



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
Carrera de Biólogo

**Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de
apoptosis del Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC)
en líneas celulares de cáncer cérvico uterino**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
Viridiana Carolina Hernández Cruz

Director de tesis: Dra. Luisa Escobar Sánchez

Laboratorio de microscopía electrónica, Facultad de ciencias.

Asesor Interno: M en C. Luis Sánchez Sánchez

Laboratorio de biología molecular del cáncer, UMIEZ.



México D.F. 2013.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **HERNÁNDEZ CRUZ VIRIDIANA CAROLINA**, con número de cuenta **409022803**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **27** del mes de **agosto** de 2013 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

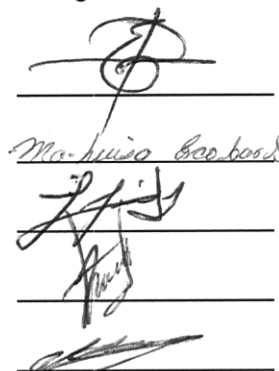
PRESIDENTE DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

VOCAL DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ*

SECRETARIO M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

SUPLENTE DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ



El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 16 de mayo de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

**ZARAGOZA
DIRECCION**

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

Dedicatorias

A mis padres

Por su amor, su sacrificio, su ejemplo de superación incansable; que me han guiado para obtener el éxito gracias a su apoyo y dedicación; porque siempre confiaron en mí, me dieron las armas necesarias para poder vencer cualquier obstáculo, inculcándome valentía, perseverancia y honestidad. Este no es solo mi triunfo, es una meta que cumplimos juntos. A ustedes les debo todos mis logros, a quienes no podré pagar todos sus desvelos ni aún con las más grandes de las riquezas.

A mis hermanos

Por su amistad incomprensida, por desarrollar en mí la paciencia que es requerida. Ya les llegará su turno y podremos disfrutar todo lo que hemos sembrado.

“Nunca consideren al estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello mundo del saber” (Albert Einstein).

A mis amigos

A Yuritzzy, Ivonne, Ruth, Mauricio, Ana, Diego, Rogelio, Giovanni, Oscar, Flor, Megumi, Martín, Héctor; mis compañeros de laboratorio, Claudia, José, Moisés, Javier, Elena y los que se me lleguen a olvidar. Por estar presentes en todos aquellos momentos importantes, los proyectos, las fiestas, reuniones y paseos; que hicieron de mi estancia en la Facultad inolvidable.

Agradecimientos

A la Dra. María Luisa Escobar, por aportar su conocimiento, dedicación y paciencia para la realización de este proyecto.

Al M. en C. Luis Sánchez, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, proporcionarme los recursos para consumir un peldaño más en la escalera de mi formación académica y profesional; depositando su paciencia, confianza y sus enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio.

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

Al Biól. Vicente Misael Hernández, por compartir su conocimiento, tiempo y experiencias; pues su colaboración fue fundamental en este trabajo; ya que sus cuestionamientos me incitaron a seguir buscando respuestas.

Al Dr. Hugo López, por compartir su conocimiento y profesionalismo, que me permitieron perfeccionar mi trabajo y dedicación, acrecentando mi deseo de seguir preparándome sin importar los obstáculos.

A los miembros del jurado:

- Dr. Edelmiro Santiago Osorio
- Dra. María Luisa Escobar Sánchez
- M. en C. Luis Sánchez Sánchez
- Biól. Reynalda Roldán Pérez
- Dr. Hugo López Muñoz

Por apoyarme con sus aportaciones y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo, permitiéndome concluirlo satisfactoriamente.

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

La tesis fue realizada con apoyo del PAPIME: PE 206812.

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y ser ignorante” (Miguel de Unamuno).

Índice

Resumen	1
Marco teórico	2
La célula	2
Ciclo celular	2
Muerte celular	4
Cáncer	10
Cáncer cérvico uterino	12
Diagnóstico y tratamiento del CaCU	17
Disulfiram y sus metabolitos	20
Planteamiento del problema	25
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Método	29
Cultivo de células tumorales	29
Obtención de células no tumorales (linfocitos)	29
Procesamiento y obtención de células de cérvix humano (fibroblastos)	30
Preparación del DDTC	30
Determinación de la proliferación celular a través de la técnica del colorante cristal violeta para células tumorales: HeLa, CaSki y ViBo y células no tumorales: fibroblastos	31
Proliferación de linfocitos humanos con Carboxifluoresceína (CSFE)	32
Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad de LDH	33
Incorporación de Ioduro de propidio	34
Morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por microscopía con tinción con DAPI	34
Expresión de caspasa-3 activa en las líneas tumorales mediante la técnica de citometría de flujo	35
Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	35
Resultados	36
Discusión de resultados	55
Conclusiones	59
Bibliografía y referencias	60
Apéndice	70

Resumen

La organización mundial de la salud (OMS) establece al cáncer como una de las principales causas de muerte en todo el mundo; entre los más incidentes se encuentra el cáncer cérvico uterino (CaCU), ocupando el segundo lugar en la población femenina, por lo que es considerado un problema de salud grave. Actualmente, se cuenta con diferentes alternativas terapéuticas utilizadas para su tratamiento (cirugía, radio y quimioterapia); sin embargo, son poco selectivas, ineficientes en estados avanzados y provocan efectos secundarios graves, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, existe un fuerte interés en evaluar la actividad antitumoral en fármacos conocidos, entre éstos se encuentran los Ditiocarbamatos, utilizados clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y en el tratamiento de adicciones (abuso del alcohol y cocaína). Sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido y los reportes en relación al CaCU y células no tumorales no es claro. Al respecto, en el presente trabajo se evaluó el efecto antitumoral del Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) en células de CaCU (HeLa, CaSki y ViBo), así como en células no tumorales. Nuestros resultados indican que el DDTC afectó el potencial proliferativo de las células tumorales de una manera dependiente de la dosis, con una CI_{50} de 95, 35 y 200 $\mu\text{g/ml}$ para células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Su efecto en la morfología fue evidenciado por la reducción del citoplasma y núcleo, sugiriendo características apoptóticas. Las evaluaciones para mostrar necrosis indican una baja detección de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de los cultivos tratados, así como la baja incorporación del ioduro de propidio (IP), sugiriendo que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. Los niveles detectados de la proteína proapoptótica caspasa-3 activa presenta variación de acuerdo al tipo celular, para CaSki 15.6 %, HeLa 9.6 % y ViBo 3.5 %. En cuanto a las células linfocíticas el DDTC afectó su potencial proliferativo cerca de un 80 % a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$; mientras en células fibroblásticas de cérvix humano fue abatido en un 50 % a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. No obstante el efecto antiproliferativo del DDTC en células no tumorales, no presentó actividad citotóxica (necrótica) en células linfocíticas ni fibroblásticas, indicando que la actividad antiproliferativa y citotóxica del DDTC no induce a una muerte necrótica en ningún tipo celular.

Marco teórico

La célula

Matthias Jacob Schleiden y Theodor Schwann propusieron el concepto de teoría celular (Pierce, 2010). De acuerdo con esta teoría, todas las criaturas vivas están formadas por células, y surgen sólo a partir de células preexistentes; siendo la unidad viva anatómica, funcional, de origen y de herencia más pequeña de los seres vivos (Gal *et al.*, 2007). Las células están constituidas por pequeños compartimentos separados del entorno externo, rodeados de membrana y llenos de una solución acuosa concentrada de compuestos químicos (Gal *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008). En su interior se producen numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, reproducirse por división, producir energía para sus actividades, ocuparse de actividades mecánicas, reaccionar a estímulos y eliminar residuos. El conjunto de estas acciones se llama metabolismo (Karp, 2011).

Todos los seres vivos tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones (Ramírez y González, 2003). Para un organismo pluricelular, innumerables divisiones de un cigoto producen un organismo de complejidad y organización celular impresionantes (Karp, 2011). Las células se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular, en el cual la célula aumenta su tamaño, acrecienta el número de componentes intracelulares (proteínas y orgánulos), duplica su material genético y finalmente se divide (Alberts *et al.*, 2008); dando paso a un proceso denominado proliferación, el cual está definido como el incremento del número de células como resultado del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte (Sánchez, 2001).

Ciclo celular

Desde el punto de vista metabólico, el ciclo celular es definido como el intervalo existente entre dos divisiones mitóticas sucesivas (Kierszenbaum y Tres, 2011); es decir, los estadios por los que pasa una célula de una división a la siguiente (Pierce, 2010). Este ciclo está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre (Lodish *et al.*, 2005). Además, la división debe estar

finamente regulada y coordinada con el crecimiento celular a través de los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular y con la replicación del ADN (ácido desoxirribonucleico), para asegurar la formación de una progenie de células que contengan genomas completos (figura 1). En la mayoría de las células, consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular (Cooper y Hausman, 2009).

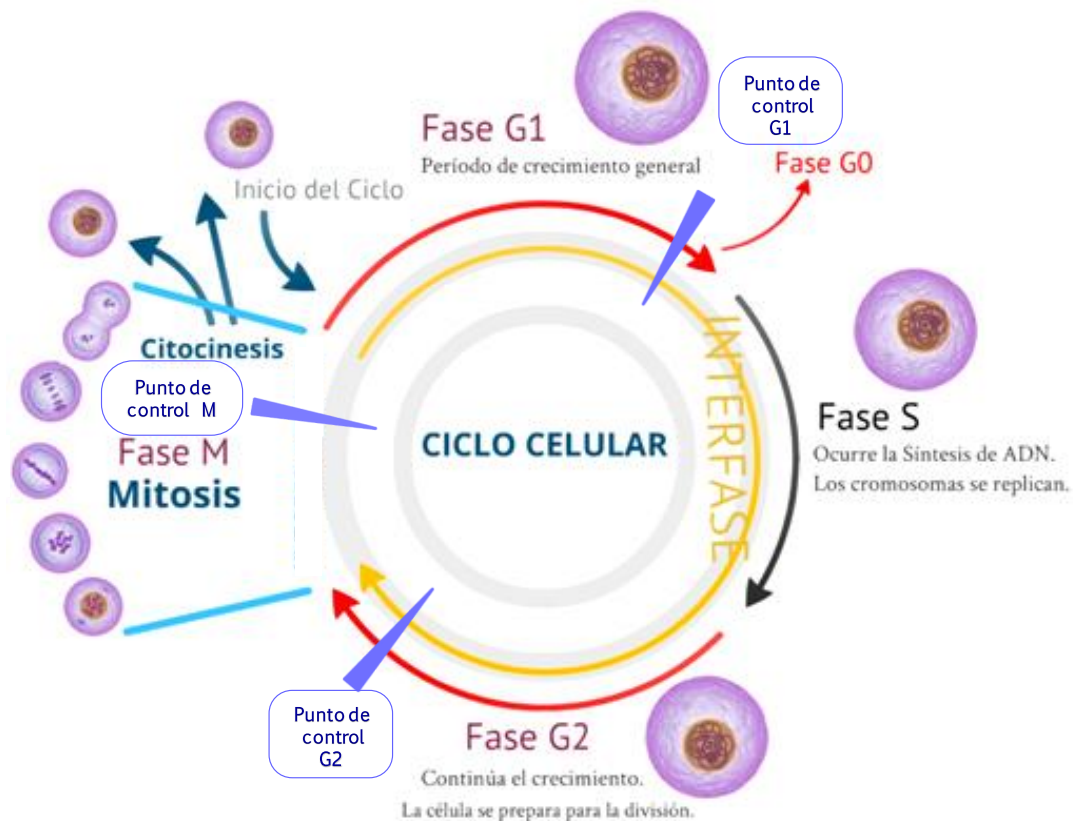


Figura 1. El ciclo celular y sus puntos de control. En una célula en proceso de división, la fase mitótica (M) se alterna con la interfase o periodo de crecimiento. La primera parte de la interfase, llamada G1, siguiendo la fase S, la última parte de la interfase se llama G2. En la fase M, se divide el núcleo y los cromosomas son distribuidos de manera equilibrada, y la citocinesis divide el citoplasma para producir dos células hijas. Los puntos de control se encuentran en las fases G1, G2 y M. Tomado y modificado de <http://www.acercaciencia.com/2012/10/15/ciclo-celular/>.

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular (Cooper y Hausman, 2009). El sistema de control celular es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos que duplican y dividen los contenidos de la célula (Alberts

et al., 2008). La progresión a través del ciclo celular es regulada en puntos de transición clave llamados puntos de control (figura 1); los cuales, aseguran que todos los componentes estén presentes y en el orden adecuado antes de que la célula proceda a la siguiente etapa; siendo necesarios para evitar que proliferen las células con cromosomas faltantes o dañados. Las alteraciones a los puntos de control pueden conducir a una división celular desregulada, como se observa en algunos tipos de cáncer (Campbell y Reece, 2007; Pierce, 2010).

Muerte celular

El número de células que componen un tejido en un organismo permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura la homeostasis, manteniéndose un balance adecuado entre la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la territorialidad (Lizarbe, 2007). La pérdida de la homeostasis le confiere a las células la capacidad de invadir territorios vecinos o colonizar tejidos distantes (Hubbard *et al.*, 2012). Para regular el número de células predeterminado de los organismos multicelulares se llevan a cabo dos procesos principales: a) la multiplicación celular (antes descrita) y b) la muerte o eliminación de un número igual de células (Dubin y Stoppani, 2000). Por lo cual, la muerte celular programada o apoptosis, es un hecho normal en el que una secuencia organizada de fenómenos conduce a la muerte de la célula (Karp, 2011).

Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo los más importantes la necrosis y la apoptosis (figura 2), estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica; siendo la apoptosis la de mayor relevancia por ser un proceso natural a diferencia de la necrosis (Dubin y Stoppani, 2000; Pierce, 2010).

Necrosis

Durante la necrosis, las células mueren en respuesta al daño tisular y exhiben cambios morfológicos característicos. Típicamente, las células que atraviesan este proceso se dilatan, estallan y liberan sus contenidos intracelulares, que pueden dañar a las células circundantes y suelen causar inflamación (Lodish *et al.*, 2005).

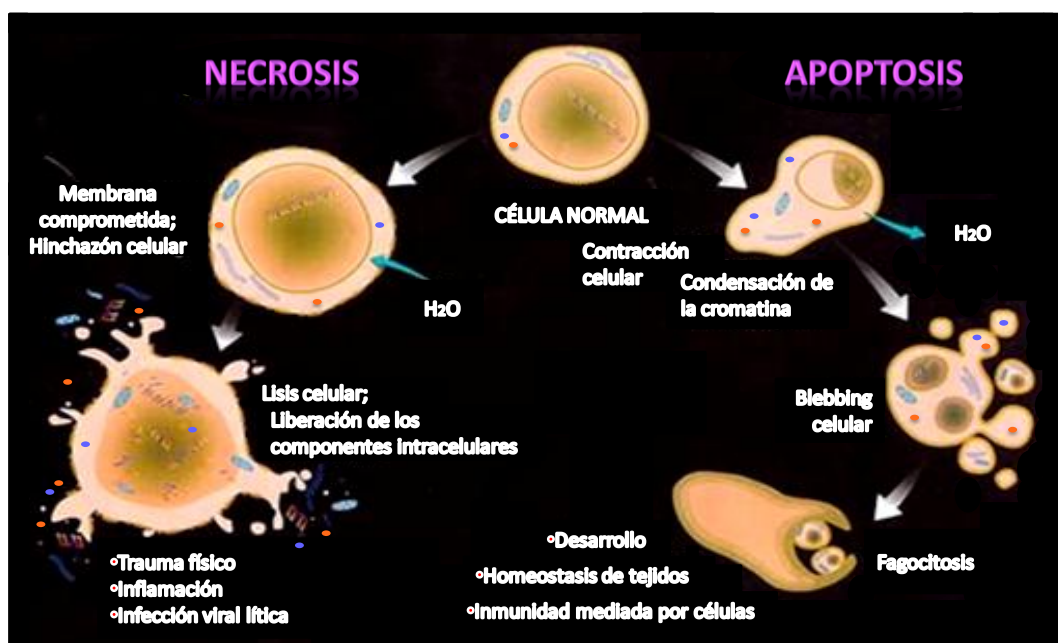


Figura 2. Necrosis y apoptosis. Comparación del proceso necrótico y apoptótico con sus efectos a nivel tisular. Tomado y modificado de <http://medicinembbs.blogspot.mx/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>.

En este proceso, la permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior de la célula (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 (por sus siglas en inglés, *Adenosine TriPhosphate*), 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. Seguidamente, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior; provocando una respuesta inflamatoria. Finalmente las células fagocíticas degradan los restos (Paniagua, 2007).

La rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular, permite que sean liberados al exterior diferentes compuestos intracelulares fuera de la célula (Lizarbe, 2007). Así, la muerte celular necrótica se puede medir mediante la monitorización de la concentración de estos compuestos celulares en el medio circundante, como es el caso de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), responsable de la conversión de piruvato a lactato

transformando un NADH en NAD⁺, durante el metabolismo anaerobio para la producción de ATP (Silverthorn, 2008); esta enzima puede ser cuantificada por técnicas colorimétricas. Por otro lado, la membrana no íntegra de una célula necrótica en estadios tempranos, puede ser atravesada por diferentes compuestos circundantes en el medio, característica que permite evaluar la integridad de la membrana utilizando colorantes supravitales como el ioduro de propidio (IP), molécula con carga que se une a los ácidos nucleicos y que no puede penetrar a las células intactas (Kourí y Mitrovic, 2010).

Apoptosis

El término apoptosis fue acuñado en 1972 por Kerr y colaboradores para describir un modo común de muerte celular programada en distintos tejidos y tipos celulares, ya que las células que se estaban muriendo compartían características morfológicas que eran distintas de las particularidades observadas en las células necróticas.

La muerte por apoptosis es un suicidio de la célula por un mecanismo de autodestrucción, sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. Consiste en un proceso limpio y ordenado caracterizado por la condensación de la cromatina, que se acompaña de una fragmentación de ADN en el núcleo celular. Posteriormente el núcleo se fragmenta, el volumen celular se reduce, hay una pérdida de la adhesión a las células contiguas, formación de ampollas en la superficie celular, y englobamiento rápido de los restos celulares por fagocitosis (Müller, 2008 y Karp, 2011).

Este tipo de muerte desempeña un papel fundamental en la embriogenia, ya que ayuda a modelar los órganos durante el desarrollo mediante la eliminación de células superfluas. Durante este mecanismo, cada día se destruyen cerca de 10 mil millones de células del cuerpo humano adulto, interviniendo un gran número de procesos fisiológicos (Dale *et al.*, 2012). Además, la muerte celular programada constituye un mecanismo de defensa mediante el cual, las células alteradas o potencialmente peligrosas, son eliminadas por el bien del organismo. Las células infectadas por virus con frecuencia sufren la muerte celular programada, lo que evita que se generen nuevas partículas víricas y que se propague el virus por el organismo hospedador. Otro tipo de alteraciones, como las lesiones en el ADN, también inducen la muerte celular programada; en este caso, se eliminan las células portadoras de mutaciones potencialmente dañinas, incluyendo aquellas células con mutaciones que pudieran desencadenar el desarrollo de cáncer (Cooper y Hausman, 2009).

La apoptosis está regulada por una vía que involucra muchas proteínas, las cuales disparan o impiden este proceso. La apoptosis puede ser desencadenada por una variedad de estímulos que actúan ya sea desde afuera de la célula (vía extrínseca) o desde el interior celular (vía intrínseca). Los estímulos externos pueden ser la radiación y la falta de factores de crecimiento esenciales; mientras que un estímulo intrínseco puede ser el daño espontáneo al ADN de la célula (Passarge, 2010). Por lo tanto, existen dos rutas de activación de la apoptosis: la vía extrínseca e intrínseca (figura 3).

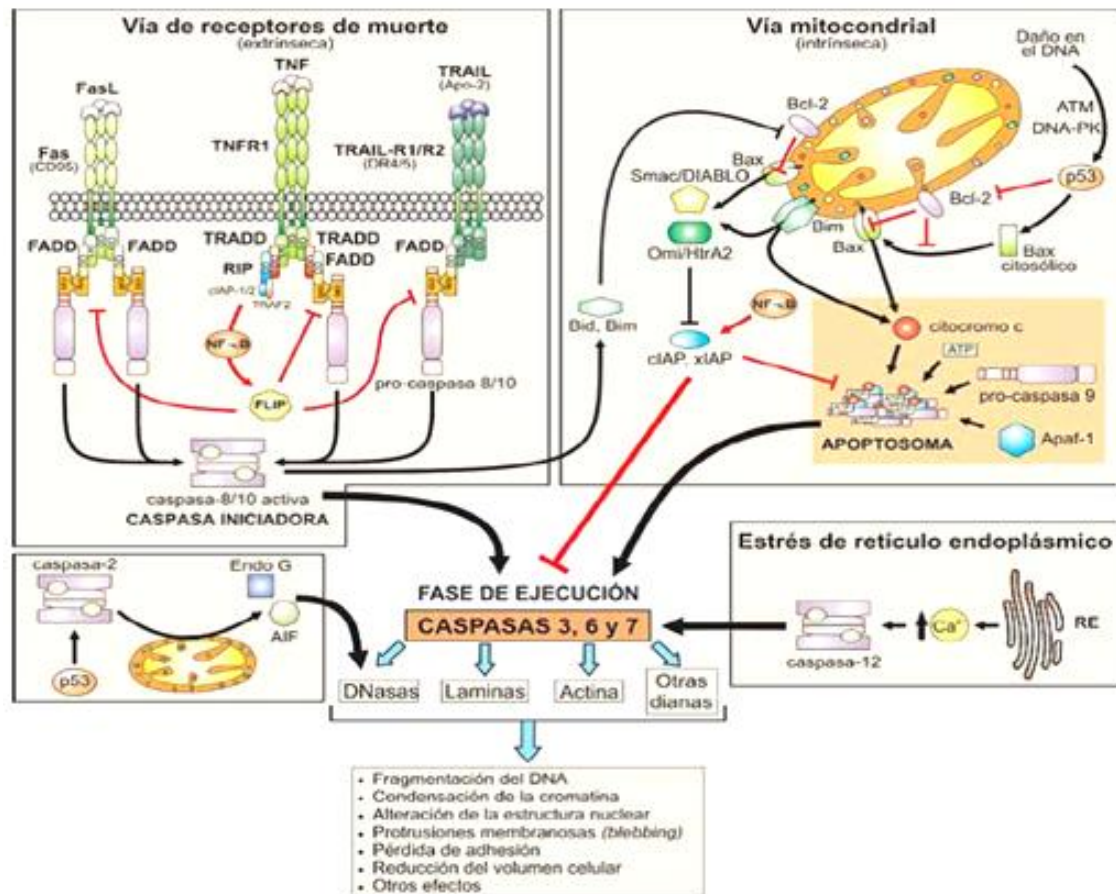


Figura 3. Rutas de muerte por apoptosis, en donde se aprecia la ruta extrínseca y la ruta intrínseca. Las flechas indican activación y las flechas troncadas una inhibición. Tomado de Lizarbe, 2007.

Las proteínas reguladoras del proceso de apoptosis pertenecen a la familia Bcl-2 y contienen distintos dominios estructurales como BH1, BH2, BH3 y BH4 que corresponden a segmentos helicoidales, unos actúan como antiapoptóticos como Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y otros funcionan como proapoptóticos los cuales son Bax, Bad, Bak, Blk y Bid (Schinoni *et al.*, 2006). El mecanismo central de la maquinaria de muerte en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado caspasas (Alnemri *et al.*, 1996).

Independientemente de la naturaleza del estímulo inductor de muerte, el proceso siempre resulta en la activación de las caspasas que conduce a la fragmentación del material genético de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular. En la cascada de caspasas participan aproximadamente nueve caspasas diferentes, en donde intervienen las caspasas iniciadoras y convergen en las caspasas efectoras (Rang *et al.*, 2012). La caspasa-3 es considerada la enzima ejecutora más importante dentro de la cascada, sobre la cual convergen las dos vías de activación de la apoptosis (Anand, 2011), siendo esencial para algunos cambios característicos en la morfología celular y participa en eventos asociados con la ejecución y terminación de la apoptosis (Porter y Jänicke, 1999).

VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana celular en respuesta a señales extracelulares (Cuello *et al.*, 2006). En esta vía, los receptores como TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas (Shen *et al.*, 2006). Las caspasas (prototipo de la familia de cisteinil-aspartil proteasas) llevan en el centro activo una cisteína y rompen el sustrato de forma específica después de un residuo de Asp. (Asp-Xaa). La ruta extrínseca causada por los receptores de Fas y su ligando induce una oligomerización de receptores Fas, que conducen a la activación del “Dominio de muerte” (DD, del inglés *death domain*). Mediante la unión de proteínas adaptadoras citosólicas FADD a los dominios DD activados se origina un complejo que puede unir a dos moléculas de procaspasa-8, que recíprocamente se auto-activan (Müller, 2008). Finalmente, la caspasa-8 puede activar a la caspasa-3, iniciándose así el programa de muerte celular (Shen *et al.*, 2006), o bien puede escindir a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. Bid se traslada del citoplasma a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo C del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (Velázquez *et al.*, 2004).

VÍA INTRÍNSECA

Una señal determinada de muerte, como agentes genotóxicos utilizados en quimioterapia y radiación, determinan una respuesta de estrés celular que induce apoptosis a través de esta vía (Cuello *et al.*, 2006), donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO (Porter *et al.*, 2006). Entre los inductores de apoptosis más

importantes se encuentra el supresor de tumores p23. Tras el daño del ADN, p23 inicia un periodo de reparación. Alternativamente, p23 puede enviar a la célula a apoptosis con daños de ADN irreparable; para ello p23 induce la expresión del gen *bax*. La proteína Bax regula en la membrana mitocondrial externa (junto con miembros de la familia Bcl-2) la liberación de citocromo C de la membrana interna de este orgánulo al citoplasma (Müller, 2008). El citocromo C liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa-9. La caspasa-9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Velázquez *et al.*, 2004), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Gogvadze *et al.*, 2006).

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una familia de moléculas altamente reactivas que incluyen el radical hidroxilo ($-OH$), el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radicales de peróxido orgánico. Las ERO se pueden producir *in vivo* por varios sistemas de enzimas, tales como la NADPH oxidasa (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), lipoxigenasas, ciclooxygenasas, y el citocromo P450. En condiciones fisiológicas, la cadena respiratoria mitocondrial es el sitio principal para la producción de ERO en células (Fleury *et al.*, 2002). Los electrones transportados por la cadena de transporte de electrones pueden ser desviados de la vía a oxígeno, generando anión superóxido. Las ERO son especies extremadamente transitorias debido a su alta reactividad química. Es esta reactividad química responsable de la destrucción del ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Sin embargo, en condiciones normales, los antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), la catalasa, y el superóxido dismutasa (SOD) generalmente previenen el daño tisular (Curtin *et al.*, 2002). Cuando las ERO sobrepasan los sistemas de defensa de la célula, hay una alteración de la homeostasis *redox*, provocando estrés oxidativo (Schreck *et al.*, 1991).

La muerte celular necrótica debido al estrés oxidativo está bien documentada (Halliwell *et al.*, 1989). Este fenómeno implica daño celular masivo, que en su mayoría sería causado por el radical hidroxilo altamente reactivo. Sin embargo, la posibilidad de que las ERO sean las moléculas de señalización en las muertes fisiológicas, como la apoptosis, es una idea más reciente. Existe una creciente evidencia de que estos compuestos pueden jugar un papel central en las vías de transducción de muerte celular. De hecho, hay varias observaciones que sugieren que las ERO pueden mediar la apoptosis: (1) la adición de las ERO o el

agotamiento de los antioxidantes endógenos puede promover la apoptosis (Lin *et al.*, 2004), (2) la apoptosis a veces puede ser retrasada o inhibida por antioxidantes (Grub *et al.*, 2002; Medan *et al.*, 2005) y (3) muchos estímulos de apoptosis, tales como TNF- α (Sidoti *et al.*, 1998), los glucocorticoides (Oshima *et al.*, 2004), la retirada del factor de crecimiento (Kirkland *et al.*; 2002), y la infección por virus de inmunodeficiencia humana, se ha demostrado que estimulan la producción de ERO (Gil *et al.*, 2003).

Cáncer

El término cáncer es utilizado para enfermedades que implican un exceso de células malignas (las células cancerígenas), que son anormales dividiéndose sin control y pueden invadir otros tejidos (NCI, del inglés *National Cancer Institute*; RAE, Real Academia Española, 2013). Es una enfermedad genética, ya que se pueden rastrear alteraciones dentro de genes específicos en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas en el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Alberts, 2008); al volverse inestable desde el punto de vista genético, a menudo tienen complementos cromosómicos muy anormales, un trastorno conocido como aneuploidia (Karp, 2011).

Como consecuencia de la proliferación anormal de células, es formada una masa de tejido llamado tumor que puede ser benigno o maligno. Un tumor maligno es capaz de invadir el tejido normal adyacente y propagarse por el cuerpo (metástasis). Sólo a los tumores malignos se les denomina propiamente como cánceres y es su capacidad para invadir y dar lugar a metástasis lo que convierte al cáncer en algo peligroso (Cooper y Hausman, 2009).

Las características del cáncer incluyen seis funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de varios pasos en los tumores humanos a los que Hanahan y Weinberg (2011) llamaron sellos del cáncer (figura 4). Estos incluyen el mantenimiento de la señalización autónoma proliferativa, evasión de los supresores de proliferación, escapatoria a la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado (atribuida a la presencia de telomerasa), la inducción de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), y la capacidad de invasión y metástasis. Recientemente se han añadido otros sellos o características; como son, la reprogramación del metabolismo energético (a menudo dependen de la glucólisis) y el impedimento de la destrucción inmune (Karp, 2011; Pecorino, 2012).

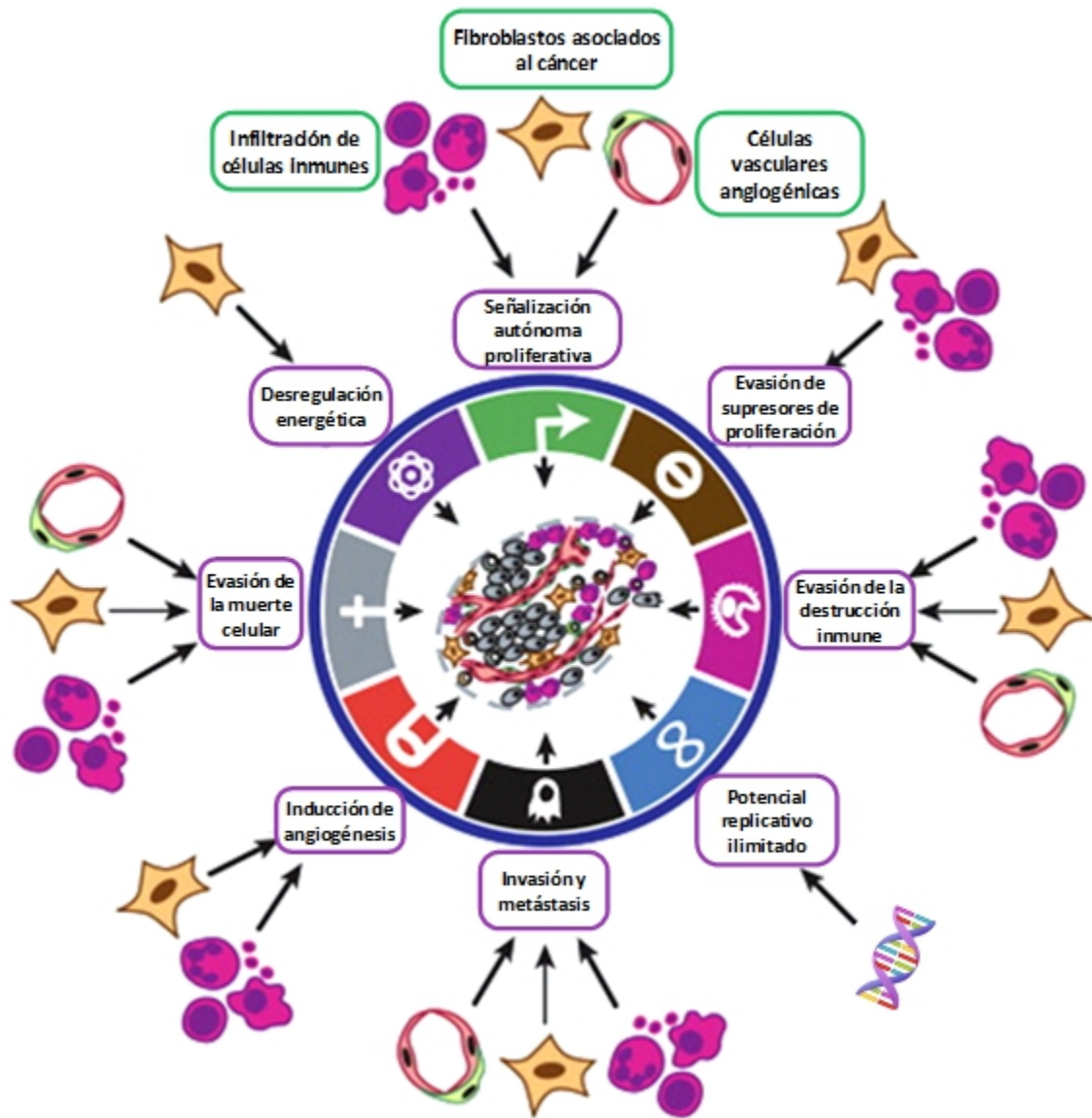


Figura 4. Microambiente del tumor mostrando las características del cáncer y las células que pueden contribuir a su desarrollo, la participación de las células varía con el tipo de tumor. Tomado y modificado de Hanahan y Coussens, 2012.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos: 1) carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; 2) carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua); y 3) carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

Tanto los tumores malignos como los benignos, se pueden producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de cien tipos distintos de cáncer que pueden diferir en su comportamiento y respuesta al tratamiento. Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: 1) carcinomas, aquellos cuyo origen son células epiteliales; 2) sarcomas, cuyo origen son las células del tejido conectivo, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso; y 3) aquellos que no se ajustan a ninguna de las categorías anteriores y se incluyen las leucemias, y los tumores del sistema nervioso (Cooper y Hausman; 2009)

De acuerdo con la OMS, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Tan sólo en 2011 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte entre los mexicanos sólo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus. De acuerdo a la información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2011 murieron 71 mil 350 personas por cáncer en México (INEGI, 2011). Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por el virus de papiloma humano (VPH), son responsables de hasta un 20 % de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (GLOBOCAN, 2008).

Cáncer cérvico uterino (CaCU)

De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI), el cáncer cérvico uterino es un padecimiento en el cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino, que es la abertura del útero (el órgano hueco en forma de pera donde se desarrolla el feto) y lo conecta con la vagina (canal de nacimiento) (figura 5). Los tejidos del cuello uterino experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales (proceso conocido como displasia). Posteriormente, las células cancerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y en las áreas circundantes. En México es la segunda causa de morbilidad hospitalaria entre las mujeres, en el grupo de 65 a 74 años se ubica la tasa más alta (SSA, 2011).

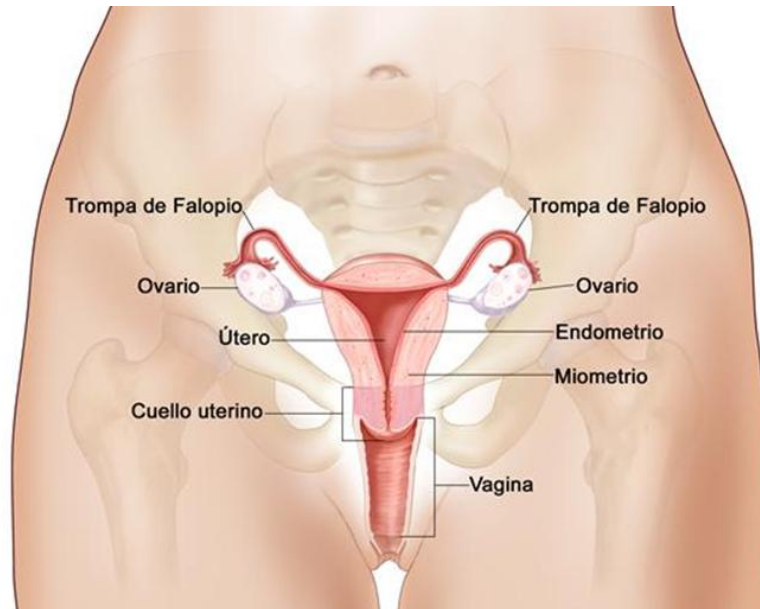


Figura 5. Anatomía del aparato reproductor femenino. Los órganos que lo componen son el útero, los ovarios, las trompas de Falopio, el cuello uterino y la vagina. El útero tiene una capa muscular externa que se llama miometrio y un revestimiento interno que se llama endometrio. Tomado de NCI, 2013.

Casi todos (99.8 %) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus de ADN tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH) (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). La infección del cuello uterino por el VPH es la causa más común del cáncer de cuello uterino. No obstante, no todas las mujeres con infección por el VPH padecerán de cáncer de cuello uterino.

Los factores de riesgo posibles para la infección incluyen los siguientes:

- ✚ Multiparidad.
- ✚ Promiscuidad (tener muchas parejas sexuales).
- ✚ Actividad sexual a edad temprana.
- ✚ Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.
- ✚ Verrugas genitales, test de papanicolau con resultados anormales.
- ✚ Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- ✚ Edad, siendo más común después de los 35 años.
- ✚ Carga viral, relacionada con la severidad de la enfermedad. El VPH tipo 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.
- ✚ Fumar.
- ✚ Uso prolongado de píldoras anticonceptivas orales.
- ✚ Tener el sistema inmunitario debilitado.
- ✚ Predisposición genética.

Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma (VP), pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Infecta específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral (figura 6). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

Recientemente se conocen 15 tipos de VPH en mujeres (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) que deben considerarse como de alto riesgo, mientras que 12 de ellos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) deben considerarse de bajo riesgo y sólo 3 (26, 53 y 66) como de probable alto riesgo (Tatti, 2008). El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb.

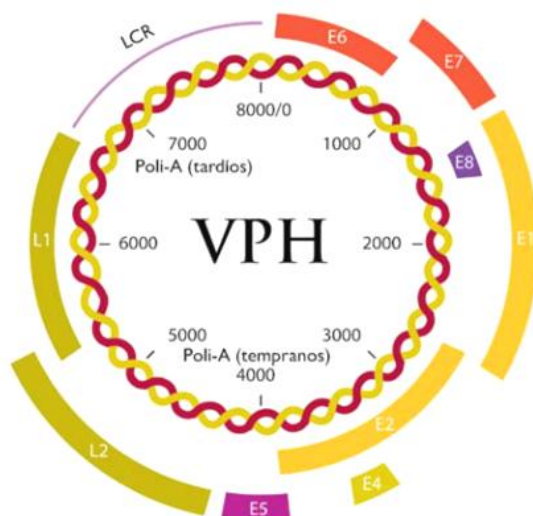


Figura 6. Organización del Genoma del VPH. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno, la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2). Tomado López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006.

Las proteínas del virus provocan lesiones leves o moderadas debido a su potencial oncogénico (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Después de que el VPH ha infectado a las células, el virus expresa las proteínas para integrar su genoma con el de la célula sana y como consecuencia de la replicación de viriones se altera la secuencia de ADN de la célula provocando una célula cancerosa debido a su interacción con los oncogenes (Alberts *et al.*, 2008).

Clasificación del CaCU

Una vez detectado (diagnosticado) el cáncer cérvico uterino, la etapa o estadio describe la extensión o gravedad del cáncer que aqueja a una persona. Actualmente son varios sistemas los utilizados para la clasificación del cáncer cérvico uterino; el sistema Bethesda (figura 7), es un método para evaluar y diagnosticar un estudio citológico ginecológico y se originó en el Instituto Nacional de Cáncer de Bethesda, Estados Unidos (Alonso *et al.*, 2005).

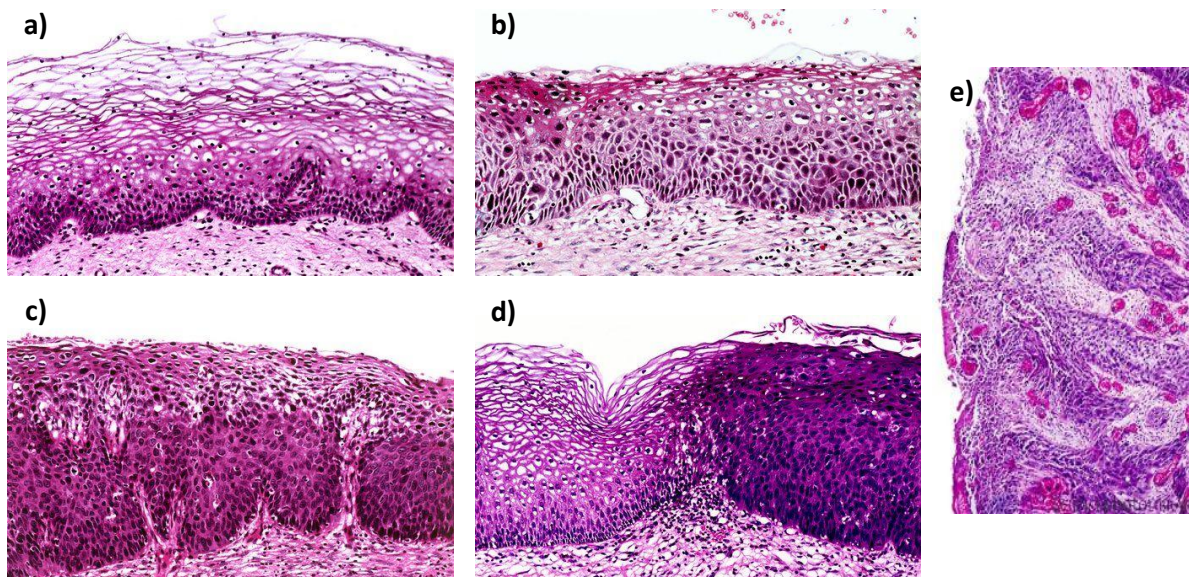


Figura 7. Etapas de progresión en el desarrollo de cáncer en el epitelio del cuello uterino. Micrografías ópticas de una sección a través del tejido del útero en diferentes estadios. a) En el epitelio escamoso pluriestratificado normal, las células están confinadas en la capa basal. b) En las neoplasias intraepiteliales de bajo grado (NIC 1), las células en división se pueden encontrar en la tercera parte inferior del epitelio; las células superficiales todavía son alargadas y muestran signos de diferenciación, aunque es incompleta. c) y d) en la neoplasia intraepitelial de alto grado (NIC 2 y NIC 3), las células proliferan en todas las capas del epitelio y no muestran signos de diferenciación, presentan mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. e) Cáncer invasivo; la verdadera malignidad comienza cuando las células atraviesan o destruyen la lámina e invaden el tejido conjuntivo circundante. Tomado de *science photo library* en <http://www.sciencephoto.com/media/108012/view>.

La lesión escamosa intraepitelial (SIL, del inglés *squamous intraepithelial lesion*) se divide en lesiones de bajo y alto grado (Tatti, 2008). Las lesiones que se encuentran en las biopsias y colposcopia, se clasifican en neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado 1 cuando es de bajo grado, y cuando es de alto grado como NIC de grado 2 ó 3 (Vázquez y Justo, 2011). La estadificación de las etapas de la evolución CaCU, partiendo de la etapa cero, correspondería al carcinoma *in situ* (NIC 3); esta clasificación continúa siendo clínica utilizando la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2009 (Pecorelli *et al.*, 2009).

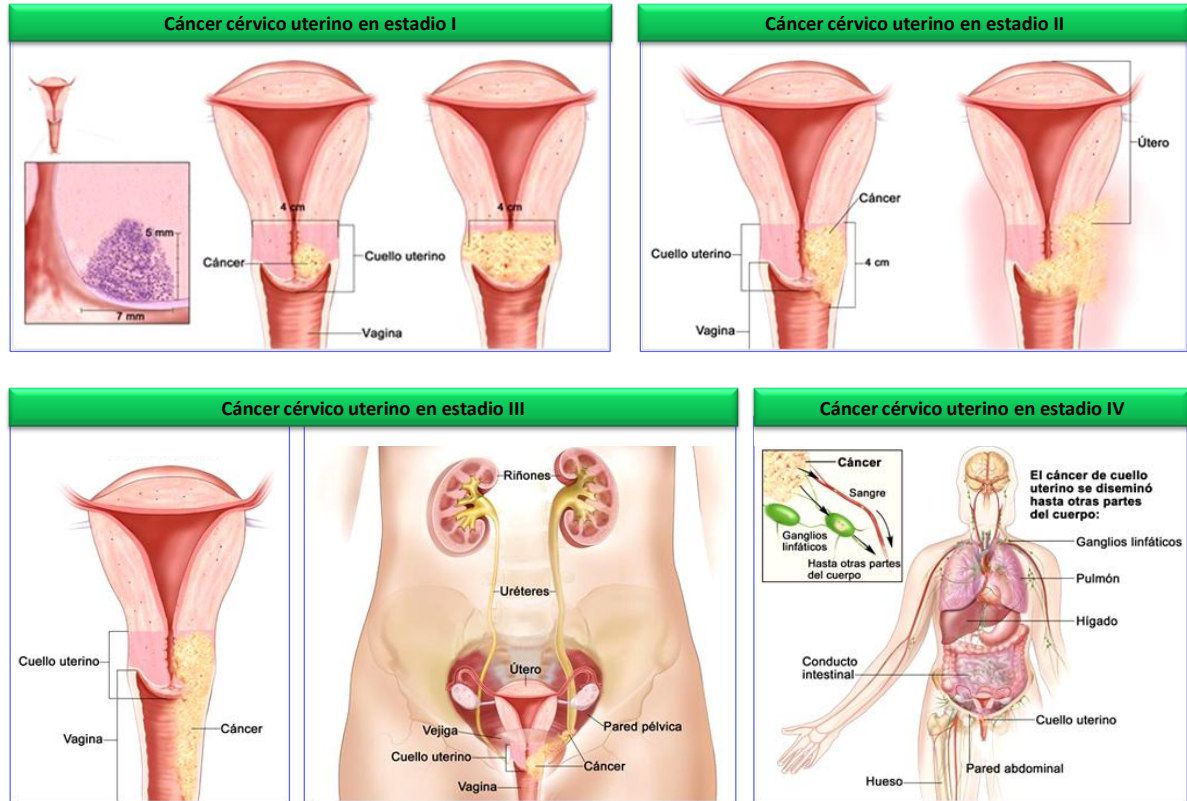


Figura 8. Progresión del CaCU por estadios. En el estadio I, el cáncer no mide más de 3 mm de profundidad y 7 mm de ancho hasta 4 cm; en el estadio II, el tumor se puede ver sin un microscopio y mide de cuatro centímetros hasta que se ha extendido más allá del cuello uterino en los tejidos que rodean el útero; para el estadio III, el cáncer se diseminó hacia el tercio inferior de la vagina, se puede haber diseminado hasta la pared de la pelvis, o puede haber causado problemas en los riñones, posteriormente el tumor se volvió lo suficientemente grande como para bloquear los uréteres (los tubos que conectan los riñones con la vejiga), el dibujo muestra el uréter derecho bloqueado por el cáncer (el bloqueo puede hacer que el riñón se agrande o deje de funcionar); en el estadio IV, el cáncer se diseminó hasta la vejiga, el recto u otras partes del cuerpo, como el hígado, los intestinos, los pulmones o los huesos. Tomado y modificado de Montalvo *et al.*, 2011.

Los estadios tempranos del CaCU (figura 8) incluyen carcinoma *in situ* (estadio 0), que es un cáncer en su etapa inicial. El estadio I, en donde el cáncer se encuentra solamente en el cuello uterino y se puede ver bajo el microscopio o sin él. El estadio II, caracterizado por que el cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino, pero no hasta la pared de la pelvis (tejidos que revisten la parte del cuerpo entre la cadera) o hasta el tercio inferior de la vagina; al final de este estadio el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino hasta los dos tercios superiores de la vagina o hasta los tejidos que rodean el útero. El estadio III, etapa donde el cáncer se disemina hasta el tercio inferior de la vagina, hasta la pared de la pelvis o puede haber causado problemas en los riñones. Finalmente se encuentra el estadio IV, en donde el cáncer se diseminó hasta otras partes del cuerpo (Montalvo *et al.*, 2011).

Diagnóstico y tratamiento del cáncer

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación. Las pacientes con resultados de Papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical severa son evaluadas por colposcopia y por toma de biopsia o cono. La escisión por medio del asa electro quirúrgica es buen tratamiento para las lesiones escamosas no invasivas (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

De acuerdo con el NCI (2013) existen tratamientos para todas las pacientes con cáncer cérvico uterino, que es normado de acuerdo al estadio clínico en el que se encuentre la paciente. Se emplea tres clases de tratamiento:

- Cirugía (extracción del cáncer en una operación).
- Radioterapia (uso de rayos X de alta energía u otros rayos de alta energía para eliminar las células cancerosas).
- Quimioterapia (uso de medicamentos para eliminar las células cancerosas).

Cirugía

El pronóstico (posibilidades de recuperación) y la selección del tratamiento dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer (si se encuentra en el cuello uterino o si se ha diseminado a otros lugares) y el estado de salud en general de la paciente. El médico puede emplear uno de varios tipos de cirugía disponibles para el carcinoma *in situ* con el fin de destruir el tejido canceroso:

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

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

CONIZACIÓN

Consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anormalidad. La conización se emplea para extraer un pedazo de tejido para una biopsia, pero también puede utilizarse para el tratamiento del cáncer incipiente del cuello uterino.

HISTERECTOMÍA

La histerectomía es una operación en la cual se extrae el útero y el cuello uterino además del cáncer. La operación se llama histerectomía vaginal, si el útero se extrae a través de la vagina; histerectomía abdominal total, si se extrae mediante un corte (incisión) en el abdomen; salpingooforectomía bilateral, cuando son extraídos los ovarios y las trompas de Falopio; durante la histerectomía radical se extrae el cuello uterino, el útero y parte de la vagina; cuando también se extrae los ganglios linfáticos de la región se denomina disección de los ganglios linfáticos. Si el cáncer se ha diseminado afuera del cuello uterino o los órganos femeninos, se puede extraer el colon inferior, el recto o la vejiga (dependiendo del lugar al que se haya diseminado el cáncer) junto con el cuello uterino, el útero y la vagina (exenteración). A veces es necesaria la cirugía plástica para formar una vagina artificial después de esta operación.

Radioterapia

La radioterapia consiste en el uso de rayos X y/o rayos γ para eliminar células cancerosas y reducir tumores. La radiación puede provenir de una máquina fuera del cuerpo (radioterapia externa) o se puede derivar de materiales que producen radiación (radioisótopos) a través de tubos plásticos delgados que se aplican al área donde se encuentran las células cancerosas (radiación interna). La radioterapia puede emplearse sola o combinada con cirugía.

La radioterapia convencional suele aplicarse en ciclos fraccionados con dosis diarias de 180 a 200 cGy (centiGray) por fracción. La diferencia que hay entre el fraccionamiento de tumores y los tejidos normales es un factor importante para determinar el índice terapéutico (diferencia entre el control del tumor y las complicaciones de los tejidos normales) de la irradiación fraccionada (Eifel, 2010).

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para eliminar células cancerosas. Puede tomarse en forma de píldoras o vía intravenosa (IV). La quimioterapia se considera un tratamiento sistémico ya que el medicamento es introducido al torrente sanguíneo, viaja a través del cuerpo y puede eliminar células cancerosas fuera del cuello uterino.

Se dispone de una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos, la elección y la dosificación de los cuales depende de los beneficios relativos de cada fármaco, como la

combinación de varios de ellos. Dentro de las consideraciones previas a la elección del tratamiento es considerada la evolución natural de la neoplasia concreta, circunstancias y tolerancia de la paciente y la probabilidad de conseguir una respuesta beneficiosa. Entre los fármacos antineoplásicos utilizados se encuentra la ifosfamida, cisplatino, beomicina, mitomicina c, hidroxiourea, vincristina e irinotecán (Markman, 2010).

Prevención: vacunas

Zhou y colaboradores (1991) desarrollaron las partículas tipo virus (*virus like particles*, VLP) expresando los genes L1 y L2 de la cápside viral (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006) sin contener ningún otro material potencialmente peligroso o infeccioso. Ambas vacunas están basadas en la tecnología de VLP. Una de ellas, la vacuna con dos antígenos o bivalente contiene VLP que transportan dos genotipos del VPH, el 16 y el 18, que provocan alrededor del 70 % de los casos de cáncer cérvico uterino en la mayoría de las zonas del mundo. La otra vacuna, una vacuna tetravalente, tiene VLP que además de los genotipos 16 y 18 contiene los genotipos 6 y 11, causantes de alrededor del 90 % de las verrugas genitales en mujeres y hombres (OMS, UNICEF y Banco mundial; 2009).

Perspectivas

Los fármacos que favorecen la apoptosis mediante diversos mecanismos fueron anunciados como potenciales innovaciones para el tratamiento del cáncer y están siendo objeto de estudio, aunque ninguno de ellos ha sido aprobado aún para su utilización clínica. Los posibles abordajes proapoptóticos terapéuticos han de dirigirse con precisión hacia los tejidos enfermos, a fin de evitar el riesgo evidente de lesionar otros tejidos (Melnikova *et al.*, 2009; Dale *et al.*, 2012).

La mayoría de las veces se requiere de la combinación de las terapias para obtener éxito, y son eficientes en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo son generados efectos secundarios en el paciente, como pérdida de cabello, irritabilidad, vómito, mareo, por citar algunos. Estos tratamientos son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas sin dañar en forma simultánea a las células normales. Ante esta situación se buscan nuevos tratamientos y medidas de prevención que permitan una mejor calidad de vida del paciente.

Entre las nuevas alternativas para contrarrestar el cáncer se buscan compuestos que tengan potencial antiproliferativo y sean selectivos. Actualmente se ha encontrado que 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 Disulfiram (DSF), droga que ha sido utilizada por décadas en el tratamiento del abuso del alcohol, inhibiendo la enzima aldehído deshidrogenasa y recientemente propuesto como un agente anticancerígeno 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 [bis (dietilcarbamoil) disulfuro] (figura 9), que fue sintetizado en 1881 por Grotky e introducido en la terapéutica como vermífida (Salazar, 2010), 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, a los primeros minutos provoca una serie de malestares como son náuseas, vómito, cefalea pulsátil, rubor, disnea, dolor precordial, sudoración, visión borrosa, vértigos, taquicardia e hipotensión, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo entre 5 a 10 veces mayor a lo normal. En casos graves pueden ocurrir arritmias cardíacas, depresión respiratoria, infarto de miocardio, insuficiencia circulatoria aguda, insuficiencia cardíaca aguda, shock y convulsiones (Salazar, 2010).

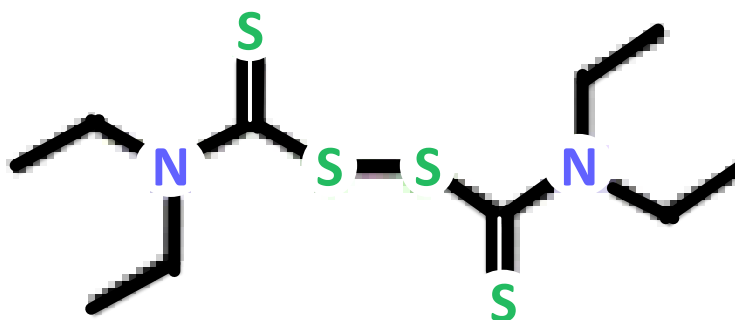


Figura 9. Estructura química del Disulfiram (DSF), cuyo nombre IUPAC (del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) es 1-(dietiltiocarbamoildisulfanil)-N,N-dietil-metanotioamida. Tomado y modificado de Hu *et al.*, 1997.

Los tiocarbamatos en general han sido y son objeto de numerosas investigaciones como fungicidas, bactericidas e insecticidas. Sus complejos metálicos son usados como pesticidas y pueden ser utilizados además en los tratamientos del alcoholismo crónico, envenenamiento con níquel y la acumulación de cobre. Unido a esto, han encontrado aplicación en la industria de la goma como aceleradores de la vulcanización y como aditivos para aceites y grasas por su propiedad antioxidante (González, 2000).

Varios laboratorios han investigado la actividad antitumoral del DSF en células tumorales, encontrando que disminuye la proliferación de células de carcinoma pulmonar (Ryan y Wilding, 2000), carcinoma de ovario (Dazhi, 2002) y en cáncer colorectal (Wang *et al.*, 2003); induce apoptosis en melanoma (Cen *et al.*, 2002; Brar *et al.*, 2004), en células de mama (Chen *et al.*, 2006; Wickström *et al.*, 2007), y en células de leucemia mieloide U937 (Navrátilová *et al.*, 2009); además, presenta un efecto citotóxico en células de osteosarcoma humanas U2OS (Hyun-Ji *et al.*, 2007) y mostraron reducir la angiogénesis (Gourley y Williamson, 2006).

Se ha 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 de proteosoma en cáncer de mama (células MDA-MB-231 y MCF10DCIS) (Chen *et al.*, 2006); además, debido a la formación de este complejo se inhibe NFκB, potenciando su efecto en líneas celulares de cáncer de colon y de mama (Guo *et al.*, 2010). No obstante, el mecanismo no ha sido establecido completamente y todo parece indicar que el DSF actúa de manera no selectiva. Asimismo se ha reportado que el DSF puede tener actividad antitumoral y quimio sensitiva (Wickström *et al.*, 2007). 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, en 1977, Cobby y colaboradores demostraron que el DSF no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol, pues encontraron que después de ser ingerido, es reducido rápidamente a Dietilditiocarbamato (DDC) por acción de la glutatión reductasa (Cobby *et al.*, 1977) que a su vez es metabolizado a dietilamina, glucorónico de dietilditiocarbamato y sulfato de dietilditiocarbamato (González, 2000). Además, Zuben y colaboradores reportan que la actividad inductora de apoptosis no es realizada por el DSF directamente, ya que éste es convertido rápidamente a otros metabolitos; lo que sugiere, que los responsables de la actividad biológica son los

metabolitos resultantes (Zuben *et al.*, 2005), siendo más importantes que el DSF por sí solo. Por lo que existe un interés en la síntesis de análogos del DSF así como de sus metabolitos para su evaluación como agentes antiproliferativos e inductores de apoptosis.

Vía metabólica del Disulfiram

La vía metabólica para la biotransformación del DSF se muestra en la figura 10; en donde el DDC sufre una reacción de metilación para formar el MeDDTC, el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el MeDTC, y MeDTC-SO (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2006).

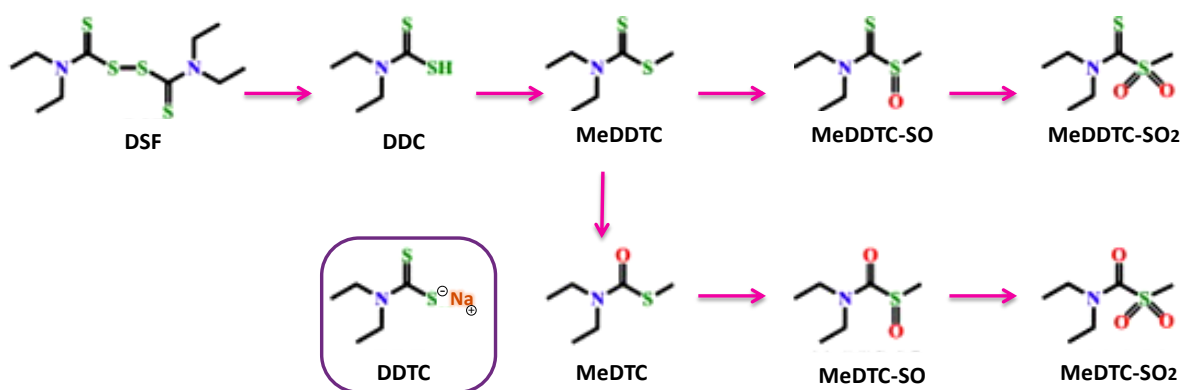


Figura 10. Ruta metabólica del Disulfiram; donde son utilizadas las siguientes abreviaturas: DSF, bis (dietiltiocarbamoil) disulfuro; DDC, N,N-dietilditiocarbamato ácido; el cual, sufre una reacción de metilación para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dietilditiocarbamato; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el MeDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato; y MeDTC-SO, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfóxido; éste es el precursor de MeDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato sulfona. El DDTC, Dietilditiocarbamato sódico es un análogo sintético del DDC que no forma parte de la ruta metabólica. Tomado y modificado de Hu *et al.*, 1997.

Los diversos metabolitos del DSF han sido evaluados con respecto a su actividad biológica, entre ellos destaca el Dietilditiocarbamato (DDC); el cual induce 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 (Liu *et al.*, 1998); mientras que induce la apoptosis en líneas leucémicas (Kanno *et al.*, 2003) presentando un efecto citotóxico.

El análogo de un metabolito más estudiado es la Pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) perteneciente a la familia de los ditiocarbamatos; el cual forma complejos con cobre presentando su actividad anticancerígena por inhibición del proteosoma (Yu *et al.*, 2007), induce citotoxicidad en líneas celulares de melanoma (Rickardson *et al.*, 2007), en células de leucemia linfocítica inhibe al proteosoma 26S induciendo la traslocación de NFκB (Löevborg *et al.*, 2006). Además se le atribuye un efecto apoptótico en células de cáncer de mama

(Daniel *et al.*, 2005), próstata (Chen *et al.*, 2006), en líneas promielocíticas HL-60 (DellaRagione, 2000) y se le ha atribuido un efecto citotóxico en líneas leucémicas (Wickström *et al.*, 2007).

No obstante en los estudios mencionados, no existe evidencia del efecto del Disulfiram en células normales o no tumorales, lo cual genera la necesidad de conocer si es selectivo, además de que se ha demostrado que el DSF al ser ingerido inmediatamente es metabolizado y convertido a metabolitos que en realidad son los responsables del efecto, induciendo a la búsqueda de metabolitos del Disulfiram que pudiesen potencializar el efecto antitumoral y ser selectivos con respecto a las células tumorales.

En conjunto, los antecedentes sugieren que el DSF y algunos de sus metabolitos presentan efectos citotóxicos, antioxidantes, e inductores de apoptosis en diferentes líneas celulares y modelos experimentales. Por ello el Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) puede ser considerado un candidato para evaluar su efecto antiproliferativo en células de CaCU, al presentar la estructura base del DSF con el fin de encontrar un compuesto con potencial antiproliferativo, selectivo e inductor de apoptosis en células cancerígenas.

Dietilditiocarbamato sódico

El Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) (figura 11) es la sal del ácido dietilditiocarbámico (ácido dietilcarbamoditioico), $[(C_2H_5)_2NCS_2H]$, agente quelante utilizado principalmente en la determinación analítica de cobre, arsénico, níquel y otros metales (Bennington, 2000). Otras aplicaciones incluyen la detección de metales tóxicos como Se, Cu, Pb, Zn, Fe, Co, Ni, Mn, Cr y Cd (Atanassova *et al.*, 1998), tanto en agua, orina, sangre y en el tratamiento de envenenamiento humano con metales.

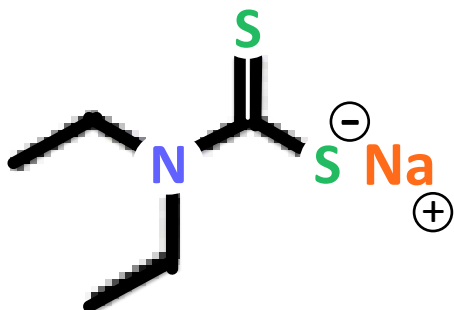


Figura 11. Estructura química del Dietilditiocarbamato sódico.

Los Dietilditiocarbamatos han sido objeto de estudio en la industria e investigación. Se ha iniciado el estudio del Dietilditiocarbamato sódico desde los puntos de vista de su actividad antioxidante e hipoglucemiante. Dicho carbamato, administrado a ratas provocó descensos en los niveles de glucosa en sangre (Cabo *et al.*, 1996). Sin embargo inhibe la enzima dopamina β -hidroxilasa, inhibiendo la síntesis de noradrelanina a partir de la dopamina, cuyas concentraciones aumentan; de ahí la posibilidad de inducir cuadros psicóticos (Salazar, 2010).

En relación a la actividad del DDTC en células de cáncer no se presenta información al respecto; sin embargo al DDC se le atribuye el efecto formador de complejos con metales, en especial cobre, que potencia su actividad “anticancerígena” y citotóxica; por lo cual el ion sodio podría jugar un papel importante en el efecto en células de cáncer cérvico uterino.

Planteamiento del problema

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, siendo la segunda después de las enfermedades cardiovasculares para el año 2010 (Jones *et al.*, 2012). En México el cáncer cérvico uterino es la segunda causa de morbilidad hospitalaria entre las mujeres, en el grupo de 65 a 74 años se ubica la tasa más alta (SSA, 2011). 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, induciendo muerte apoptótica, 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 el Disulfiram, sus metabolitos, así como sus análogos.

Justificación

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Más del 70 % de todas las defunciones por cáncer se producen en los países de ingresos bajos y medios, cuyos recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes. En México representa la tercera causa de muerte (INEGI, 2011). De acuerdo con el Informe mundial sobre el cáncer (el análisis mundial de la morbilidad), la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50 % hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos (Ginebra, 2003). En el mundo la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, es neoplasia maligna del cuello uterino, lo cual es un problema de salud grave (Jones *et al.*, 2012). Por ello, es de vital importancia generar estrategias que den solución a este problema. Al respecto, estudios recientes han generado un fuerte interés por compuestos conocidos, 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 cérvico uterino y su posible selectividad respecto a células no tumorales, para su potencial aplicación clínica.

Hipótesis

Es conocido que el Disulfiram (DSF) y sus metabolitos poseen propiedades antitumorales, antioxidantes e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares, abriendo la posibilidad de que el Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) presente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, en líneas celulares provenientes de cáncer cérvico uterino.

Objetivo general

Determinar si el Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) afecta el potencial proliferativo de células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo; así como valorar su capacidad de inducir muerte celular por necrosis o apoptosis.

Objetivos particulares

Determinar el efecto antiproliferativo del Dietilditiocarbamato sódico, expresado como la concentración requerida de DDTC para inducir un decremento del 50 % en el número celular (Cl_{50}), en cultivos de células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo y en cultivos de células no tumorales, mediante las técnicas de tinción por cristal violeta y carboxifluoresceína (CSFE).

Cuantificar la actividad citotóxica (muerte necrótica) del Dietilditiocarbamato sódico en cultivos de células de CaCU, linfocitos de sangre periférica humana y fibroblastos de cérvix, mediante el ensayo de actividad de LDH (Lactato Deshidrogenasa) y la incorporación de IP (ioduro de propidio) para células tumorales.

Establecer si el compuesto Dietilditiocarbamato sódico ejerce un efecto en la morfología celular e induce condensación y/o fragmentación de ADN en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo con la técnica de microscopia y tinción con DAPI.

Evaluar si el Dietilditiocarbamato sódico, provoca un incremento en la expresión de caspasa-3 activa en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo, mediante la técnica de citometría de flujo.

Valorar si el compuesto Dietilditiocarbamato sódico a la concentración de Cl_{50} induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Método

Cultivo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo

Todos los procesos que requieren esterilidad se realizaron en una campana de flujo laminar. Las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo procedentes de *American Type Culture Collection* (ATCC); fueron sembradas en cajas petri de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI-1640 del *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640; Microlab, Mex.) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, Mex.), al 5 % de suero neonato de ternera previamente desactivado (NCS; Gibco, USA). Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ (dióxido de carbono) 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 y Darling, 1995).

Obtención de células no tumorales (linfocitos)

En tubos Vacutainer con EDTA (BD, USA), se consiguieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano. Fueron colocados 5 ml de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA) y 5 ml de sangre en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), se cubrieron con papel aluminio y fueron centrifugados (Centrifuga; Dinac, USA), con una velocidad inicial de 300 rpm que fue aumentada cada 2 minutos (300 rpm) hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos adicionales. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retiró el plasma y colectó el anillo de leucocitos cuidadosamente; posteriormente, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a otro tubo limpio para ser resuspendido con 10 ml de PBS. Nuevamente las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante y fueron resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Hyclone, USA) anticipadamente desactivado, mientras las células son concentradas a un solo tubo (volumen total de 4 ml). Consecutivamente, se tomó una alícuota de 20 µl y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Procesamiento y obtención de células de cérvix humano (fibroblastos).

Las células fibroblásticas no tumorales, fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino, proveniente de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCU. Una vez obtenida la pieza quirúrgica, ésta se transportó en medio de cultivo RPMI-1640 al 20 % de SFB y fue procesada en las siguientes dos a tres horas. El proceso consistió en escindir el tejido en trozos pequeños (de 2 a 3 mm), y fueron sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %; la cual se llevó 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 baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla fue vertida a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado sobre la malla. El filtrado fue centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas petri de 100 mm. El cultivo fue mantenido en una incubadora al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío durante dos días máximo; después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio de cultivo removiendo las células no adheridas, adicionando medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continuó así hasta obtener un 70 % de confluencia. En este momento se lograron poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular.

Preparación del DDTC

El stock con el que se comenzó a trabajar fue de 1000 µg de DDTC (donado por el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM) disuelto en 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, USA).

Para los ensayos de curva dosis-respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 200 a 1.56 µg/ml para la obtención de una CI₅₀ de la forma siguiente: del stock se tomaron 20 µl y se llevaron a 1 ml con medio RPMI-1640 al 5 % NCS en tubos cónicos de 1.5 ml (eppendorf, Ger.) para tener una concentración 400 µg/ml en el primer tubo. Se prepararon 7 tubos adicionales de 1.5 ml con 500 µl de RPMI-1640 al 5 % de NCS cada uno. Del primer tubo se tomaron 500 µl para ser depositados en el segundo (completando un volumen de 1 ml), de

éste fueron tomados nuevamente 500 µl y fueron depositados en el siguiente tubo, reduciendo la concentración a la mitad de forma sucesiva hasta llegar a la deseada. Al final fueron obtenidas ocho concentraciones distintas de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 µg/ml en 1 ml del compuesto.

Para el resto de los ensayos, la cantidad requerida fue tomada de manera puntual directamente del *stock* original para llegar a la concentración deseada.

Determinación de la proliferación celular a través de la técnica del colorante cristal violeta para células tumorales: HeLa, CaSki y ViBo y células no tumorales: fibroblastos

Se sembraron en placas de plástico de 96 pozos (Corning, USA) 7,500 células por pozo provenientes de CaCU y células no tumorales (fibroblastos), con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS y al 20 % de SFB respectivamente, por 24 horas para su adherencia. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto a probar en RPMI-1640 fresco (al 5 % de NCS y 20 % de SFB) a las concentraciones deseadas, a partir de una dilución seriada. El ensayo control contempló la cantidad de vehículo (concentración del disolvente: DMSO) utilizada en la concentración máxima del compuesto a probar.

El cultivo con el tratamiento de DDTC se mantuvo por 24 y 56 horas, dando un tiempo total de cultivo de 48 horas para el caso de las células tumorales y de 80 horas para las células no tumorales. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Kueng *et al.*, 1989). Para ello, se retiró completamente el medio de cultivo de las placas de cultivo; inmediatamente, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Chemical, USA), por 15 minutos; posteriormente, se retiró el fijador y se dejó secar al aire; después, se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM (Sigma-Aldrich, USA) pH 6 por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en ácido acético al 10 % (J.T. Baker, Mex.), por 20 minutos en agitación constante, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector de placas (SofMaxPro, USA).

Para calcular las CI_{50} (decremento en un 50 % del número celular para cada línea celular tumoral) de las células tumorales y la proliferación de fibroblastos, los datos arrojados por el lector de placas fueron procesados en el programa Microsoft® Office Excel 2007; para obtener gráficos de los datos el número celular.

Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CFSE).

Para el ensayo de carboxifluoresceína fueron utilizados los linfocitos obtenidos a través del proceso antes descrito; después de haber sido contadas se llevaron a una concentración de 1×10^6 células/ml. Para marcar con el tinte carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE; Sigma-Aldrich, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de CFSE (12 μ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5 % de SFB, luego se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 ml a una densidad de 1×10^6 células/ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (FHG; Micro Lab S.A., Mex.) diluida 1:10 en PBS homogenizando la suspensión. A continuación, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 ml con el tratamiento a evaluar cuidando de mantener una densidad de 1×10^6 células/ml de medio total.

Las condiciones establecidas fueron las siguientes: sin activar (sin FHG), activados (con FHG); vehículo, al cual se le agregó la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración más alta del DDTC. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y son incubadas en condiciones de cultivo por 72 horas.

Para la evaluación de proliferación, las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y colectando en tubos cónicos de plástico de 1.5 ml. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante (recuperándolo para su posterior análisis y el *pellet* se resuspendió en 250 μ l de Verseno frío por 5 minutos, posteriormente se centrifugó y retiró el Verseno. Finalmente se resuspendió con 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo FACS Aria II y los

datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2. (Quah y Parish, 2010 y 2012).

Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad de LDH

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de plástico de 96 pozos, 7,500 células por pozo provenientes de CaCu y fibroblastos con 100 μ l de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con la concentración de CI_{50} según cada tipo celular 24 horas adicionales para las células de CaCu y 56 horas para los fibroblastos de cérvix; dando un total de 48 y 80 horas de cultivo. Posteriormente se colectó el medio de cultivo en tubos cónicos de 0.6 μ l (Eppendorf, Ger.), utilizando un tubo por pozo y fueron centrifugados (Ultracentrifuga; Becton Dickinson, USA) a 1500 rpm para desechar cualquier resto celular.

En el caso de los linfocitos, fue utilizado para su evaluación el sobrenadante (medio de cultivo) proveniente de la técnica de proliferación con carboxifluoresceína. Los cuales fueron centrifugados a 1500 rpm para desechar cualquier resto celular.

Las condiciones para la evaluación fueron los siguientes controles: control basal (únicamente medio de cultivo), control negativo (células sin tratamiento, con medio de cultivo y suero al 5 o 20 %), control positivo (células permeadas durante 1 hora con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 1 % en medio de cultivo fresco) y vehículo (DMSO en la concentración utilizada para el tratamiento con DDTC); cada uno por triplicado.

Para la valoración: 40 μ l del sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 pozos (de un tubo cónico a un pozo de la placa), a cada pozo se adicionó 40 μ l de la mezcla de reacción del kit *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, USA) y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm usando lector de placas (SoftMaxPro, USA).

El porcentaje de citotoxicidad fue calculado, procesando los datos arrojados por el espectrofotómetro en el programa Microsoft® Office Excel 2007. Obteniendo gráficos de los datos de los ensayos de citotoxicidad.

Incorporación de Ioduro de Propidio

Fueron sembradas 30,000 células por pozo en placas de cultivo de plástico de 48 pozos (Corning, USA), procedentes de líneas de CaCU en las condiciones antes descritas, con 400 μ l de RPMI-1640 suplementado al 5 % de NCS. Después de la adherencia celular, se trataron las células con DDTC a la concentración de CI_{50} para cada línea. Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron cosechadas depositándose en tubos para citómetro (un tubo por condición) y fueron centrifugados a 1500 rpm recuperando el botón celular. Para el control positivo, las células fueron permeadas con 50 μ l de Etanol al 70 % por 15 minutos; transcurrido el tiempo fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1500 rpm rescatando el botón celular. Posteriormente se agregó a cada muestra 1 ml de PBS suplementado al 5 % de NCS. Un minuto antes de analizar la muestra se colocó a cada tubo 3 μ l de ioduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 200 mg/l. La muestra fue analizada en el citómetro de flujo FACS Aria II y los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

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

Se sembraron 750,000 células de CaCU en cajas petri de 50 mm (Pirex, USA) sobre cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 5 ml de RPMI-1640 suplementado al 5 % de NSC y se incubaron por 24 horas bajo las condiciones antes descritas. Para la administración del DDTC; se trataron las células con la concentración de la CI_{50} respectiva durante 24 horas, teniendo un total de 48 horas de cultivo. Al término, las células fueron fijadas y permeadas con etanol al 70 % durante 15 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS filtrado a través de un filtro de membrana (Millipore, USA) con diámetro de poro de 22 μ m. Las preparaciones fueron escurridas ligeramente en un papel absorbente sin dejarlas secar. Enseguida se adicionó 50 μ l a una concentración de 3 μ g/ml del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) formando un domo sobre cada cubreobjeto y se dejó incubar por 4 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS y se montaron con medio para fluorescencia (Vector Laboratories, USA) sobre portaobjetos. Las muestras se sellaron con esmalte para uñas transparente. Después de ser etiquetadas según corresponda, fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta su observación. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600, equipado con una cámara de alta resolución DXM1200F.

Expresión de caspasa-3 activa en las líneas tumorales mediante la técnica de citometría de flujo.

Se sembraron 300,000 células provenientes de líneas celulares de CaCU en placas de cultivo de 48 pozos, con un volumen de 400 µl de RPMI-1640 al 5 % de NSC y se incubaron por 24 horas. Los cultivos fueron tratados con el DDTC a la concentración de CI_{50} obtenida para cada línea celular. Después de un total de 48 horas de cultivo, se realizó la detección de la caspasa-3 activa por citometría de flujo; para esto, las células fueron cosechadas y fijadas con etanol al 70 % por 15 minutos. Al término del tiempo, las células fueron lavadas cuidadosamente 2 veces con PBS. Sucesivamente se adicionó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-caspasa-3 activa (Sigma-Aldrich, USA), 1:500 en PBS y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS y se empleó el anticuerpo secundario con fluorocromo: anticonejo acoplado a FITC desarrollado en cabra (Invitrogen, USA), 1:500 en PBS y se dejó incubar en la obscuridad durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavadas las muestras 3 veces con PBS. En seguida, el botón celular fue diluido en PBS para leer en el citómetro de flujo FACS Aria II. Finalmente, los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las células provenientes de líneas celulares de CaCU, fueron sembradas y estimuladas con el DDTC a la concentración de CI_{50} correspondiente en placas de plástico de 48 pozos con 400 µl de RPMI-1640 suplementado al 5 % de NCS. Después del tiempo requerido del estímulo (después de 5, 4, 3, 2, 1 y ½ horas); las células fueron cosechadas, lavadas con PBS complementado al 5 % de NCS y recuperadas por condición en tubos para citómetro completando el volumen a 1 ml. A continuación, fue agregado a cada tubo (con excepción del control sin marca) 1 µl del reactivo 2'7' diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) disuelto en etanol 2 µM y se dejó incubar durante 30 minutos. Después del tiempo requerido, al control positivo se le agregó 102 µl de peróxido de Hidrógeno (H_2O_2 ; tecsiquim, Mex.) al 30 % y se dejó incubar por 10 minutos para finalmente leer las muestras en el citómetro FACS Aria II; los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Resultados

Actividad antiproliferativa del DDTC en células tumorales

Con el propósito de establecer el efecto antiproliferativo del DDTC en las células tumorales, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto y la concentración requerida del DDTC que induce un decremento del 50% en la densidad celular (CI_{50}) fue elegida del gráfico. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (figura 12, 13 y 14).

El DMSO, se utilizó en todos los experimentos para comprobar que el efecto obtenido en las diferentes pruebas, es debido al compuesto y no al vehículo en el que el compuesto es disuelto.

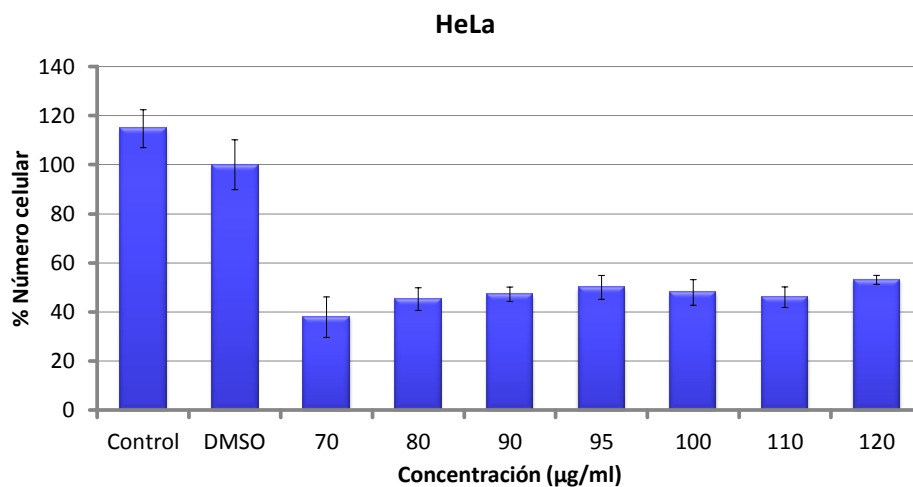


Figura 12. Efecto del DDTC a diferentes concentraciones en células HeLa mostrando la CI_{50} a la concentración de 95 µg/ml. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de DDTC durante 24 h, dando un tiempo total de cultivo de 48 h. Control, células sin tratamiento; DMSO, 5 µl/ml. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

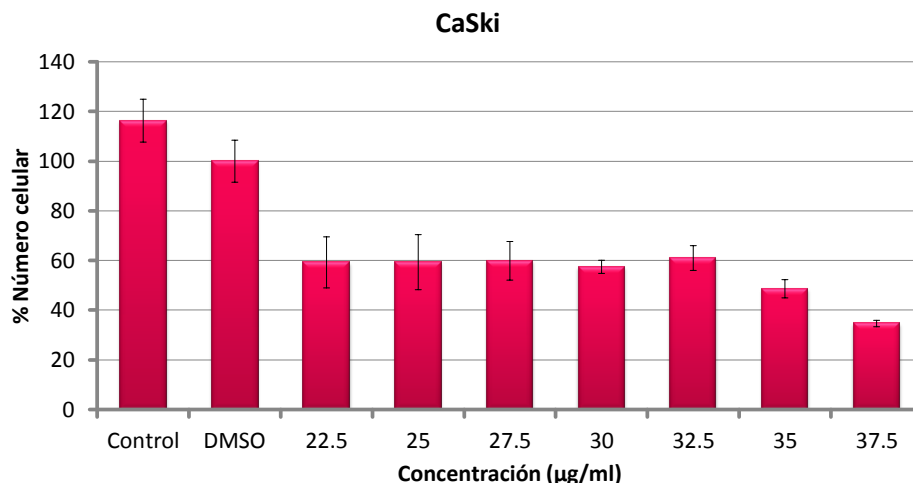


Figura 13. Efecto del DDTC a diferentes concentraciones en células CaSki mostrando la CI_{50} a la concentración de 35 µg/ml. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de DDTC durante 24 h, dando un tiempo total de cultivo de 48 h. Control, células sin tratamiento; DMSO, 2µl/ml. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

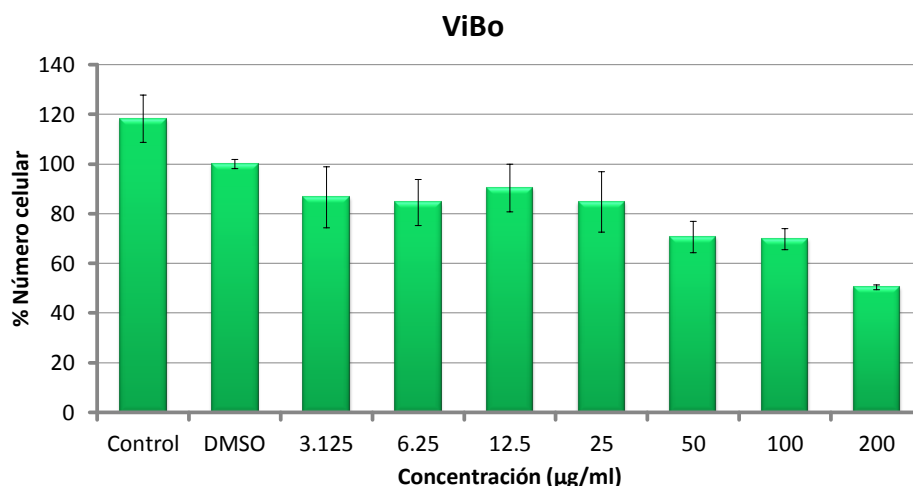


Figura 14. Efecto del DDTC a diferentes concentraciones en células ViBo mostrando la CI_{50} a la concentración de 200 µg/ml. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células /pozo) durante 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de DDTC por 24 h, dando un tiempo total de cultivo de 48 h. Control, células sin tratamiento; DMSO, 10 µl/ml. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

Los resultados obtenidos en las figuras 12, 13 y 14 establecen que el DDTC afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, sin embargo, a pesar que las tres líneas celulares son de cáncer cérvico uterino, presentaron una respuesta diferente en cuanto a la concentración requerida de DDTC que induce un decremento del 50 % en el número celular (CI_{50}), observando que en células HeLa la

concentración más aproximada al 50 % fue de 95 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para las células CaSki y ViBo fue de 35 y 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, sugiriendo que la magnitud de la respuesta al DDTC podría ser dependiente de la línea celular.

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

Para la confirmación de las CI_{50} , cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de 95, 35 y 200 $\mu\text{g/ml}$ y el número celular fue determinado a través de la técnica de tinción con el colorante cristal violeta (figura 15).

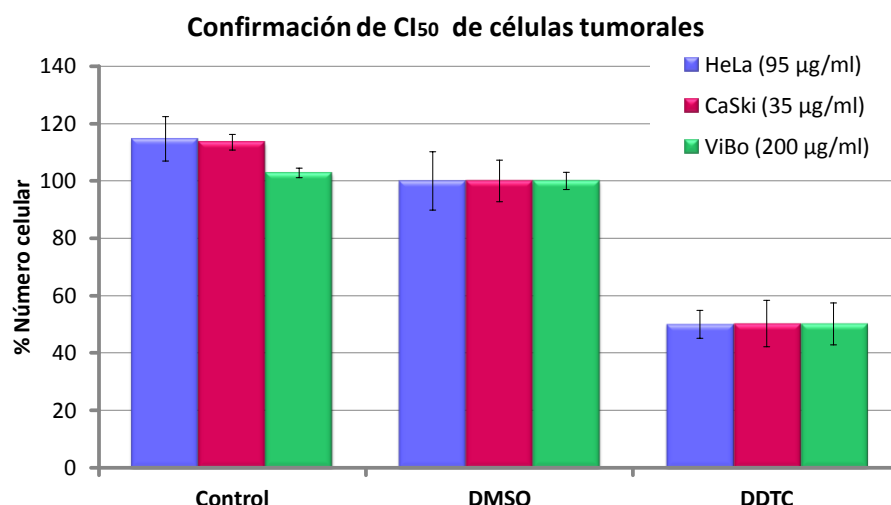


Figura 15. Efecto del DDTC en las líneas celulares de CaCU a las concentraciones de CI_{50} correspondiente. Las células fueron cultivadas según correspondan para cada ensayo por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas durante 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas a la concentración máxima correspondiente a la concentración de DMSO; DDTC, células con el tratamiento respectivo de CI_{50} para cada línea celular. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos en la figura 15 confirman las CI_{50} elegidas para el DDTC en las tres líneas tumorales induciendo un efecto antiproliferativo aproximado del 50 %.

Actividad antiproliferativa del DDTC en células no tumorales

Con el fin de establecer si el DDTC afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica y fibroblastos humanos de cérvix, fueron tratados con diferentes concentraciones de DDTC y el porcentaje de proliferación en los cultivos fue determinado mediante el marcaje celular con carboxifluoresceína a través de citometría de flujo y tinción con cristal violeta respectivamente (figura 16 y 17).

Proliferación de Linfocitos

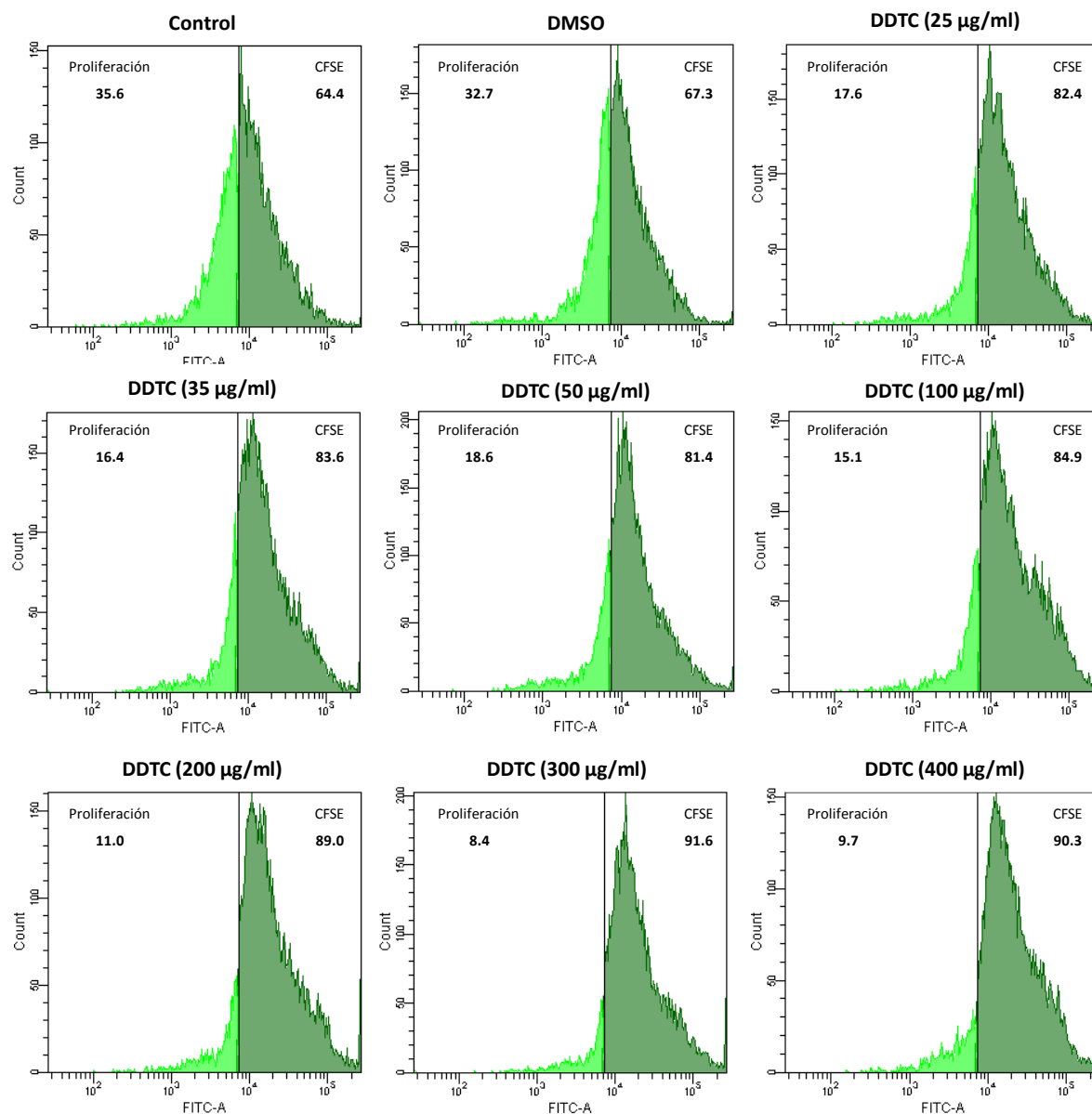


Figura 16. Efecto antiproliferativo del DDTc en las células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (200,000 células/pozo) durante 72 horas; posteriormente fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 2 % para ser leídas por citometría de flujo. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 10 µg/ml de DMSO; DDTc, células tratadas a diferentes concentraciones expresadas en µg/ml. El número celular fue evaluado por la técnica de carboxifluoresceína por citometría de flujo. Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

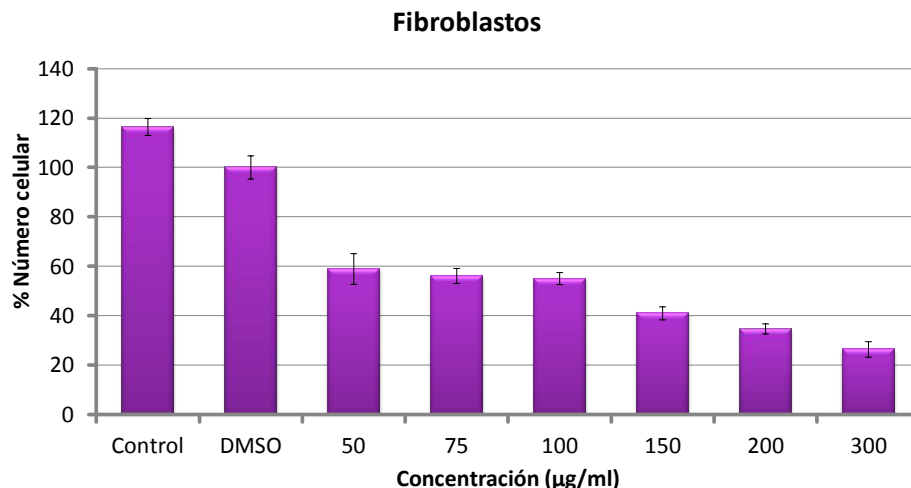


Figura 17. Efecto del DDTC en fibroblastos de cérvix. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (7,500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con DDTC durante 56 h, dando un tiempo total 80 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con la concentración máxima de 10 µg/ml; DDTC, células tratadas con diferentes concentraciones. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos en las figura 16 y 17 establecen que el DDTC afectó el potencial proliferativo de las células no tumorales de manera dosis dependiente, con una CI_{50} para fibroblastos de aproximadamente 100 µg/ml, mientras que en células linfocíticas el número celular fue abatido considerablemente en todas las concentraciones, indicando que la actividad antiproliferativa presente en el DDTC no diferencia entre células tumorales de no tumorales.

Actividad Citotóxica y/o Necrótica del DDTC en células tumorales

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica, caracterizada principalmente por inducir la pérdida de la integridad de la membrana celular, la cual también es una característica de muerte por necrosis. Con la intención de determinar si el DDTC presenta una actividad citotóxica (necrótica) sobre las líneas celulares de cáncer cérvico uterino y células normales; cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de su CI_{50} respectiva. La integridad de la membrana citoplasmática fue evaluada mediante evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos y mediante la incorporación celular de yoduro de propidio (IP) (figura 18, tabla 1, figura 19, 20, 21, tabla 2).

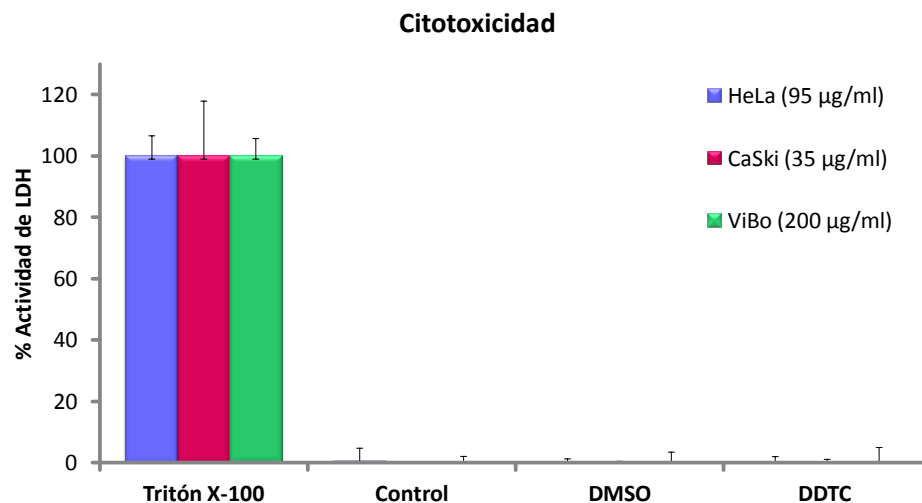


Figura 18. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células de CaCU tratadas con el DDTC. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (7,500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron estimuladas con DDTC durante 24 h, dando un tiempo total de cultivo de 48 h. Para el control positivo las células fueron permeadas con Tritón X-100; mientras que el DMSO, son células tratadas con la concentración máxima de DMSO utilizada para el tratamiento con DDTC correspondiente para cada línea celular. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

Línea celular	Tritón X-100	Control	DMSO	DDTC
HeLa	100	0.838	0	0
CaSki	100	0	0	0
ViBo	100	0	0	0

Tabla 1. Porcentaje de actividad de LDH en las células HeLa, CaSki y ViBo con los diferentes tratamientos.

Citotoxicidad por IP - HeLa

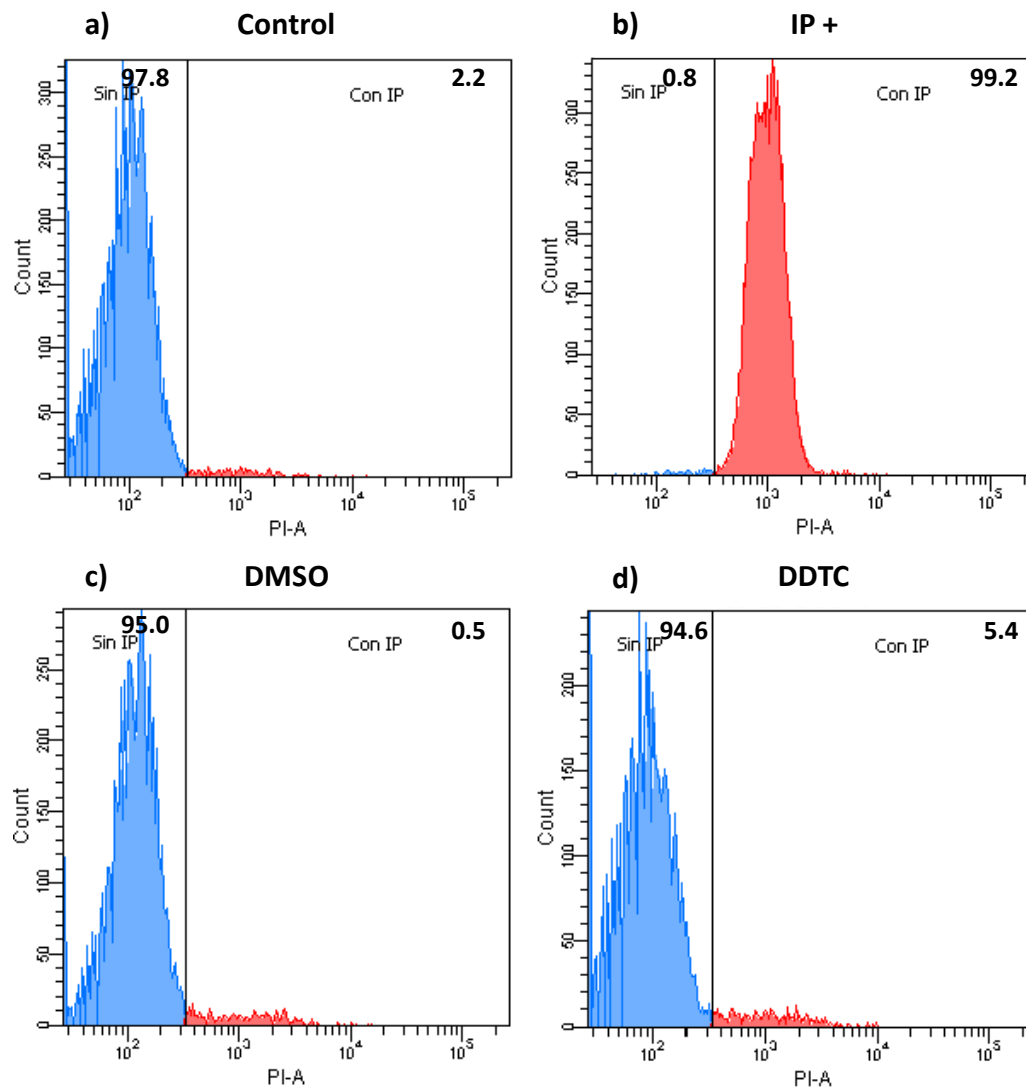


Figura 19. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con etanol al 70%, c) células tratadas con DMSO a la concentración de 5 μ l/ml, d) células tratadas con DDTC a la concentración de CI_{50} (95 μ g/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

Citotoxicidad por IP - CaSki

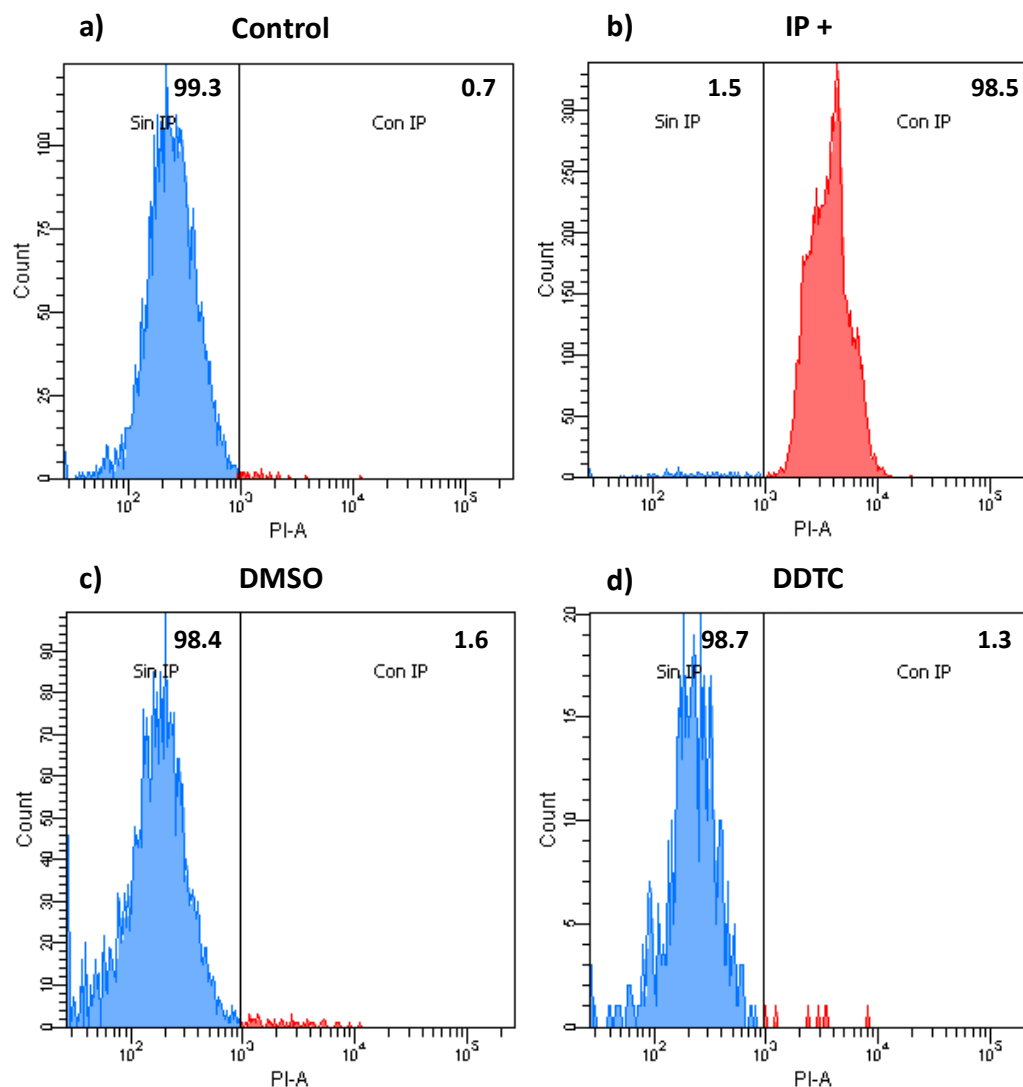


Figura 20. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células CaSki. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con etanol al 70 %, c) células tratadas con DMSO a la concentración de 2 μ l/ml, d) células tratadas con DDTC a la concentración de CI_{50} (35 μ g/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACS Aria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

Citotoxicidad por IP - ViBo

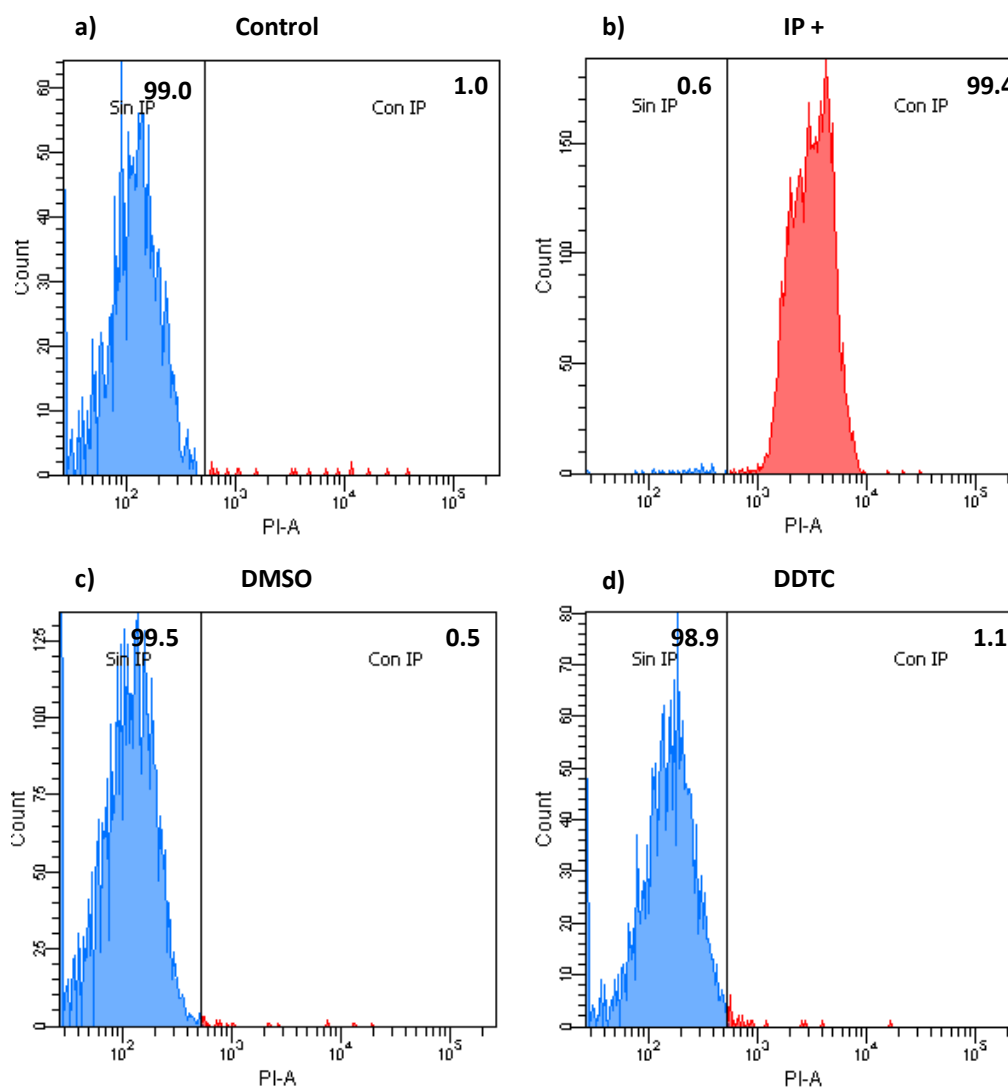


Figura 21. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con Etanol al 70%; c) células tratadas con DMSO a la concentración de 10 μ l/ml, d) células tratadas con DDTC a la concentración de CI_{50} (200 μ g/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

Como se puede apreciar en la figura 18, tabla 1, no se detectó actividad de LDH en los sobrenadantes provenientes de cultivos tratados y sin tratar con DDTC, coincidiendo con los resultados obtenidos en las figuras 19, 20, 21 y tabla 2, donde la incorporación celular de IP no fue significativa, indicando que el DDTC no afecta la integridad de la membrana

citoplasmática de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a las concentraciones de CI_{50} respectivas para cada línea celular, es decir, la actividad antiproliferativa presente en el DDTC es debida a una actividad no citotóxica o necrótica.

Línea celular	Control	IP +	DMSO	DDTC
HeLa	2.2	99.2	0.5	5.4
CaSki	0.7	98.5	1.6	1.3
ViBo	1.0	99.4	0.5	1.1

Tabla 2. Actividad citotóxica y/o necrótica del DDTC en células tumorales de CaCu. Los valores fueron determinados mediante la técnica de incorporación celular de IP.

Actividad Citotóxica y/o Necrótica del DDTC en células no tumorales

Para una comparación de la acción citotóxica de un compuesto probado en células tumorales, es recomendable evaluar el efecto en células no tumorales; para ello se realizó la evaluación de la actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica humana y fibroblastos de cérvix estimulados con la máxima concentración de CI_{50} para células tumorales (200 $\mu\text{g/ml}$) (figura 22, 23, tabla 3).

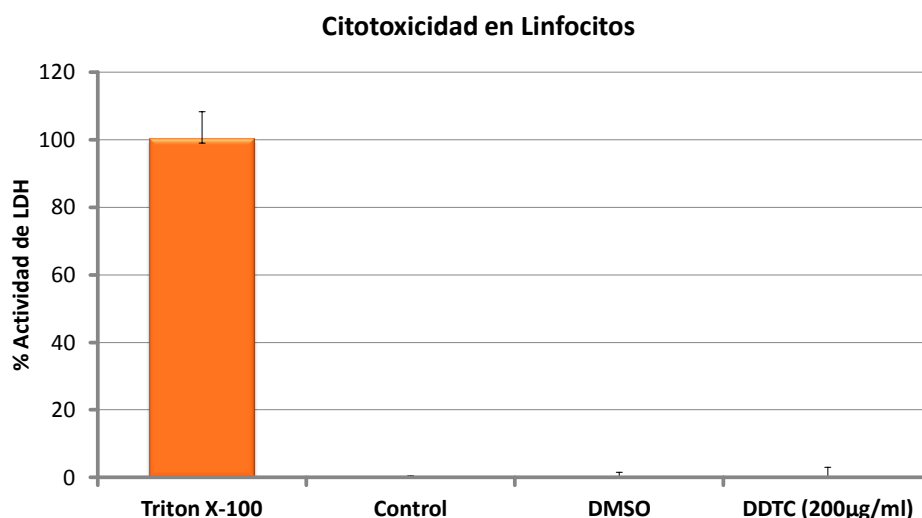


Figura 22. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos de sangre periférica humana tratados con DDTC. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (200,000 células/pozo) durante 72 horas; posteriormente fueron recuperados los sobrenadantes para evaluar la actividad de LDH. Para el control positivo las células fueron permeadas con Tritón X-100; control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$; DDTC, células tratadas con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

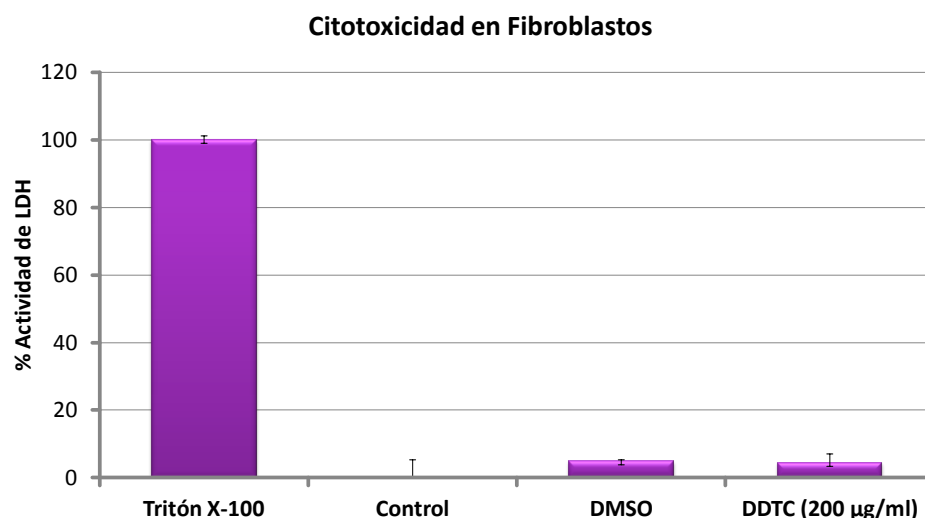


Figura 23. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos fibroblastos de cérvix tratados con DDTC. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (7500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con DDTC durante 56 h, dando un tiempo total 96 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; para el control positivo las células fueron permeadas con Tritón X-100; DMSO, células tratadas con 10 µg/ml; DDTC, células tratadas con 200 µg/ml. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

	Tritón X-100	Control	DMSO	DDTC (200 µg/ml)
linfocitos	100	-	-	-
fibroblastos	100	-	4.78	4.35

Tabla 3. Porcentaje de actividad de LDH de células no tumorales con los distintos tratamientos.

Al igual que en las células tumorales, no se detectó actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos de células linfocíticas y fibroblásticas, indicando que el efecto antiproliferativo del DDTC en células fibroblásticas es debido a un proceso celular diferente a una actividad citotóxica y/o necrótica.

Efecto en la morfología celular y nuclear en células tumorales

Cuando las células son inducidas a una muerte apoptótica, presentan cambios en su morfología, entre ellos la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, entre otras características. Con la intención de establecer si el DDTC induce apoptosis en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el DDTC a las concentraciones de CI_{50} respectivas para cada línea celular y la

morfología celular así como la condensación y/o fragmentación de la cromatina nuclear fue determinada mediante microscopia de contraste de fases y tinción con el compuesto fluorescente DAPI respectivamente (figura 24, 25 y 26).

Los resultados obtenidos en las figuras 24a,c,e, 25a,c,e y 26a,c,e, establecen que el DDTC afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo, observando en las fotografías de contraste de fases que las células no tratadas presentan forma poliédrica con proyecciones citoplasmáticas, en su totalidad se encuentran bien adheridas con citoplasma abundante, casi transparente, los núcleos tienen forma redonda y bien definida ocupando poco más de la mitad del volumen celular y con nucléolos bien delimitados (cuadro en figuras 24a,c, 25a,c y 26a,c). La observación de núcleos marcados con DAPI, muestran núcleos con una forma esférica de bordes bien definidos, los puntos más brillantes correspondientes a la cromatina perinucleolar son numerosos, de tamaños diversos y se encuentran distribuidos en toda el área del núcleo (círculo en figuras 24b,d, 25b,d y 26b,d). Sin embargo, las células tratadas con el DDTC presentan forma redonda, de menor tamaño, con el volumen del citoplasma reducido hasta ser casi imperceptible (*pyknosis*), con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas características de la adhesión celular, indicando una disminución de la adherencia, los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos (flechas en figuras 24e, 25e y 26e). La observación de núcleos marcados con DAPI, muestran núcleos de menor tamaño y/o fragmentados que indican condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del DNA, los puntos más brillantes han desaparecido casi totalmente y algunos de estos núcleos presentan una morfología arriñonada indicando cuerpos apoptóticos (punta de flechas en figuras 24f, 25f y 26f). Las características morfológicas observadas en las células tratadas con el DDTC son similares a las observadas en los cultivos estimulados con la camptotecina, la cual es un compuesto que ha sido descrito como inductor de muerte apoptótica en diferentes líneas tumorales, sugiriendo que el DDTC induce a las células tumorales de CaCu a expresar una morfología de células apoptóticas (figuras 24g,h, 25g,h y 26g,h).

Fragmentación de ADN – DAPI HeLa

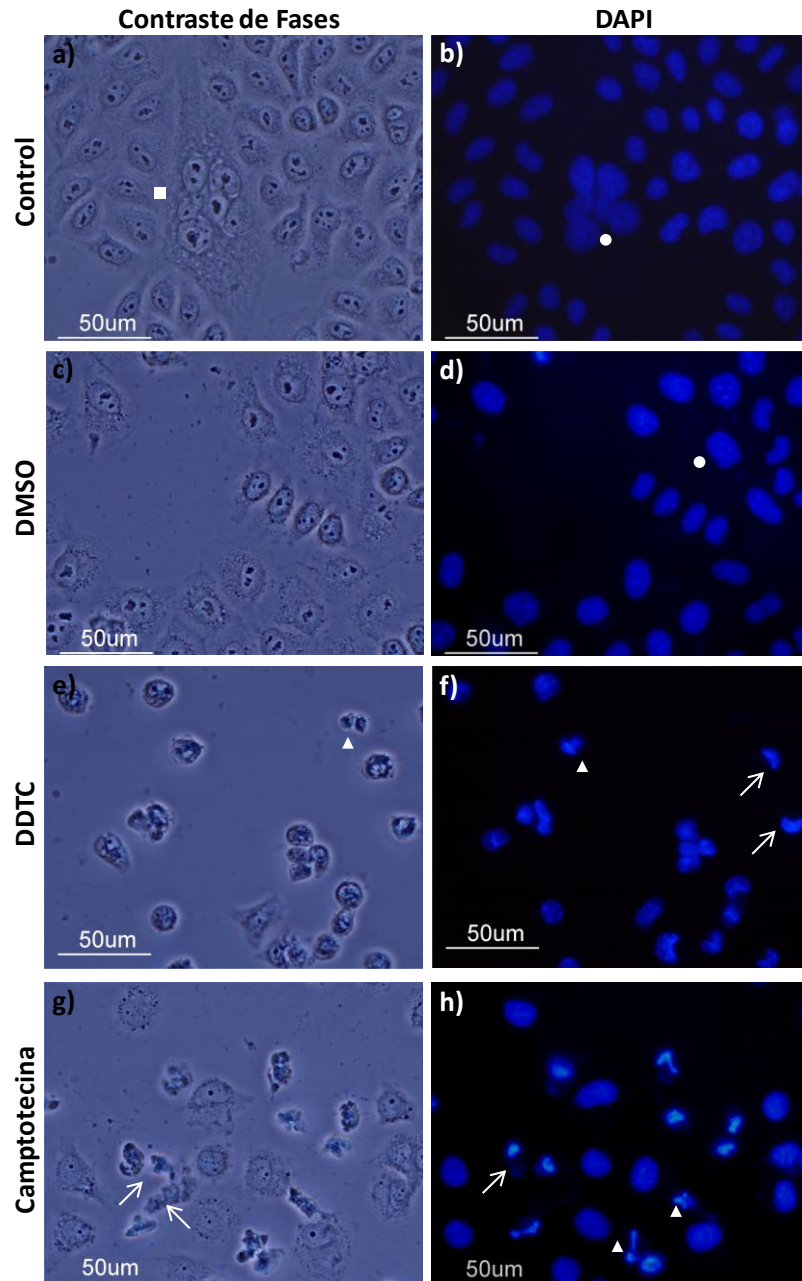


Figura 24. Micrografía óptica de células HeLa con tinción de núcleos con DAPI. El contraste de fases permite observar la morfología general de las células. El control y DMSO presentan un núcleo y citoplasma extendido. Después del tratamiento con DDTC y Camptotecina se observa la contracción celular y la compactación del núcleo (flechas); así como la formación de cuerpos apoptóticos (punta de flechas), los cuales son evidenciados con DAPI. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos (750,000 células/ plato de cultivo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con DDTC durante 24 h, dando un tiempo total 48 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 5 µg/ml de DMSO; DDTC, células tratadas con la Cl_{50} respectiva (95 µg/ml); camptotecina, células tratadas con camptotecina (2 µg/ml) como control positivo de apoptosis. Ensayo representativo de al menos tres.

Fragmentación de ADN – DAPI CaSki

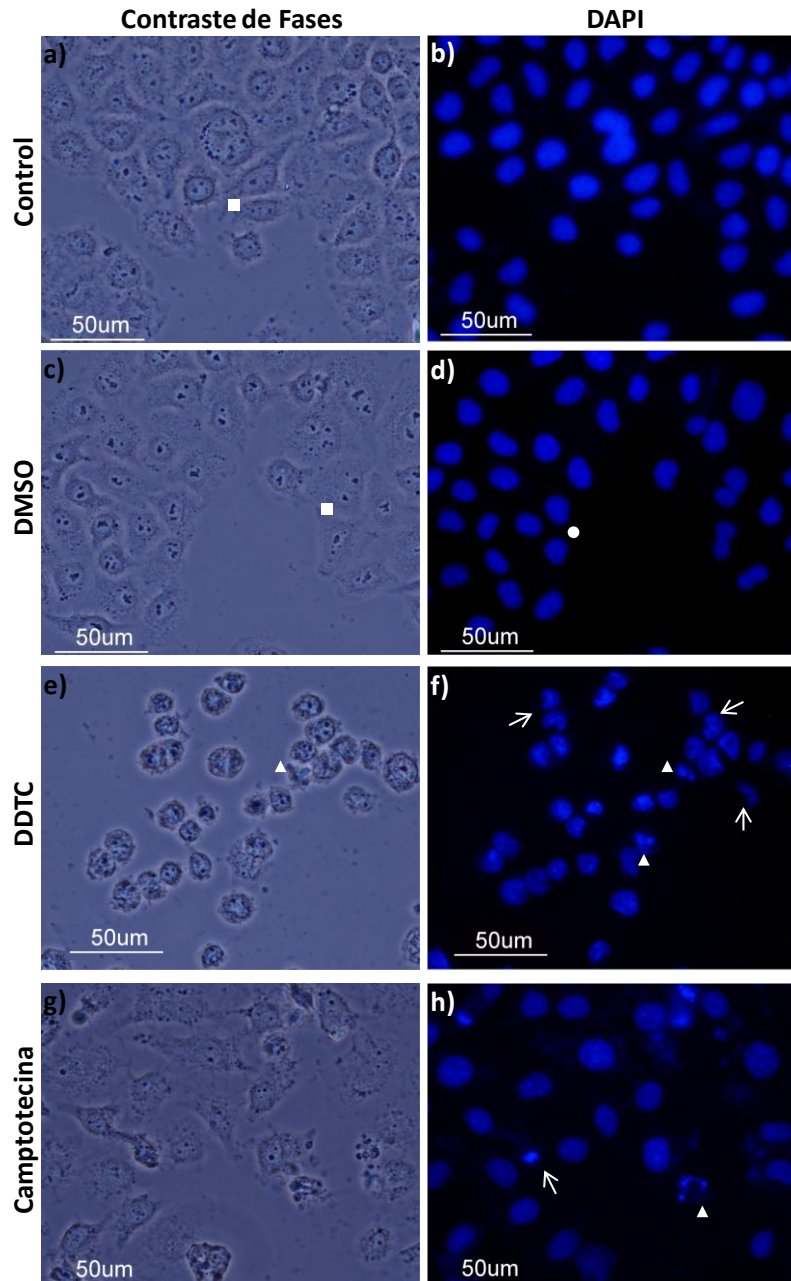


Figura 25. Micrografía óptica de células CaSki con tinción de núcleos con DAPI. El contraste de fases permite observar la morfología general de las células. El control y DMSO presentan un núcleo y citoplasma extendido. Después del tratamiento con DDTC y Camptotecina se observa la contracción celular y la compactación del núcleo (flechas); así como la formación de cuerpos apoptóticos (punta de flechas), los cuales son evidenciados con DAPI. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos (750,000 células/ plato de cultivo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con DDTC durante 24 h, dando un tiempo total 48 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 2 µg/ml de DMSO; DDTC, células tratadas con la CI_{50} respectiva (35 µg/ml); camptotecina, células tratadas con camptotecina (6 µg/ml) como control positivo de apoptosis. Ensayo representativo de al menos tres.

Fragmentación de ADN – DAPI ViBo

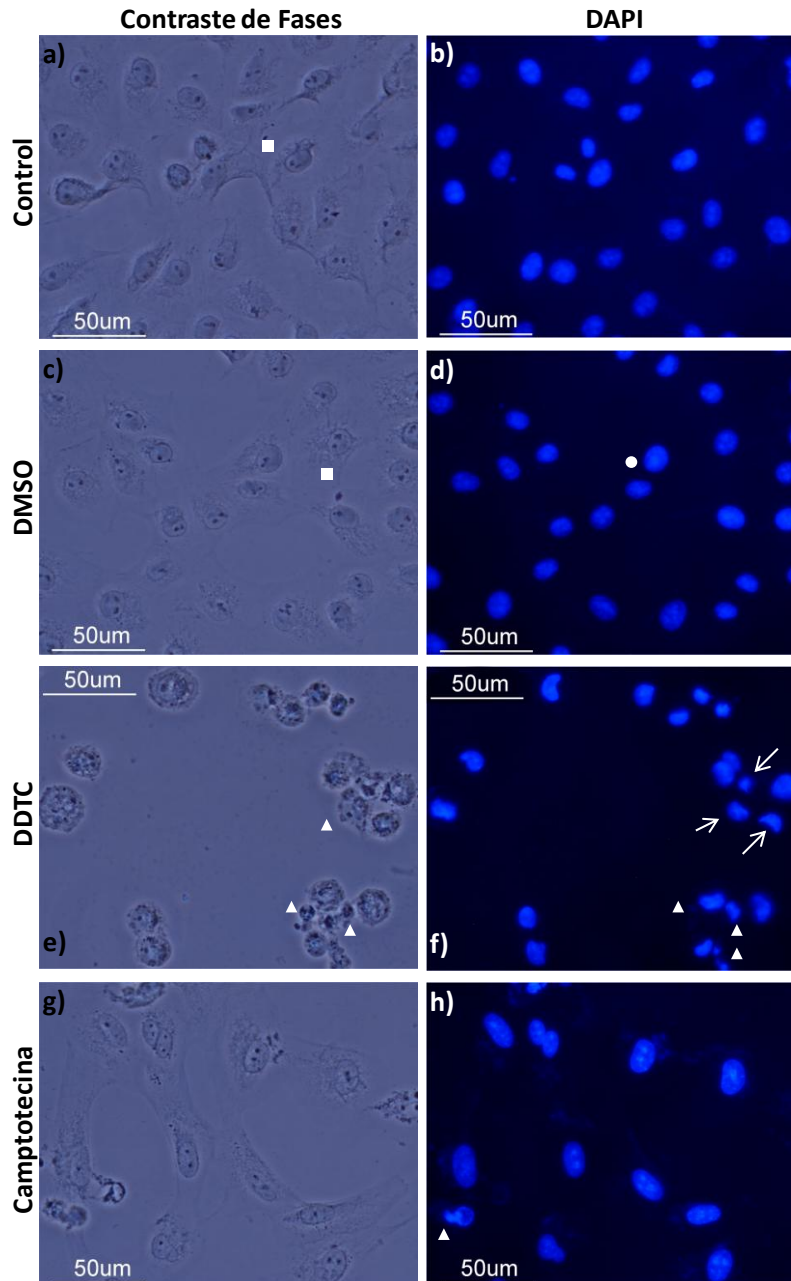


Figura 26. Micrografía óptica de células ViBo con tinción de núcleos con DAPI. El contraste de fases permite observar la morfología general de las células. El control y DMSO presentan un núcleo y citoplasma extendido. Después del tratamiento con DDTC y Camptotecina se observa la contracción celular y la compactación del núcleo (flechas); así como la formación de cuerpos apoptóticos (punta de flechas), los cuales son evidenciados con DAPI. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos (750,000 células/ plato de cultivo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con DDTC durante 24 h, dando un tiempo total 48 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 10 µg/ml de DMSO; DDTC, células tratadas con la Cl_{50} respectiva (200 µg/ml); camptotecina, células tratadas con camptotecina (2 µg/ml) como control positivo de apoptosis. Ensayo representativo de al menos tres.

Expresión de caspasa-3 activa

Con el fin de concluir que el DDTC induce a las células tumorales a una muerte apoptótica y partiendo del hecho que el DDTC induce a las células tumorales a expresar una morfología celular y nuclear característica de células apoptóticas, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el DDTC a las concentraciones de CI_{50} respectivas para cada línea celular y la expresión de la caspasa-3 activa fue evaluada por citometría de flujo (figuras 27, 28, 29 y tabla 4).

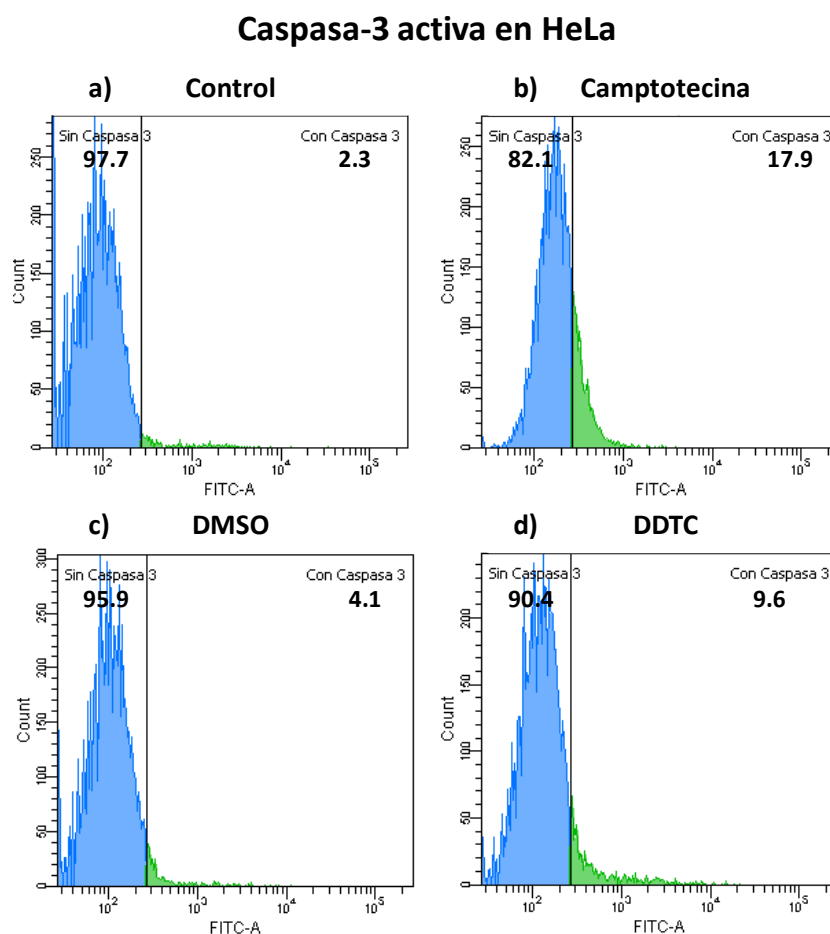


Figura 27. Efecto del DDTC el células HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; consecutivamente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, para finalmente ser leídas en el citómetro de flujo. a) control, células sin tratamiento; b) células tratadas con la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina; c) DMSO, células tratadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de DMSO; DDTC, células tratadas con la concentración de CI_{50} (95 $\mu\text{g/ml}$). Valores expresados en porcentaje. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

Caspasa-3 activa en CaSki

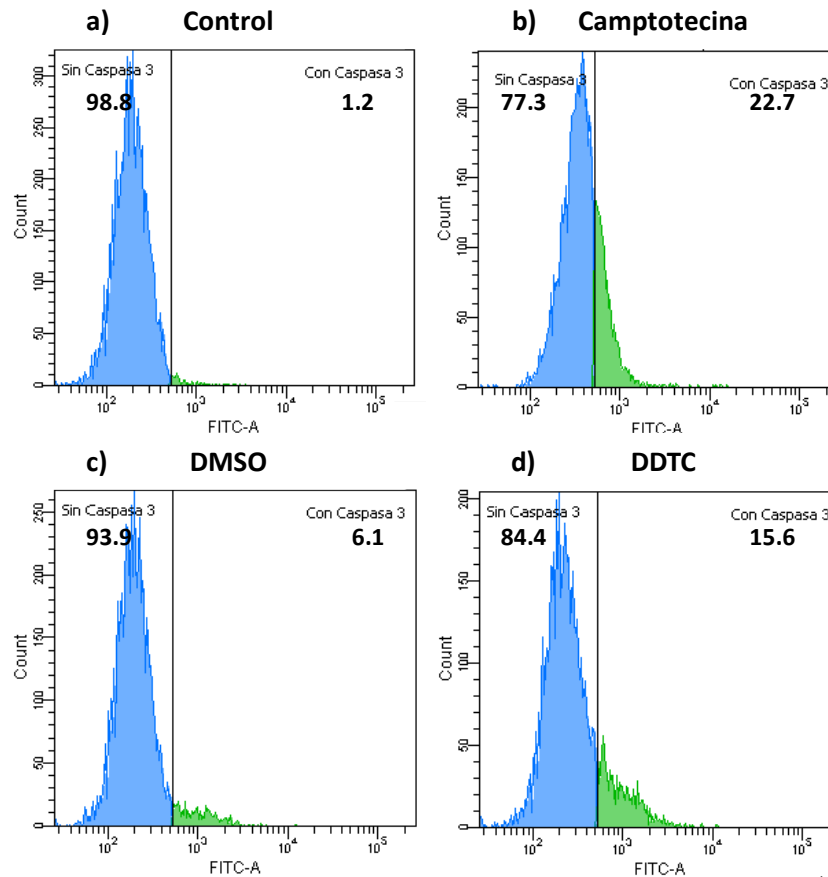


Figura 28. Efecto del DDTC en células CaSki. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; posteriormente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, para finalmente ser leídas en el citómetro de flujo. a) control, células sin tratamiento; b) células tratadas con la concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina; c) DMSO, células tratadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de DMSO; DDTC, células tratadas con la concentración de CI_{50} (35 $\mu\text{g/ml}$). Valores expresados en porcentaje. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

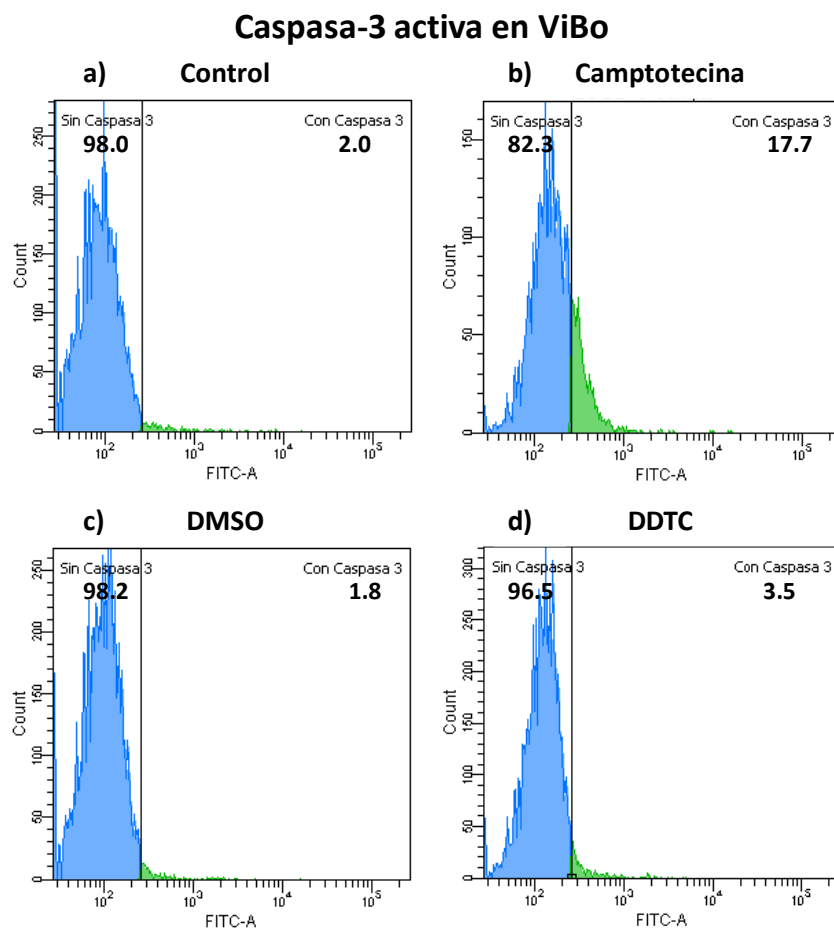


Figura 29. Efecto del DDTC en células ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; posteriormente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, para finalmente ser leídas en el citómetro de flujo. a) control, células sin tratamiento; b) células tratadas con la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina; c) DMSO, células tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de DMSO; DDTC, células tratadas con la concentración de Cl_{50} (200 $\mu\text{g/ml}$). Valores expresados en porcentaje. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACSaria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial.

Los valores obtenidos para la activación de caspasa-3 activa se resumen en la tabla 3.

Línea celular	Control	Camptotecina	DMSO	DDTC
HeLa	2.3	17.9	4.1	9.6
CaSki	1.2	22.7	6.1	15.6
ViBo	2.0	17.7	1.8	3.5

Tabla 4. Valores correspondientes a la activación de la caspasa-3 con diferentes tratamientos en células de CaCu.

Los resultados obtenidos en las figuras 27, 28 y 29 muestran que el DDTC induce a las células tumorales a expresar caspasa 3 activa en un rango de 3.5 a 15.6%, indicando un bajo efecto inductor de la actividad de esta caspasa.

Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Es conocido que las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden generar tanto la necrosis como la apoptosis. Con el propósito de determinar si la muerte celular generada por el DDTC induce un estrés oxidativo en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, éstas fueron sembradas y tratadas con las CI_{50} obtenidas para cada línea y la generación de ERO provenientes de H_2O_2 fueron cuantificadas por citometría de flujo (figura 30).

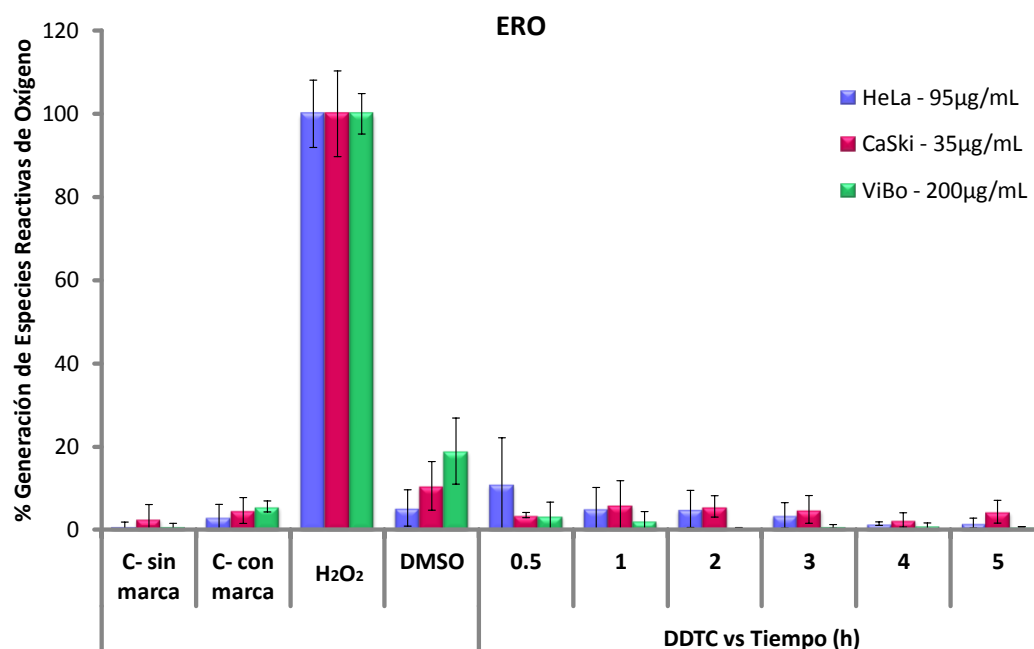


Figura 30. Inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el DDTC. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; posteriormente fueron cosechadas e incubadas con DCF-DA durante 30 min. Control sin marca, células sin tratamiento y sin DCF-DA; Control con marca, células sin tratamiento con DCF-DA; H_2O_2 , células sin tratamiento, con DCF-DA y con H_2O_2 incubado 10 min adicionales como control positivo; DMSO, células tratadas con DMSO a una concentración de 5, 2 y 10 µg/ml correspondiente a HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, con DCF-DA; DDTC, células tratadas con la concentración de CI_{50} correspondiente para cada línea celular del compuesto durante ½, 1, 2, 3, 4 y 5 horas. Todos los controles son evaluados a las 5 horas de tratamiento. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular.

Como se puede apreciar en la figura 30, la generación de ERO en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el DDTC no fue significativa, indicando que la inducción de muerte observada en las células tumorales es debida a un evento diferente a la generación de ERO.

Discusión de resultados

La búsqueda de compuestos de origen vegetal o animal con propiedades antitumorales ha generado un fuerte interés en los últimos años, sobre todo, en aquellos que son derivados de fármacos conocidos y usados clínicamente con otros fines, a los cuales se les ha realizado modificaciones estructurales, dando origen a derivados o análogos de éstos.

Investigaciones recientes acerca de los Ditiocarbamatos (el DSF y sus metabolitos), indican que poseen diversas actividades biológicas, entre las que destacan la inhibición del proteosoma en células tumorales (Yu *et al.*, 2007), del crecimiento tumoral (Chen *et al.*, 2006), de factores de transcripción como NFκB (Guo *et al.*, 2010), y la inducción de apoptosis en diferentes líneas celulares (Wickström *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que son capaces de formar complejos con el Cu^{2+} , incrementando su actividad inhibidora del proteosoma así como de su actividad inductora de apoptosis (Chen *et al.*, 2004).

En el caso del Dietilditiocarbamato sódico (DDTC), los datos obtenidos en el presente trabajo, revelan que este compuesto presenta un efecto inhibitorio en líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 95, 35 y 200 $\mu\text{g/ml}$ equivalentes a 554.58, 204.32 y 1167.54 μM respectivamente. Para el caso de Caski y ViBo se observa que con un aumento de concentración, presentan un comportamiento dosis-dependiente, a mayor concentración, menor número celular. Sin embargo para las células HeLa, un pequeño incremento en la dosis, aumenta ligeramente el número celular, de tal manera que a las concentraciones de 70, 95 y 120 $\mu\text{g/ml}$ les corresponden valores de proliferación de 38, 50 y 53 % respectivamente; lo cual corresponde a lo reportado con Dumay (2006), en donde se muestra que el Dietilditiocarbamato presenta un efecto antagonista inhibiendo a la muerte celular.

Las concentraciones utilizadas de DDTC para las células tumorales se ha observado que son altas, comparadas con otros compuestos pertenecientes a la familia de carbamatos.

El DSF cuenta con propiedades antiproliferativas en diversas líneas celulares a diferentes concentraciones, como en la línea de melanoma humana A-375, con una CI_{50} de 0.168 μM (Cen *et al.*, 2002), la línea tumoral de próstata DU-145 con una CI_{50} de 0.026 μM (Lin *et al.*, 2010); para células de mama se requiere un rango para la CI_{50} de 0.110 a 0.476 μM (Yip *et al.*,

2011); en células de melanoma c81-46A y en leucemia mieloide U937, la viabilidad se afecta casi un 50 % con una concentración de 1348.61 μM (Cen *et al.*, 2002; Navrátilová *et al.*, 2009); en células de cáncer de próstata PC-3, la sobrevivencia celular se ve afectada con 100 μM (Moriyama *et al.*, 2003); una concentración de 0.4 μM induce la actividad de las caspasas 3 y 7 en células HeLa, volviéndose tóxica a una concentración de 40 μM (Wickström *et al.*, 2007). Por otro lado, el DDC promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) en células HeLa a una concentración de 10-100 μM (Dumay *et al.*, 2006). El Pyrrolidin Ditiocarbamato (PDTC) presenta actividad antiproliferativa en células de leucemia promielítica humana HL-60 del 40 % a la concentración de 10 μM (DellaRagione *et al.*, 2000). Lo anterior muestra que los carbamatos tienen efecto a distintas concentraciones, dependiendo del tipo celular que se esté evaluando. En el presente trabajo hemos observado que las concentraciones necesarias del DDTC (análogo del metabolito del DDC) son mayores que las cantidades utilizadas de DSF, las cuales fluctúan de acuerdo a la línea celular. Sin embargo, a pesar de ser altas, los efectos citotóxicos que ejerce sobre las líneas celulares evaluadas no son significativos.

Debido a que algunos agentes terapéuticos usados contra el cáncer afectan tanto a células normales como a células tumorales, es importante evaluar la selectividad del compuesto, para catalogarse como más o menos eficientes. En el presente trabajo se evaluó la selectividad del DDTC determinando el efecto en la proliferación celular de linfocitos y fibroblastos. Para el caso de los linfocitos de sangre periférica humana, se observa que las concentraciones de DDTC utilizadas afectan fuertemente el potencial proliferativo de las células. Sin embargo, los fibroblastos de cérvix se ven afectados disminuyendo su número celular al 55 % a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$; indicando que los linfocitos son más sensibles al compuesto. Son pocos los reportes de Ditiocarbamatos que comparan el efecto de las células tumorales y células normales en las mismas condiciones. Cabe destacar que el DSF presenta una acción antiproliferativa e inductora de apoptosis selectiva en las células de tumor de mama MDA-MB-231, mientras que las células inmortalizadas MCF-10A (consideradas en el mismo ensayo como normales) bajo las mismas condiciones no se ven afectadas (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.

A diferencia del DSF que provoca necrosis en células de melanoma c83-2c, observando una incorporación de IP a un 48 % (Cen *et al.*, 2002) y la pérdida de la integridad de la membrana en células HeLa (Wickström *et al.*, 2007); el DDTC no presentó actividad citotóxica en las

células tumorales ni en las no tumorales, indicando que el decremento observado en las células es por un proceso diferente a la necrosis. Por lo tanto su efecto no provoca una respuesta inflamatoria, generando la posibilidad de que en caso de que genere algún efecto secundario, sería de menor magnitud en comparación a los del DSF y sus metabolitos. Tal efecto permite una acción antitumoral silenciosa, lo que hace del DDTC un buen candidato para ser estudiado como agente quimioterapéutico. Es importante resaltar que el efecto inductor de apoptosis presente en estos ditiocarbamatos, genera la ventaja de no inducir un estado inflamatorio, ya que no se activa la respuesta inmunológica, mientras que en pacientes tratados con quimio y radioterapia se presenta una inmunosupresión (Torrella y García, 2004).

El efecto del DDTC observado en el presente trabajo sobre la morfología celular es considerable, ya que adquiere características correspondientes a la muerte por apoptosis; tal es el caso para las células de cáncer de colon H630, en donde el efecto del DSF es potenciado con la adición de Cu^{2+} , mostrando células de forma heterogénea (tanto alargadas como redondas), con un núcleo celular bien definido y compacto (Guo *et al.*, 2010). Para el cáncer colorectal de humano el efecto del DSF es mejor apreciado al mostrar células totalmente redondas y es manifestada la formación de cuerpos apoptóticos (Wang *et al.*, 2003).

Para hacer una correcta evaluación del tipo de muerte celular, es necesario tomar varios parámetros para su análisis, entre ellos los aspectos moleculares (Galluzzi *et al.*, 2011), la expresión de caspasas y la generación de especies reactivas de oxígeno. En el presente trabajo hemos observado que el DDTC induce la activación de la caspasa-3 en las diferentes líneas celulares de CaCU en diferente proporción.

En cuanto a la cantidad de ERO generada por el DDTC cambia con respecto al tiempo, ya que la generación máxima corresponde a las primeras dos horas después del tratamiento disminuyendo paulatinamente hasta llegar a niveles basales a las cinco horas. Sidoti-de Fraisse y cols. (1998) proponen que la inducción de apoptosis a través de la producción de ERO en estados tempranos está involucrada en células HeLa a través de $\text{TNF-}\alpha$ de la vía extrínseca de la apoptosis. Una producción temprana de ERO en la mitocondria implica la aceleración de la muerte celular (Sidoti-de Fraisse *et al.*, 1998).

El tipo de muerte celular provocada por varios de los miembros de la familia de carbamatos es clara. Al respecto, se conoce que el DSF induce una muerte por apoptosis en células leucémicas (Cen *et al.*, 2004) y en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-321 (Chen *et*

al., 2006). Sus metabolitos PDTC y DDC inducen apoptosis en células de cáncer de mama (Daniel *et al.*, 2005) y en líneas leucémicas (Kanno *et al.*, 2003), respectivamente. Sin embargo el trabajo realizado por Dumay (2006) en células HeLa demuestra que el DDC tiene funciones antagonistas con respecto a la apoptosis, ya que a bajas concentraciones (10-100 μM) conduce a las células a la muerte celular, pero los altos niveles de DDC (250-500 μM) tiene propiedades antiapoptóticas. Por otro lado, se ha observado que este mismo metabolito (DDC) en células leucémicas HL60, una concentración de 1000 μM , provoca necrosis (Kimoto-Kinoshita *et al.*, 2004). Nuestros resultados con DDTC han mostrado que a pesar de que las concentraciones utilizadas para disminuir en un 50 % la población celular tumoral son altas (200-1100 μM), no hay presencia de necrosis y que al mismo tiempo, tales concentraciones no sobrepasan el 10 % de la activación de la caspasa-3; sin embargo es apreciada una morfología de tipo apoptótica.

Los resultados del presente trabajo muestran que el DDTC induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte celular tipo apoptótica a las concentraciones de 554.5 μM , 204.32 μM y 1167.54 μM respectivamente afectando considerablemente a las células no tumorales; sin embargo, no es detectable la muerte por necrosis.

Con respecto a su mecanismo de acción, es conveniente establecer si el efecto antiproliferativo del DDTC está asociado a genes, como c-myc, a proteínas reguladoras del ciclo celular como Rb o p53 entre otras, con la intención de esclarecer y completar su mecanismo de acción, dándole a este tipo de compuestos una aplicación terapéutica para el CaCU o para otros tipos de cáncer.

Conclusiones

- La concentración de Dietilditiocarbamato sódico en que se abate el 50% del número celular (Cl_{50}) en cultivos de células tumorales fue de 95, 35 y 200 $\mu\text{g/ml}$ para las células de CaCU HeLa, CaSki y ViBo respectivamente.
- La concentración de Cl_{50} correspondiente a las células no tumorales es de 100 $\mu\text{g/ml}$ para fibroblastos de cérvix; mientras que para linfocitos de sangre periférica humana son afectados al 80 % a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.
- El efecto del DDTC no promueve la actividad citotóxica (muerte necrótica) en cultivos de células de CaCU, linfocitos de sangre periférica humana y fibroblastos de cérvix.
- El Dietilditiocarbamato sódico induce la compactación celular y de la cromatina, con una ligera fragmentación de ADN en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
- El Dietilditiocarbamato sódico, induce la activación de la caspasa-3 en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo con valores de 9.6, 15.6 y 3.5 % respectivamente.
- El compuesto Dietilditiocarbamato sódico a la concentración de Cl_{50} induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las primeras 2 horas después de tratamiento con valores máximos del 6 % y se reduce en las siguientes tres horas hasta valores de 1 %.

Bibliografía y referencias

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K. y Warter P; (2008). Biología molecular de la célula (5ª ed.) España: Omega., Pp. 1-2, 1208.
- Alnemri E; Livingston D; Nicholson D; Salvesen G; Thornberry N; Wong W. y Yuan J; (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Journal Cell*, 87 (2): 171.
- Alonso P; Lazcano E. y Hernández M; (2005). Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control (2ª ed.) Argentina: Médica Panamericana., Pp. 14.
- Anand A; (2011). Lo esencial en patología (3ª ed.) España: Elsevier Mosby., Pp. 15.
- Atanassova D; Stefanova V. y Russeva E; (1998). Co-precipitative pre-concentration with sodium diethylditiocarbamate and ICP-AES determination of Se, Cu, Pb, Zn, Fe, Co, Ni, Mn, Cr and Cd in water. *Talanta*, (47): 1237-1243.
- Bennington J; (2000). Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico (19ª ed.) Argentina: Médica Panamericana., Pp. 126.
- Brar S; Grigg C. y Wilson K; (2004). Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metaldependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Molecular Cancer Therapeutics*, (3): 1049-1060.
- Cabo M; Jiménez M; Zarzuelo A; Crovetto G. y Gómez M; (1996). Dietilditiocarbamato sódico: acciones hipoglucemiante y antioxidante. *Ars Pharm*, 37 (1): 69-72.
- Campbell N. y Reece J., (2007). Biología (7ª ed.) España: Médica Panamericana. Pp. 229.
- Cen D; Gonzalez R; Buckmeier J; Kahlon R; Tohidian N; Meyskens F; (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1 (3): 197-204.
- Chen D; Cui Q; Yang H. y Dou P; (2006). Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and

- Xenografts via inhibition of the Proteasome Activity. *Cancer Research*, (66): 10425-10433.
- Cen D; Brayton D; Shahandeh B; Meyskens F. y Farmer P; (2004). Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J. Med. Chem.*, (47): 6914-6920.
- Cobby J; Mayersohn M. y Selliah S; (1977). The rapid reduction of Disulfiram in blood and plasma. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 202 (3): 724-731.
- Cooper G. y Hausman R; (2009). *The Cell: A Molecular Approach* (5ª ed.) Estados Unidos: Sinauer Associates Inc., Pp. 650.
- Cuello F; Kato C; Sadarangani K; Saez S; Gejman E; Owen G. y Lipkowitz S; (2006). Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducidas por el ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos (boletín escuela de medicina) Universidad de Chile, 31(1): 5-15.
- Curtin J; Donovan M. y Cotter T; (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods*, 265 (1-2): 49-72.
- Dale M; Rang H; Ritter J; Flower R. y Henderson G; (2012). *Farmacología* (7ª ed.) España: Elsevier, Pp. 71.
- Daniel K; Chen D; Orlu S; Cui Q; Miller F. y Dou Q; (2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer*, (7): 897-908.
- Dazhi C; González R; Buckmeier J; Kahlon R; Tohidian N. y Meyskens F; (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 1 (3): 197-204.
- DellaRagione F; Cucciolla V; Borriello A; Della Pietra V; Manna C; Galletti P. y Zappa V; (2000). Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Academic Press*, 268 (3): 942-946.
- Di Saia P. y Creasman W; (2002). *Oncología Ginecológica Clínica* (6ª ed.) España: Harcourt; Pp. 24-30.

- Dubin M. y Stoppani A; (2000). Muerte Celular Programada y Apoptosis-Función de las Mitocondrias. *Medicina*, 60 (3): 375-386.
- Dumay A; (2006). The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*, 40 (8): 1377-1390.
- Eifel P; (2010). Radioterapia (4) En: Bereck J. y Hacker N., Oncología ginecológica (5ª ed.) España: Wolters Kluwer, Lippincott Williams y Wilkins. Pp. 83-120.
- Fleury C; Mignotte B. y Vayssiere J; (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *J. Biochimie*, (84): 131–141.
- Gal B; López M; Martín A. y Prieto J; (2007). Bases de la Fisiología (2ª ed.) España: Tebar, Pp. 12-13.
- Galluzzi A; Vitale I; Abrams J; Alnemri E; Baehrecke E; Blagosklonny M; Dawson T; Dawson V; El-Deiry W; Fulda S; Gottlieb E; Green D; Hengartner M; Kepp O; Knight R; Kumar S; Lipton S; Lu X; Madeo F; Malomi W; Mehlen P; Nuñez G; Peter M; Piacentini M; Rubinsztein S; Shi Y; Simon H; Vandenabeele P; White E; Yuan J; Zhivotovsky B; Melino G. y Kroemer G; (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *J. Cell death and differentiation*. Pp. 1-14.
- Gil L; Martinez G; Gonzalez I; Tarinas A; Alvarez A; Giuliani A; Molina R; Tapanes R; Perez J. y Leon O; (2003). Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol. Res.*, (47): 217–224.
- Gogvadze V. y Orrenius S; (2006). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem. Biol. Interact.*, (163): 4-14.
- González R; (2000). Utilidad de los tiocarbamatos (morfolinditiocarbamato): Vías de acción. *Revista Cubana de Oncología*, 16 (1): 54-63.
- Gourley M. y Williamson J; (2006). Angiogenesis inhibitors: New agents in cancer therapy. *Drugs Aging*, (17): 249-255.
- Guo X; Xu B; Pandey S; Goessl E; Brown J; Armesilla A; Darling J. y Wang W; (2010). Disulfiram/copper complex inhibiting NFκB activity and potentiating cytotoxic

- effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Letters*, 290 (1): 104-113.
- Grub S; Trommer W. y Wolf A; (2002). Role of antioxidants in the O-hydroxyethyl-D-(Ser)8-cyclosporine A (SDZ IMM125)-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, (64): 1725-1736.
- Hanahan D. y Coussens L; (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, (21): 309-322.
- Hanahan D. y Weinberg R; (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, (144): 646-674.
- Hyun-Ji C; Tae-Sung L; Jae-Bok P; Kwan-Kyu P; Jung-Yoon C; Doo-Il S; Yoon-Yub P; Yong-Suk M; Kwang-Gill L; Joo-Hong Y; Sang-Mi H; Young-Su C; Myeong-Rak C; Nam-Gyu P; Yun-Sik L. y Young-Chae C; (2007). Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (6): 1069-1076.
- Hu P., Jin L. y T. Baillie (1997). Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat: Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. *Journal Pharmacology*, 281 (2): 611-617.
- Hubbard V; Valdor R; Macian F. y Cuervo A; (2012). Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. *Biogerontology*, 13 (1): 21-35.
- Jones D; Podolsky S. y Greene J; (2012). The Burden of Disease and the Changing Task of Medicine. *N Engl. J. Med*; 366 (25): 2333-2338.
- Kanno S; Matsukawa E; Miura A; Shouji A; Asou K. y Ishikawa M; (2003). Diethyldithiocarbamate-induce cytotoxicity and apoptosis in leukemia cell lines. *Biological & Pharmaceutical*, 26 (7): 964-968.
- Karp G; (2011). Biología celular y molecular: conceptos y experimentos (6ª ed.) China: Mc Graw Hill Interamericana. Pp. 651.
- Kerr J; Wyllie A. y Currie A; (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, 26 (4): 239-257.

- Kierszenbaum A. y Tres L; (2011). Núcleo (3) En: Hiatt J. y Gartner L., *Histología básica* (3ª ed.) España: Elsevier. Pp-716.
- Kimoto-Kinoshita S., Nishida S., Tomura T., (2004). Diethyldithiocarbamate can induce two different type of death: Apoptosis and necrosis mediating the differential MAP kinase activation and redox regulation in HL60 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265 (1-2): 123-132.
- Kirkland R; Windelborn J; Kasprzak J. y Franklin J; (2002). A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J. Neuroscience*, 22 (15): 6480–6490.
- Kourí B. y Mitrovic D; (2010). La apoptosis en la fisiopatología de la osteoartritis (17). En: Quintero F; Monfort M. y Mitrovic D. Osteoartritis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento (1ª ed.) España: Médica Panamericana. Pp. 189.
- Kroemer G; Galluzzi A; Vandenabeele P; Abrams J; Alnemri E; Baehrecke E; Blangosklonny M; El-Deiry W; Golstein P; Green D; Hengartner M; Knignht R; Kumar S; Lipton S; Malorni W; Nuñez G; Peter M; Tschopp J; Yuan J; Piacentini M; Zhivotovsky B. y Melino G; (2008). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell Death 2009. *J. Cell death and differentiation*, 1 (9): 1-8.
- Kueng A; Silber E. y Eppenberger U; (1989). Quantification of cells cultures on 96-Well Plates. *Analytical Biochemistry*, 182 (1): 16-19.
- Lancaster J; Laster S. y Gooding L; (1989). Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Letters*, 248 (1-2): 169-174.
- Lin H; Wang X; Shaffer K. y Sasaki C; (2004). Characterization of H₂O₂-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. *FEBS Letters*, 570 (1-3): 102-106.
- Liu G; Frank N; Bartsch H. y Lin J; (1998). Induction of Apoptosis by Thiuramdisulfides, the Reactive Metabolites of Dithiocarbamates, through Coordinative Modulation of NFκB, c-fos/c-jun, and p 53 Proteins. *Molecular Carcinogenesis*, 22 (4): 235-246.

- Lizarbe M; (2007). El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 101 (2): 1-29.
- Löevborg H; Öberg F; Rickardson L; Gullbo J; Nygren P. y Larsson R; (2006). Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *International. Int. Journal of Cancer*, 118 (6): 1577-1580.
- López A; y Lizano M; (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del Papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología* (1ª ed.) México: Instituto Nacional de Cancerología. Pp. 31- 55.
- Halliwell B., y Gutteridge J., (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2ª ed.) Reino Unido: Clarendon Press Oxford Pp. 316.
- MacFarlane M; (2009). Cell death pathways: potential therapeutic targets. *Xenobiotica*, 39 (8): 616-624.
- Markman M; (2010). Quimioterapia (Capítulo 3). En: *Oncología ginecológica de Bereck J. y Hacker N.*, (5ª ed.) España: Wolters Kluwer, Lippincott Williams y Wilkins. Pp. 57-82.
- Medan D; Wang L; Toledo D; Lu B; Stehlik C; Jiang B; Shi X. y Rojanasakul Y; (2005). Regulation of Fas (CD95)-induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. *J. Cell. Physiol.*, 203 (1): 78-84.
- Melnikova A. y Golden J; (2004). Apoptosis-targeting therapies. *Nature Rev. Drug Discov*, 3 (11): 903-905.
- Montalvo G; Coronel J; Alvarado A; Cantú D; Flores D; Ortega A; González A; Isla D; Muñoz D; Robles J; Solorza G; Mota A; Gallardo D; Morales F; Cetina M. y Herrera A; (2011). *Oncoguía: Cáncer Cervicouterino. Cancerología*, (6). México: Instituto Nacional de Cancerología. Pp. 61-69.
- Monroy G; Rangel C; Rocha Z; Trejo B; Ramírez G; Martínez R; Weiss-Steider B; (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, 7: 69-76.

- Moriyama-Gonda N; Igawa M; Shiina H; Urakami S. y Terashima M; (2003). Decreased survival of prostate cancer cells in vitro by combined treatment of heat and antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate (DDC). *Exp Toxic Pathol*, 55: 251-256.
- Morgan S. y Darling D; (1995). Cultivo de células animales. España: Acribia. Pp. 155.
- Müller W; (2008). Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida (1ª ed.) España: Reverte. Pp. 453-456.
- Navrátilová S; Jungová P; Vanhara J; Knichy V. y Smarda J; (2009). Cooper ions regulate cytotoxicity of disulfiram to myeloid leukemia cells. *International journal of molecular medicine*, 24: 661-670.
- OMS, UNICEF, Banco mundial; (2009). Vacunas e inmunización: situación mundial (3ª ed.) Suiza: Organización Mundial de la Salud. Pp. 129-130.
- Oshima Y; Kuroda Y; Kunishige M; Matsumoto T. y Mitsui T; (2004) Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. *Muscle Nerve*, 30 (1): 49-54.
- Paniagua R; (2007). Biología celular. (3ª ed.) España: McGRAW-HILL.
- Passarge E; (2010). Genética: Texto y atlas (3ª ed.) España: Médica Panamericana. Pp. 126.
- Pecorino L; (2012). Molecular Biology of cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics (ea ed.) Reino Unido: Universidad de Oxford. Pp. 2-3.
- Pecorelli S; Zigliani L. y Odicino F; (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Revista de Ginecología y Obstetricia*, 105 (2): 107-108.
- Pierce B; (2010). Genética: Un enfoque conceptual (3ª ed.) España: Médica Panamericana. Pp.10.
- Porter A. y Jänicke R; (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 6 (2): 99-104.
- Porter A. y Urbano A; (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? *Bioessays*, 28 (8): 834-843.

- Quah B. y Parish C; (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments JoVE*, 44: 2259.
- Quah B. y Parish C; (2012). New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods*, 379 (1): 1–14.
- Ramírez J. y González C; (2003). Acido desoxirribonucleico, DNA (1). En: Jiménez L. y Merchant H; (2003). *Biología celular y molecular* (1ª ed.) México: Pearson Educación. Pp. 595.
- Rang H; Dale M; Ritter J; Flower R. y Henderson G; (2012). *Farmacología* (7ª ed.) España: Elsevier. Pp. 72.
- Rickardson L; Wickstroem M; Larsson R; Löevborg H; (2007). Image-based screening for the identification of novel proteasome inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*, 12 (2): 203-210.
- Ryan C. y Wilding G; (2000). Angiogenesis inhibitors: New agets in cancer therapy. *Cancer*, 17 (4): 249-255.
- Salazar M; (2010). *Tratado de Psicofarmacología: Bases y Aplicación clínica*, España: Médica Panamericana. Pp. 315.
- Sánchez S; (2001). Mecanismos Reguladores de la Muerte Celular no Necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20 (4): 266-274.
- Schinoni I. y Paraná R; (2006). Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterol Latinoam.*, 36 (4): 211-217.
- Schreck R; Rieber P. y Baeuerle P; (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, 10 (8): 2247-2258.
- Schulze-Osthoff K; Bakker A; Vanhaesebroeck B; Beyaert R; Jacob W. y Fiers W; (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.*, 267 (8): 5317-5323.

- Shen H. y Pervaiz S; (2006). TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution. *Faseb J.*, 20 (10): 1589-1598.
- Sidoti-de Fraisse C; Rincheval V; Risler Y; Mignotte B. y Vayssiere J; (1998). TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene*, 17 (13): 1639-1651.
- Silverthorn D; (2008). Fisiología Humana: un enfoque integrado (4ª ed.) Argentina: Médica Panamericana. Pp. 107.
- SSA, Secretaría de salud, (2011). Base de egresos hospitalarios 2010; e INEGI (2011). Censo de población y vivienda 2010. Cubos dinámicos. Procesó INEGI.
- Tatti S; (2008). Colposcopia y Patologías del tracto genital inferior - en la era de la vacunación (1ª ed.) Argentina: Médica panamericana. Pp. 15.
- Torrella A. y García N; (2004). Inmunoterapia en melanoma. *Oncología*, 27 (3): 102-107.
- Vázquez E. y Justo M; (2011). Bases Anatomopatológicas de la enfermedad quirúrgica - Tomo II (1ª ed.) Estados Unidos: Eduardo Vázquez Valdés. Pp. 478.
- Velázquez M., Andrade M., Lagunas M. y Zajgla M., (2004). SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis. *Revista de Educación Bioquímica*, 23 (2): 64-70.
- Wang W; McLeod H. y Cassidy J; (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF-κB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 104 (4): 504-511.
- Wickström M; Danielsson K; Rickardson L; Gullbo J; Nygren P; Isaksson A; Larsson R. y Löuborg H; (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*, 71: 25-33.
- Yu Z; Wang F; Malawi V; Li X; Cui Q; Zhang B; Yan B. y Dou Q; (2007). Evaluation of copper-dependent proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities of novel pyrrolidine dithiocarbamate analogue. *International Journal of Molecular Medicine*, 20: 919-925.
- Zaldívar-Machorro V; Demare P; Ramírez M; Regla I. y Muñoz C; (2006). Inhibitory Effects of Disulfiram and Its Metabolites on *Pseudomonas aeruginosa* Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Growth. *Biochimie*, 93: 286-295.

Zhou J; Sun X. y Stenzel D; (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 185 (1): 251-257.

Zuben E; Suneet S. y Suresh V; (2005). Disulfiram and old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Molecular Biosystems*, 2 (1): 127-134.

REFERENCIAS

Ciclo celular. (n. d.). Consultado el 15 de octubre de 2012. Educación, Temas De Estudio acerca de ciencia, Ciclo Celular, División Celular, Interfase y Mitosis: <http://www.acercaciencia.com/2012/10/15/ciclo-celular/>.

Ginebra (2003). Informe mundial sobre el cáncer. Consultado el 23 de marzo de 2013. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS): <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/es/>.

GLOBOCAN (2008); IARC, Agencia Internacional de Investigación del cáncer (OMS, 2010). Consultado el 24 de febrero de 2013: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.

Humanity First (2011); Programmed Cell Death – APOPTOSIS. Consultado el 23 de octubre de 2012: <http://medicinembbs.blogspot.mx/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>.

INEGI (2011). Cáncer, tercera causa de muerte en México. Reporte informativo de Laura Toribio. Consultado el 24 de febrero de 2012: <http://www.reporte.com.mx/cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>.

Instituto Nacional de Cancerología E.U.A. (NCI), (2013). Definición de cáncer: Consultado el 8 de febrero de 2013: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/>.

Organización Mundial de la Salud (OMS), (2008). Nota descriptiva N°297. Consultado el 6 de marzo de 2013: <http://www.who.int/mediacentre/>.

Real Academia española (RAE), (2013). Definición de cáncer (Qué es, significado y concepto). Consultado el 9 de marzo de 2013: <http://definicion.de/cancer/#ixzz2N5y7cDJcen>.

Science photo library (2012). Consultado 13 de julio de 2012: <http://www.sciencephoto.com>; Londres, Inglaterra.

Apéndice

Líneas celulares de cáncer cérvico uterino (CaCU)

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

Composición del RPMI-1640 (Microlab, Mex.)

Los medios nutritivos para cultivo de células animales contienen de manera balanceada los nutrientes mínimos requeridos para la proliferación celular, tales como los siguientes:

Componente	g/L
Sales Inorgánicas	
Nitrato de Calcio tetrahidratado - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.1
Sulfato de Magnesio Anhídrido - SO_4Mg	0.4884
Cloruro de Potasio - KCl	0.4
Cloruro de Sodio - NaCl	6
Fosfato de Sodio Dibásico (Anhídrido) - Na_2HPO_4	0.8
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-Asparagina	0.05
L-Ácido Aspártico	0.02
L-Cisteína *2HCl	0.0652
L-Ácido Glutámico	0.02
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
L-Hidroxiprolina	0.02
L-Isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina *HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-Fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03

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

Medio de cultivo

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de potasio (KCl)	0.20 g (Sigma-Aldrich, USA)
Fosfato mono ácido de sodio (NaH_2PO_4)	2.16 g (Sigma-Aldrich, USA)
Fosfato di ácido de potasio (Na_2HPO_4)	0.20 g (Sigma-aldrich, USA)

El cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato mono ácido de sodio y el fosfato di ácido de potasio son disueltos en 100 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 8 Normal y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana con diámetro de poro de 22 μm , la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución es necesaria para el desprendimiento de las células tumorales adherentes (HeLa y CaSki) 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 [$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$]	3.04 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de potasio (KCl)	0.04 g (Sigma-Aldrich, USA)
Etilendiamino Tetraacético (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	0.40 g (Sigma-Aldrich, USA)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada; el pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico (HCl) 10 Normal y se afora en un volumen de 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Tripsina

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

Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % (m/v) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM a pH 6.0. Su preparación consiste en agregar 3.96 g de hidróxido de sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) 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, USA) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57°C durante 30 minutos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor uso y manipulación.

Glutaraldehído (1.1%)

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada. Finalmente es almacenado 4°C.

Solución de ácido acético (10%)

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

Paraformaldehído (2%)

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

Este trabajo fue presentado parcialmente en la “9ª reunión de Academia Mexicana de Química orgánica” en la modalidad de cartel, con el título de: Efecto antitumoral del Dietilditiocarbamato sódico en líneas celulares de cáncer cérvicouterino, que se llevó a cabo del 22 al 26 de Abril de 2013.



LA FACULTAD DE BIOANÁLISIS DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA,
CAMPUS PUERTO DE VERACRUZ Y LA
ACADEMIA MEXICANA DE QUÍMICA ORGÁNICA



otorgan el presente

Reconocimiento

a Viridiana Carolina Hernández Cruz, María Luisa Escobar Sánchez,
José Misael Vicente Hernández Vázquez, Hugo López Muñoz,
Ignacio Regla Contreras, Luis Sánchez Sánchez

por haber presentado el cartel “Efecto antitumoral del Dietilditiocarbamato sódico en líneas celulares de cáncer cervicouterino” dentro de la 9ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, que se llevó a cabo del 22 al 26 de abril de 2013.

Boca del Río, Veracruz.



Universidad Veracruzana
Facultad de Bioanálisis
Dirección

Beatriz Torres Flores

Dra. Beatriz Torres Flores
Directora de la Facultad de Bioanálisis
de la Universidad Veracruzana

Carolina Barrientos Salcedo

Dra. Carolina Barrientos Salcedo
Comité Organizador

José Mario Ordóñez Palacios

Dr. José Mario Ordóñez Palacios
Presidente de la AMQO



Efecto antitumoral del Dietilditiocarbamato sódico en líneas celulares de cáncer cérvico uterino

*Viridiana Carolina Hernández Cruz, **María Luisa Escobar Sánchez, *José Misael Vicente Hernández Vázquez, *Hugo López Muñoz, *Ignacio Regla Contreras, *Luis Sánchez Sánchez.

*Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230, México D.F., México, luiss@servicio.unam.mx;
**Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., México.



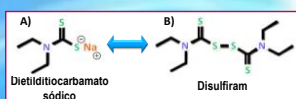
Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y específicamente el cáncer cérvico uterino (CaCu), siendo la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres¹ considerado un problema de salud grave.

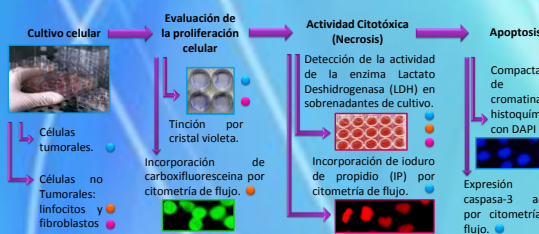
Los tratamientos (cirugía, radioterapia y quimioterapia), suelen ser poco selectivos, ineficientes en estados avanzados y provocan efectos secundarios; generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, existe un fuerte interés en evaluar la actividad antitumoral en fármacos conocidos, entre éstos se encuentran los Ditiocarbamatos, utilizados clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y en el tratamiento de adicciones (abuso del alcohol y cocaína)². Recientemente han sido propuestos como anti-cancerígenos e inductores de apoptosis en células cancerosas de pulmón, mama y próstata^{3,4}. Sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido y los reportes en relación al CaCu y células no tumorales no es claro.

Por lo cual, en el presente trabajo se evaluó el efecto antitumoral del Dietilditiocarbamato sódico (DDTC) (Fig.1), en células de cáncer cérvico uterino, HeLa, CaSi y ViBo, así como en células no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica y fibroblastos de cérvix).

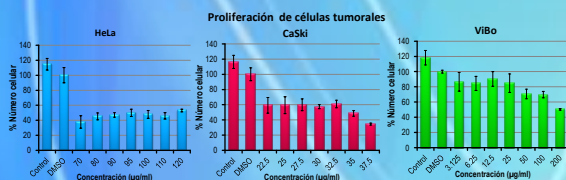
Figura 1. A) Estructura química del Dietilditiocarbamato sódico (unidad estructural del Disulfiram (B)).



Metodología



Resultados



Línea celular	Ciso (µg/ml)
HeLa	95
CaSi	35
ViBo	200

Figura 2. Curvas Dosis respuesta de células tumorales (HeLa, CaSi y ViBo) mostrando el efecto antiproliferativo del DDTC a diferentes concentraciones. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) y evaluadas por la técnica de cristal violeta después de 24 horas de tratamiento.

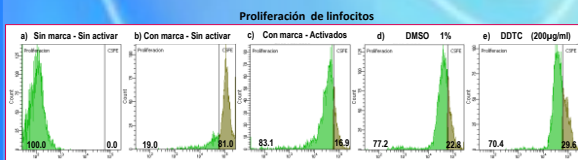


Figura 3. Efecto del DDTC en la proliferación de linfocitos Humanos. Los linfocitos fueron obtenidos de sangre periférica de donadores sanos, los cultivos fueron marcados con carboxifluoresceína y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo; donde se muestra la región de células no proliferantes (CFSE), y la región de células en proliferación. a) Linfocitos sin activar, sin CFSE; b) Linfocitos sin activar, sin CFSE; c) Linfocitos activados con fitohematoglutina; d) Células tratadas con DMSO 0.1%; e) Células tratadas con 200 µg/ml de DDTC. El DDTC afectó ligeramente el potencial proliferativo de células linfocíticas e un 7%.

Referencias y bibliografía

- OMS, 2012. Nota descriptiva N°297. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- Salazar M. Tratado de Psicofarmacología: Bases y Aplicación clínica. Médica Panamericana, 2010, p. 315.
- Chen D. Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and Xenografts via inhibition of the Proteasome Activity. *J. Cancer Research*, 2006 (66), p. 10425.
- Wickström M; Danielsson K; Rickardson L; Gulibo J; Nygren P; Isaksson A; Larsson R y Löuborg H. Pharmacological profiling of DSF using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharm*, 2007 (71), p. 25-33.

Proliferación de fibroblastos

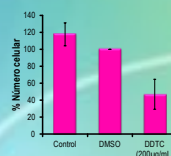


Figura 4. Efecto del DDTC en fibroblastos de cérvix humano. Las células fueron obtenidas de pacientes sin CaCu, se cultivaron en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) y fueron evaluadas por la técnica de tinción por cristal violeta después de 56 horas de tratamiento. La proliferación celular fue abatida en un 49.6%.

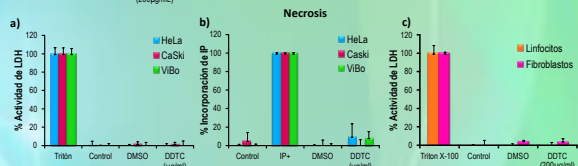


Figura 5. Actividad citotóxica del DDTC en células tumorales y no tumorales. a) y c) Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y evaluadas por la técnica de detección de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH); b) Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y evaluadas por la técnica de incorporación de yoduro de propidio (IP) mediante citometría de flujo. Las células tumorales fueron tratadas con DDTC a su concentración de Ciso correspondiente. La nula o baja detección de la enzima LDH en los cultivos tratados, así como la baja incorporación de IP, sugiere que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

Condensación de la cromatina

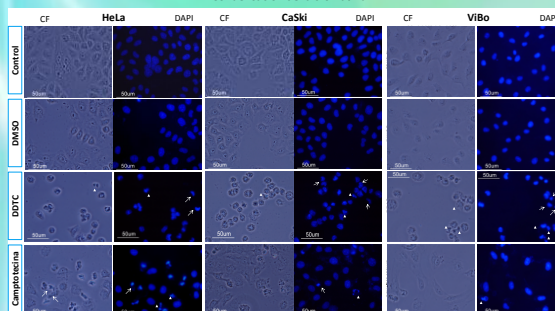


Figura 5. Micrografía de las células tumorales HeLa, CaSi y ViBo con tinción de núcleos con DAPI. El contraste de fases permite observar la morfología general de las células. El control y DMSO presentan un núcleo y citoplasma extendido. Después del tratamiento con DDTC y camptotecina se observa la contracción celular y la compactación del núcleo (flechas); así como la formación de cuerpos apoptóticos (punta de flechas), los cuales son evidenciados con DAPI. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos (750,000 células/plato de cultivo). Control, células sin tratamiento; DMSO, células tratadas con 5 µg/ml de DMSO; DDTC, células tratadas con la Ciso respectiva; camptotecina, células tratadas con camptotecina como control positivo de apoptosis.

Generación de caspasa-3 activa

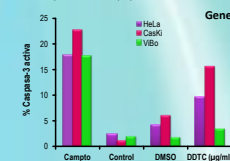


Figura 6. Activación de la caspasa-3 por el tratamiento con DDTC en células tumorales. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (30,000 células/pozo) y analizadas por la técnica de inmunofluorescencia por citometría de flujo. Los tratamientos con DDTC corresponden a la Ciso de cada línea celular, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo acoplado a FITC dejando incubarse durante tres horas a temperatura ambiente.

Conclusiones

- El DDTC afecta el potencial proliferativo de células tumorales de manera dosis dependiente.
- El DDTC reduce el número celular en un 50% en las líneas celulares HeLa, CaSi y ViBo a una concentración de 95, 35 y 200 µg/ml respectivamente.
- La concentración de C₅₀ de células tumorales afecta la proliferación de Linfocitos de sangre periférica humana en 6.8 %; mientras que en Fibroblastos de cérvix la proliferación es afectada en un 49.6 %.
- El efecto del DDTC no promueve la actividad citotóxica (muerte necrótica) en cultivos de células de CaCu, Linfocitos de sangre periférica humana y Fibroblastos de cérvix.
- El DDTC induce la compactación celular y de la cromatina, con una ligera fragmentación de ADN en las células tumorales HeLa, CaSi y ViBo.
- El Dietilditiocarbamato sódico, induce un incremento en la expresión de caspasa-3 activa en las líneas tumorales HeLa, CaSi y ViBo con valores de 9.6, 15.6 y 3.5 % respectivamente.