaSki y HeLa inducida por el MePTC-SO, además de la detección de fragmentos de ADN (extremos libres 3'-OH) por TUNEL, son en conjunto de pruebas que sugieren que el MePTC-SO induce muerte por apoptosis en las líneas tumorales HeLa y CaSki, coincidiendo con lo reportado para el DSF y el Pyrrolidin Ditiocarbamato que inducen la expresión de caspasa 3 activa y la fragmentación del ADN (Wickström *et al*, 2007), implicando que la modificación estructural del MePTC-SO, conserva la actividad inductora de apoptosis.

La actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis del MePTC-SO en las células tumorales no serviría de nada si afecta a las células no tumorales, es decir si no tuviera una acción selectiva como es el caso del DSF, el cual presenta una acción antiproliferativa e inductora de apoptosis selectiva en células MDA-MB-231 (tumor de mama) induciendo a éstas a morir, mientras que en las células inmortalizadas MCF-10A en las mismas condiciones no afecta su potencial proliferativo ni las induce a una muerte por apoptosis (Chen *et al*, 2006). Sin embargo, los resultados no son concluyentes, ya que las células inmortalizadas presentan alteraciones similares a la de las células tumorales. En el caso del MePTC-SO, no afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix, mientras que afecta fuertemente el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas, implicando una acción selectiva en fibroblastos de

cérvix no tumorales, mientras que en las células linfocíticas inhibe su proliferación sin inducir su muerte, generando en este compuesto una posible actividad inmunosupresora. El hecho de que el MePTC-SO no sea citotóxico para las células linfocíticas, sugiere que este compuesto no induce en los linfocitos una muerte necrótica. Sin embargo, su acción antiproliferativa, inductora de apoptosis y selectiva hacen de este compuesto un fuerte candidato para ser evaluado en un sistema in vivo, con la intención de que en el futuro sea aplicado como un agente terapéutico.

También se busca que los compuestos sean selectivos por las células tumorales. Ante esto, se tienen reportes de trabajos con células MDA-MB-231 y MCF-10A "NORMALES" (células inmortalizadas) donde no existe diferencia en cuanto a proliferación y morfología, al tratarlas con la misma concentración (20 $\mu$ M), de DSF. Sin embargo, en células Hep G2 (Hepatoma Humano) con el mismo compuesto, el efecto es notable a una concentración de 300  $\mu$ M. De manera relevante, el MePTC-SO afecta la morfología de las células fibroblásticas no tumorales sin afectar su potencial proliferativo. Estos resultados son por tanto interesantes, dado que las líneas celulares CaSki y HeLa son líneas tumorales del cérvix infectadas con el papiloma virus humano tipo 16 y 18 respectivamente, los cuales están considerados como de alta incidencia con un 70 % aproximadamente (Muños & Bosch, 1997), mientras que las células MDA-MB-231 son células de cáncer de seno humano, ambas líneas carcinomas, y aunque es necesario probar este compuesto en más líneas tumorales de cérvix, con presencia y ausencia de HPV y de otros tipos de cáncer el resultado es alentador, ya que a la concentración (IC<sub>50</sub>) del compuesto utilizada específicamente para estas líneas tumorales, no afectó el potencial proliferativo de las células no tumorales, generando la posibilidad de que su o sus efectos secundarios sí es que los presenta, serían menores a los del DSF y otros metabolitos. Finalmente también son alentadores los resultados obtenidos con linfocitos, a pesar de establecer una disminución de la proliferación, existe un porcentaje que sigue proliferando y comparado con tratamientos donde el sistema inmune se ve abatido totalmente es un dato relevante.

Con respecto a su mecanismo de acción, sería conveniente establecer si el efecto antiproliferativo del MePTC-SO está asociado a genes, como c-myc, a proteínas reguladoras del ciclo celular como Rb o p53 entre otras, con la intención de encontrar su mecanismo de acción, que podría servir como un modelo que permita establecer puntos específicos de regulación en la división celular o en el ciclo celular, que podrían darle a este tipo de compuestos una aplicación terapéutica para enfermedades relacionadas a la división celular. Es importante

destacar que al ser la apoptosis una muerte celular silenciosa, es decir, que no provoca daño alguno dentro del organismo, abre la posibilidad de poder utilizar al MePTC-SO en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, específicamente del cáncer cervicouterino, ya que actúa selectivamente.

Por otro lado ensayos con DSF y sus metabolitos, en la misma línea, en fibroblastos y linfocitos permitiría comparar su efecto con el análogo *S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido* (MePTC-SO) y así aprobar o descartar la hipótesis generada, no obstante faltan estos resultados así como varios estudios in vivo que puedan apoyar el uso o administración sobre humanos.

## CONCLUSIONES

- MePTC-SO presenta una IC50 de 25  $\mu\text{g/ml}$  en las líneas de CaCu CaSki y HeLa.
- El compuesto MePTC-SO no presenta un efecto citotóxico en células tumorales.
- Los resultados sugieren que el MePTC-SO afecta el ciclo celular de las células CaSki y HeLa en la fase G1, observándose un decremento en ambas líneas y un incremento en la fase S, indicando que las células son inducidas a salir de la fase G1 y detenerse en la fase S.
- El incremento en la expresión de pro-caspasa 3 así como de la caspasa 3 activa, indica la activación de muerte por apoptosis mediada por esta vía.
- El MePTC-SO induce la fragmentación del ADN mostrando la culminación del proceso apoptótico.
- El MePTC-SO a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  no afecta la proliferación de fibroblastos de cérvix humano no tumorales.
- El MePTC-SO a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  reduce la proliferación de linfocitos en un 26.5% respecto al etanol, sin inducir su muerte por citotoxicidad.

## ABREVIATURAS USADAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
Apaf-1	(del inglés) Apoptosis protease-activating factor-1
Bax	(del inglés) Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	(del inglés) B cell leukemia 2
Bim	(del inglés) BCL-2-interacting mediator of cell death
Bin	(del inglés) BCL-2 interacting domain
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
Cdk	(del inglés) Cyclin-dependent kinases
CIP	(del inglés) Cdk-interacting protein
DAPI	(del inglés) 4',6-diamidino-2-phenylindole
FADD	(del inglés) Fas-associated protein with death domain
FasL	(del inglés) Fas ligand
Fit-C	(del inglés) Fluorescein isothiocyanate
FLIP	(del inglés) FLICE-like inhibitor protein
IAPs	(del inglés) Inhibitors of apoptosis
IC <sub>50</sub>	(del inglés) Inhibitor concentration (50%)
KIP	(del inglés) Kinase inhibitor protein
PBS	(del inglés) Phosphate buffered saline
Puma	(del inglés) p53 up-regulated modulator of apoptosis
RPMI	(del inglés) Roswell park memorial institute
SFB	Suero fetal bobino

Tdt	Deoxinucleotidil transferasa
TNF	(del inglés) Tumor necrosis factor
TRAIL	(del inglés) TNF-related apoptosis-inducing ligand
VPH	Virus del papiloma humano

## APÉNDICE

### Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

Nitrato de calcio tetrahidratado	0.100000
Sulfato de magnesio anhídrido	0.048840
Cloruro de sodio	6000000
Fosfato dibásico de sodio anhidro	0.800000

#### *Aminoácidos*

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000
L-cisteina 2HCL	0.065200
L-ácido glutâmico	0.020000
L-glutamina	0.300000
Glicina	0.100000
L-histidina	0.015000

L-hidroxiprolina	0.020000
L-isoleucina	0.050000
L-leucina	0.050000
L-lisina HCL	0.040000
L-metionina	0.015000
L-fenilalanina	0.015000
L-prolina	0.020000
L-serina	0.030000
L-treonina	0.020000
L-triptofano	0.005000
L-tirosina	0.028830
L-valina	0.020000
<i>Vitaminas</i>	
D-biotina	0.000200
Cloruro de colina	0.003000
Ácido fólico	0.001000
Myo-inostil	0.035000
Niacinamida	0.001000
Ácido-p-Amino Benzoico	0.001000
Ácido – D- pantoténico	0.000250
Piridoxina HCL	0.001000
Riboflavina	0.000200
Tianoma HCL	0.001000
Vitamina B-12	0.000005

**Verseno**

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

Tris base	3.04 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (sigma chemical.U.S.A)
Cloruro de potasio	0.04 g (sigma chemical U.S.A)
Etilen – diamen- tetra- acético (EDTA)	0.40 g (sigma chemical U.S.A)

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

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

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

Cloruro de magnesio	0.10 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (sigma chemical U.S.A)
Fosfato mono ácido de sodio	2.16 g (sigma chemical U.S.A)
Fosfato di ácido de potasio	0.20 g (sigma chemical USA)

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

### **Colorante Cristal Violeta**

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g. de NaOH y 4.28 ml. de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se usa.

### **Desactivación del suero**

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml. para su mejor uso y manipulación.

### **Glutaraldehído**

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

### **Solución de ácido acético (10 %)**

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

### **Paraformaldehído (2%)**

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

## Enzima Tdt

33µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción.

## Catalizador liofilizado

1 vial y solución colorante 45 ml.

Reconstituir el catalizador en 1 ml de H<sub>2</sub>O mili Q estéril por 10 min y mezclar completamente. Esta solución es estable varias semanas a 4 °C.

Descongelar la solución colorante, ésta es estable a 4 °C varias semanas. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Preparación de la mezcla de reacción (Bio Vision, California): Para 100 ensayos mezclar 250 µl de la solución del catalizador con 11.25 ml de la solución colorante. Esta mezcla deberá prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.

Tabla 2. Condiciones del ensayo de linfocitos con Carboxifluoresceina.

Columna	CSFE	PHA	
1	-	-	Control negativo
2	-	+	Activados sin carboxifluoresceina
3	+	-	Sin activar con carboxifluoresceina
4	+	+	Activados con carboxifluoresceina
5	+		Tratamiento
6	+		Vehículo

## REFERENCIAS

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Raberts K. & Watson J. (2004). *Molecular Biology of the Cell*. New York, Estados Unidos: Garland.
2. Alonso de Ruiz Patricia. (2000). *Cáncer Cervicouterino diagnostico prevención y control*. México D.F., México: UNAM Facultad de Medicina.
3. Burkitt M. J., Bishop H. S., Milne L., Tsang S. Y., Provan G. J., Nobel C. S., Orrenius S. & Slater A. F. (1998). Dithiocarbamate Toxicity to ward Thymocytes Involves Their Copper-Catalyzed Conversion to Thiuram Disulfides, Which Oxidize Glutathione in a Redox Cycle without the Release of Reactive Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353, 73–84.
4. Caballero B. A. & Morán A. j. (2002). Mecanismos Moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular. UNAM.*, 21(4), 235-244.
5. Cen D., González I. R., Buckmeier A. J., Kahlon S. R., Tohidian B. N., & Meyskens L. F. (2002). Disulfiram Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells: A Redox-related Process. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 197–204.
6. Chen D., Cui Q. C., Yang H. & Dou P. (2006). Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and Xenografts via inhibition of the Proteosome Activity. *Cancer Research*, 66, 10425-10433.
7. Cobby J., Mayersohn M. & Selliah S. (1997). The rapid reduction of Disulfiram in blood and plasma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002(3), 724-731.
8. Della R. F., Cucciolla V., Borriello A., Della P. V., Manna C., Galletti P. & Zappia V. (2000). Pyrrolidine Dithiocarbamate Induces Apoptosis by a Cytochrome c-Dependent Mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, 942-946.
9. De Toro Gonzalo. (2006). Muerte celular programada revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica* , chile <http://conganat.cs.urjc.es>
10. Díaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S. & Stutzin A. (2005). Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1449–1456.
11. Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *The biochemical Society*, 110, 525-541.
12. Dubin M. & Stoppani A. (2000). Muerte Celular Programada y Apoptosis Función de las Mitocondrias. *Medicina*, 60(3), 375-386.

13. Elinos B. C. M., Maldonado V., Meléndez Z. J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*, 139(5), 493-499.
14. Fan Ting-Jun, Han Li-Hui, Cong Ri-Shan, & Liang J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727.
15. Fink S. y T. Cookson. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 4, 1907–1916.
16. Garrett M. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81, 515-522.
17. Gasión B. J. P., Pontones M. J.L., Vera D. C.D., Jiménez C. J.F. & Ozonas M. M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas.*, 29 (9), 846-859.
18. Goldwein W. J. & Vachani C. (2006). Quimioterapia: Los Fundamentos. The Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania. <http://es.oncolink.org/treatment/article.cfm?c=2&s=9&id=319&p=3>
19. Hazzard R. W. (2005). Principles of geriatric medicine and gerontology (4ta Ed.) Mc Graw Hill.
20. Hernández M. M. & Ríos H. M. A. (1999). Oncogenes y Cáncer. *Rev Cubana Oncol*, 15 (2), 131-139.
21. Hernández V. J. M. V. (2004). Determinación de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y la de su derivado 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico-uterino HPV-18: CaLo, HeLa e InBl. Trabajo de grado, Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
22. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2007). Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer: datos nacionales. México DF. Consultada el 12 de abril de 2008.
23. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2008). Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer: datos nacionales. México DF. Consultada el 12 de abril de 2009. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>
24. Jiménez G. L. F. & Merchant L. H. (2003). Biología Celular y Molecular. México D.F. México: Pearson Educación.
25. Karp Gerald. (2006). Biología Celular y Molecular. México D.F. México: Mc Graw-Hill.
26. Jin Z. & El-Deiry W. S. (2005). Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy Landes Bioscience*, 4(2), 139-163.

27. Kueng, W., Silver E. & Eppenberg V. (1989). Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*, 186, 16-19.
28. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abram J., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., El-Deiry WS., Golstein P., Green DR., Hengartner M., Knight RA., Kumar S., Lipton SA., Malorni W., Nuñez G., Peter ME., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. & Melino G. (2008). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 1–9.
29. Lewis M. (2004). Análisis de la Situación del cáncer cérvico-Uterino en América Latina y el Caribe. Washington, Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud.
30. Liu G. Y., Frank N., Bartsch H. & Lin J. K. (1998). Induction of Apoptosis by Thiuramdisulfides, the Reactive Metabolites of Dithiocarbamates, through Coordinative Modulation of NF $\kappa$ B, c-fos/c-jun, and p 53 Proteins. *Molecular Carcinogenesis*, 22, 235-246.
31. López O. M. (2009). Síntesis de algunos Sulfóxidos y Sulfonas como potenciales inhibidores de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Trabajo de grado, Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
32. Lowy D. R & Schiller J. T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*, 116(5), 1167-73.
33. Luque J. & Herráez A. (2001). Biología Molecular e Ingeniería Genética Conceptos, Técnicas y A aplicaciones en Ciencias de la salud. Madrid, España: Harcourt.
34. Massagué J. (2009). Evolución y metástasis del cáncer. *Dossier Científico SEBBM* 160, 22-25.
35. Mathews, C. K. & K. E. Van Holde. (1998). Bioquímica. España. McGraw-Hill.
36. Morgan S. & C. Darling. (1995). Cultivo de células animales. Zaragoza, España: Acribia.
37. Paniagua Ricardo. (2007). Biología celular. (3ra Ed.). Madrid, España: McGRAW-HILL.
38. Pardo F. (1998). Anatomía patología general y especial de las neoplasias. España: Científico-Médico.
39. Peralta O., Bahena M., Díaz C. & V. Madrid. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública México*, 39, 451-452.
40. Phillip W. L. (2009). [Internet Mental Health. www.mentalhealth.com](http://www.mentalhealth.com)
41. Pollard, Thomas D. & Earnshaw William C. (2004). Cell Biology. Philadelphia, Estados Unidos: Elsevier.

42. Quisehuatl Tepexicuapan Eliceo. (2009). Efecto antitumoral de los análogos de la Capsaicina: 12-Fenil-acetil-rinvanil (12-FAR) y Rinvanil en la línea celular HeLa proveniente de cáncer cérvico-uterino. Trabajo de grado, Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
43. Rivera Z. R., Delgado D J., Painel P V., Barrero P. R., Larraín H A. (2006). Mecanismo de Infección y Transformación Neoplásica producido por el Virus Papiloma Humano en Epitelio Cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 71(2), 135-140.
44. Rodríguez M. J. J. (1995). Genotoxicidad inducida in vitro por sales de Vanadio en Cromosomas de Linfocitos Humanos. Trabajo de grado, Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
45. Roche Applied Science Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation 3rd edition. <http://www.roche-applied-science/apoptosis>.
46. Sánchez S. V. (2001). Mecanismos Reguladores de la Muerte Celular no Necrótica. *Rev Cubana Invest Biomed*, 20(4), 266-74.
47. Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. & G. Borges. (2005). Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública México*, 47, 342-350.
48. Van C., S & Van D. B. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, 31(4), 214-23.
49. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR. (2006). Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*.
50. Wickström M., Danielsson K., Rickardson L., Gullbo J., Nygren P., Isaksson A., Larsson R. & Löuborg H. (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*, 71, 25-33.
51. Yakisich J. Sebastian, Sidén Ake, Eneroth Peter & Cruz Mabel. (2001). Disulfiram is a Potent in Vitro Inhibitor of DNA Topoisomerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 586-590.
52. Yu Zhiyong, Wang Fei, Malawi Vesna, Li Xiaofeng, Cuj Qiuzhi Cindy, Zhang Bin, Yan Bing & Dou Q. Ping. (2007). Evaluation of copper-dependent proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities of novel pyrrolidine dithiocarbamate analogue. *International Journal of Molecular Medicine*, 20, 919-925.
53. Zaldívar-Machorro V. J., Demare P., Ramírez M. R., Regla I. & Muñoz C. R.A. (2006). Inhibitory Effects of Disulfiram and Its Metabolites on *Pseudomonas aeruginosa* Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Growth. México D. F., México: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

54. Zuben E. S., Suneet S. & Suresh V. A. (2005). Disulfiram and old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Molecular Biosystems*, 1, 127-134.