



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los metabolitos MeDDTC
y MeDDTC-SO del Disulfiram en células de cáncer cervicouterino**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA ELENA MEJÍA MONTOYA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los metabolitos MeDDTC
y MeDDTC-SO del Disulfiram en células de cáncer cervicouterino.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA ELENA MEJÍA MONTOYA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



OFICIO CPCB/021/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **MEJÍA MONTOYA MARÍA ELENA** con número de cuenta **89193204** con la tesis titulada "Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO del Disulfiram en células de cáncer cervicouterino", realizada bajo la dirección del **DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**:

Presidente: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de enero de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica y el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, laboratorio 6, 2do piso del edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Zaragoza que permitió realizar el trabajo experimental contenido en esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por el otorgamiento de la beca para el desarrollo de los estudios de maestría en el programa del Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM con número de Becario

A los miembros del comité tutor:

DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

Por su apoyo y asesoría que contribuyo a enriquecer este trabajo.

Y a los miembros del Jurado

Por la revisión de este trabajo, por sus observaciones y aportaciones que enriquecieron la presente Tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dr. Luis Sánchez Sánchez,

Gracias por permitirme tomar este proyecto que busqué y concebí desde que conozco la temática como el principal motivo para llevarlo a cabo y hacerlo una realidad, durante la formación como alumna de posgrado de Ciencias Biológicas. Por apoyarme, alentarme y corregirme no solo cuando se trata de trabajo, sino también en los momentos difíciles que se presentaron en mi vida personal durante la estancia que tuve en su laboratorio. Gracias por la calidez que nos brinda a todos día con día cuando nos corrige o aconseja en las decisiones difíciles que nos hacen titubear. ¡Gracias

A todos los que me brindaron su apoyo en el laboratorio donde realice este trabajo.

Al Dr. Hugo López Muñoz, M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, M. en C. Sergio Ivan Martínez Mata, Dr. Fernando Flores Guzmán, Dr. Octavio y Sofí gracias por tú apoyo.

A Edgar, Samy y Daniel.

Por su apoyo y confianza. Edgar gracias por hacerme saber tú admiración al buscar mis sueños y metas en mi formación profesional. Saben hijos que son mi mayor inspiración para ser un buen ejemplo para ustedes y nunca se den por vencidos, busquen sus sueños y terminen hasta el final las metas que se propongan en su vida.

A mis Hermanos

Benjamín, Adela, David, José, Jesús†, Emilio, Concepción, Isabel y Diego. Gracias por ser mis hermanos y apoyarme con su cariño, en los momentos difíciles que pasamos como familia, cuando realizaba este proyecto tan importante para mí.

DEDICATORIAS

A mis padres José Marciano Mejía Rodríguez † y María del Socorro Montoya Zendejas †

Para mi mamá...

María del Socorro Montoya Zendejas †

Este trabajo es tuyo y mío Mami, desde donde estés eres el mejor testigo que inicie este proyecto Feliz y motivada con tu presencia, estando conmigo en todo momento. Te lo dedico y sé que estarías muy orgullosa de mí al saber que lo termine y poder obtener un grado importante para mi vida profesional.

Se que estarás conmigo el día que presente mi examen.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los
proyectos

PAPIIT: IN216718 y IN220916
CONACyT 255881 y 253979

ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
Cáncer	4
Cáncer y Ciclo celular.....	5
Puntos de control del ciclo celular.....	5
Muerte Celular.....	6
Apoptosis	7
Necrosis	8
Cáncer cervicouterino.....	9
Tratamientos	12
Farmacocinética del Disulfiram.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Preparación de los compuestos.....	24
Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino	25
Cuantificación del número celular mediante la técnica de incorporación del colorante de cristal violeta.	25
Evaluación de Proliferación de linfocitos humanos por marcaje con carboxifluoresceína (CSFE).....	26
Determinación de la muerte celular por necrosis mediante la liberación de la enzima LDH en el sobrenadante de cultivos células tumorales de CaCu y de linfocitos humanos no tumorales.	27
Detección de cuerpos apoptóticos: Tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).	28
Inmunolocalización de la caspasa 3 activa por Inmunofluorescencia.....	29
Detección específica de la caspasa 3-activa en cultivos celulares por citometría de flujo.....	30
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	31
<i>Actividad antiproliferativa del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCU (CaSki, HeLa y ViBo) y células no tumorales.</i>	31
Actividad antiproliferativa del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células no tumorales....	32

Actividad Necrótica del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCu (CaSki, HeLa y ViBo) y células no tumorales.	35
Efecto apoptótico del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCu (CaSki, HeLa y ViBo). Determinación de cuerpos apoptóticos (DAPI) y detección de caspasa 3 activa.....	37
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47
REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
AIF	Factor inductor de apoptosis
ALDH	Enzima Aldehído deshidrogenasa
ANDEVA	Análisis de varianza
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	Del inglés American Type Culture collection
CaCu	Cáncer cervicouterino
CAD	Caspase activated ADNasa
CaSki	Línea celular de CaCu con secuencias integradas de HPV-16
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CFSE	Del inglés carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DDC	Ácido N, N- dietilditiocarbamato
DDTC	Dietilditiocarbamato
DMSO	dimetilsulfóxido
DSF	Disulfiram
E2F	Factor de transcripción que activa genes para la progresión del ciclo celular
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPTC	Herbicida tiocarbamato Eptam
Flt-C	Del inglés Fluorescein isothiocyanate
GSH	glutación reducido
HeLa	Línea celular de CaCu con secuencias integradas de HPV-18
IC ₅₀	Disminuir la Densidad Celular en un 50%
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
LDH	Enzima Lactato Deshidrogenasa
MeDDTC	S-metil-N, N-dietilditiocarbamato
MeDDTC-SO	S-Metil-N, N-dietilditiocarbamato-S-sulfóxido
MeDDTC-SO ₂	S-Metil-N, N-dietilditiocarbamato-S-sulfona
MeDTC	S-metil- N, N-dietiltiocarbamato
MeDTC-SO	S-metil-N, N-dietiltiocarbamato sulfóxido
MeDTC-SO ₂	S-metil-N, N-dietiltiocarbamato sulfona
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz - 2

MMP-9	Metaloproteinasa de matriz - 9
NAC	N-acetil-L-cisteina
NAD+	Coenzima nicotinamida adenina dinucleótido
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Proteína de 53 Kda reguladora del ciclo celular y de la inducción de muerte por apoptosis
PaBADH	Betaina aldehído deshidrogenasa
PBS	Solución salina de fosfatos
PHA	Fithohemaglutinina
RB	Proteína del retino blastoma
RPMI-1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
-SH	Grupo funcional sulfhídrido
SD	Desviación estándar
SDEG	S-(N,N-dietilcarbamoil) glutation
SFB	Suero Fetal Bovino
SNT	Suero de Ternera Neonato
TMT	Tiol Metiltransferasa
TNF	factor de necrosis tumoral
TPMT	Tiopurina Metiltransferasa
ViBo	Línea celular de CaCu negativa a VPH
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer ginecológico en las mujeres mexicanas. La acción de la quimioterapia y radioterapia está basada en su actividad citotóxica (necrótica), generando efectos secundarios graves y la necesidad de identificar compuestos con actividad antiproliferativa y baja toxicidad. Nuevas estrategias contra el cáncer cervical implican la valoración de fármacos conocidos, como agentes anticancerígenos. Al respecto, el Disulfiram (DSF) es un fármaco utilizado para el tratamiento del alcoholismo y recientemente se ha descrito que el DSF presenta actividad anticancerígena, y se han sugerido propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales. Sin embargo, el papel del DSF y sus metabolitos como anticancerígenos aún no es claro. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de apoptosis del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, y en células no tumorales, como linfocitos humanos. Los resultados de proliferación muestran que el DSF y sus metabolitos ejercen una actividad antiproliferativa en las tres líneas tumorales de manera dosis dependiente, en un rango de IC50s que van de 1.7 a 306 μ M. Sin embargo, en las células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana), el DSF y el metabolito MeDDTC-SO a las concentraciones de IC50s afectaron negativamente la proliferación en un 41 a 55 % respectivamente, mientras que en el MeDDTC no se observó disminución en el porcentaje de proliferación, sugiriendo que este compuesto podría ejercer una actividad selectiva. Los ensayos de actividad necrótica basados en la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares, mostraron que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO indujeron una actividad necrótica menor al 10 % en las tres líneas celulares, así como en las células linfocíticas. La observación de cromatina nuclear condensada, la contracción celular, así como la presencia de cuerpos apoptóticos, las cuales son características morfológicas propias de células apoptóticas, así como la inmunodetección de caspasa-3 activa, cuantificada por citometría de flujo en los cultivos tratados con el DSF y sus metabolitos, sugiere que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO inducen apoptosis en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo dependiente de caspasa-3-activa. Es importante resaltar que los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO conservan la actividad antiproliferativa y apoptótica presentes en el DSF sin presentar actividad necrótica, lo que sugiere que los efectos colaterales relacionados directamente con la actividad necrótica podrían ser menores y/o ser más tolerables por las pacientes. Lo anterior permite proponer a estos metabolitos como candidatos adecuados para ser estudiados como agentes antitumorales en modelos In-Vivo, con el propósito de establecer su potencial terapéutico.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second leading cause of gynecologic cancer death in Mexican women. The action of chemotherapy and radiotherapy is basing on their cytotoxic (necrotic) activity, generating serious adverse effects, so it is necessary to recognize compounds with antiproliferative activity and low toxicity. New strategies against cervical cancer imply the valuation of known drugs, as anticancer agents. In this regard, Disulfiram (DSF) is a drug used for the treatment of alcoholism and recently it has been described that DSF presents anti-carcinogenic activity and have suggested antiproliferative properties and inducing apoptosis in several tumor cell lines. However, the role of DSF and its metabolites as anticancer is still unclear. This work evaluated the antiproliferative, necrotic and inducing activity of apoptosis of the DSF and its metabolites MeDDTC and MeDDTC-SO in the lines of cervical cancer HeLa, CaSki and ViBo, and in non-tumour cells, as human lymphocytes. Proliferation results show that DSF and its metabolites exert antiproliferative activity in the three tumor cell lines in a dose-dependent manner, in a range of IC50s from 1.7 to 306 mM. But in non-tumour cells (human peripheral blood lymphocytes), DSF and MeDDTC-SO metabolite in IC50s concentrations, negatively affected proliferation by 41 to 55% respectively, while in the MeDDTC no decrease was observed. This result suggests that this compound could exert a selective activity. Necrotic activity assays based on the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), determined in cell cultures, showed that DSF and its metabolites MeDDTC and MeDDTC-SO induced necrotic activity of less than 10% in all three cell lines as well as in lymphocytic cells. The observation of condensed nuclear chromatin, the cellular contraction, as well as the presence of apoptotic bodies, which are characteristic morphological of apoptotic cells, as well as the immunodetection of caspase-3 active, quantified by Flow cytometry in cultures treated with DSF and its metabolites, suggests that DSF and its metabolites MeDDTC and MeDDTC-SO induce apoptosis in HeLa, CaSki and ViBo tumour cell lines in a caspase-3 dependent manner. It is important to emphasize that the metabolites MeDDTC and MeDDTC-SO preserve the antiproliferative activity and apoptotic present in the DSF without presenting necrotic activity, suggesting that the collateral effects directly related to the activity could be less and/or more tolerable for patients. This allows proposing these metabolites as suitable candidates to be studied as anti-tumour agents *in-vivo* models, with the purpose of establishing their therapeutic potential.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial la cual contiene diversas anomalías fenotípicas como la pérdida de la diferenciación, una alta tasa de proliferación, invasividad y con mayor frecuencia menor sensibilidad a los fármacos (Alberts *et al.*, 2006). Entre los cánceres de mayor incidencia en mujeres, se encuentran el cáncer de mama, pulmón, colon, cérvix, entre otros.

En la actualidad el cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, a esta patología se le atribuyen 527,624 casos en incidencia y 265,672 fallecimientos ocurridas por esta causa de cáncer (Globocan, 2016), y es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México siendo la tercera causa de muerte por cáncer ginecológico en las mujeres mexicanas (INEGI, 2016). No obstante, las terapias aplicadas a esta patología, el cáncer cervicouterino sigue siendo de alta incidencia a nivel nacional y mundial. Dentro de las estrategias para combatir esta enfermedad se encuentra la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía. Éstas resultan ser eficientes en paciente con tumores únicos, de fácil acceso y detectados tempranamente. Sin embargo, en pacientes con etapas avanzadas o con metástasis, las terapias resultan ser poco exitosas. En particular, la acción de la quimioterapia y radioterapia está basada en su fuerte actividad citotóxica, generando efectos colaterales que van de leves a graves dependiendo de la dosis o la frecuencia de administración. Por ello, en los últimos años, se ha dirigido la investigación a la exploración y análisis de compuestos que presenten actividad antiproliferativa y de baja toxicidad. Además, en los últimos años se han descrito algunos tipos de muerte celular programada que han arrojado evidencia que las células que la presentan no inducen una respuesta inflamatoria como es el caso de la necrosis, por lo que actualmente se busca que los compuestos aplicados al tratamiento de esta enfermedad induzcan muerte celular apoptótica. Dentro de las nuevas estrategias está la revaloración de la actividad de fármacos conocidos. Existen muchos fármacos con estas características, sin embargo, su evaluación como agentes anticancerígenos es pobre y se desconoce si son capaces de discriminar entre células tumorales y no tumorales. Un ejemplo de estos compuestos es el Disulfiram (DSF), un fármaco que por más de medio siglo se ha utilizado para el tratamiento del alcoholismo y actualmente se le ha encontrado propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales como son de mama, próstata, linfomas, glioblastomas, entre otros. (Guang-Yam *et al.*, 1998; Ryan and Wilding, 2000; Daniel *et al.*, 2005; Gourley y Williamson, 2006). Sin embargo, el papel del DSF y sus metabolitos en el cáncer aún no es claro, por lo que el estudio de estos compuestos ha generado un gran interés para ser estudiados como agentes anticancerígenos.

MARCO TEÓRICO

Cáncer

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

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

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

El cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13 % de todas las muertes a nivel mundial, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Asimismo, destaca que aproximadamente 70% de las muertes por cáncer se presentan en países de ingresos bajos y medios (Globocan, iarc.fr, 2016), donde se dificulta la atención de esta enfermedad. En México durante 2013, del total de defunciones, 12.8% se debieron a algún tumor y de éstas, 93.4% por tumores malignos.

La proliferación celular, es un proceso definido como el incremento del número de células o resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte (Rojas *et al.*, 2009).

Cáncer y Ciclo celular

El ciclo celular está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 1). Las fases G1 y G2 (gap o intervalo) implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. La fase S (síntesis) consiste en la replicación del ADN para heredar a cada célula hija la misma carga genética. La fase M (mitosis) o de división celular, como su nombre lo indica, es la división de todo el material celular para originar dos células hijas (Alberts *et al.*, 2006).

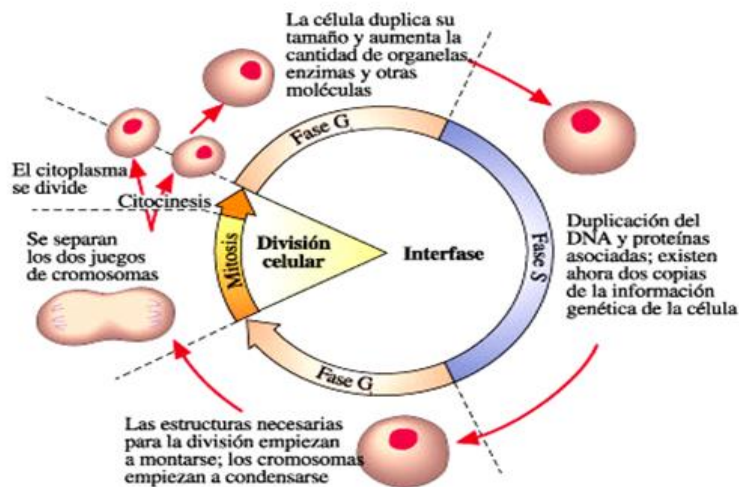


Figura 1. Esquema de las fases del ciclo celular (imagen obtenida de preujct.cl/biologia/curtis/libro/img/10-5).

Puntos de control del ciclo celular.

Los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. Estos puntos de control actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente. En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, entre otros elementos necesarios para el desarrollo de un ciclo celular normal (Valdespino-Gómez *et al.*, 2009).

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

dependientes de ciclinas (CDK, cyclin-dependent kinases 1, 2, 4 y 6) y sus subunidades activadoras las ciclinas (A, B, D y E) (Lim. y Kaldis, 2013).

El ciclo celular se regula de manera positiva para producir la proliferación celular, y de manera negativa para inhibirla. Entre las principales moléculas que regulan positivamente el ciclo celular se encuentran las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las ciclinas y los proto-oncogenes; y negativamente participan las proteínas supresoras de tumores y las proteínas inhibidoras de las CDK, entre otras. Una falla en la regulación del mecanismo de control del ciclo celular, como la activación o desactivación, la disminución o el aumento en la expresión o la mutación de las proteínas que controlan el ciclo celular ocasiona una proliferación celular excesiva y como consecuencia, la aparición de un proceso maligno o cáncer.

Las proteínas supresoras de tumores como la proveniente del gene del retinoblastoma RB y la familia de las proteínas p53, actúan en la fase G1 regulándola de manera importante. La proteína RB tiene como función principal inhibir la transición de la fase G1 a S. Su actividad depende de su estado de fosforilación: si RB no está fosforilada (estado activo), se encuentra unida al factor de transcripción E2F evitando su translocación al núcleo y la activación de genes necesarios para la síntesis del ADN; y si se fosforila, por complejos ciclina-CDK, el E2F se libera y produce proliferación celular. Por otra parte, la proteína p53 participa en la regulación de los puntos clave del ciclo celular, en activar la muerte celular apoptótica y en el estado de diferenciación de una célula (Rojas *et al.*, 2009).

Este gen tiene múltiples funciones ya que aparece implicado no sólo en el control del ciclo celular sino también en la integridad del ADN y la supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan el ADN. La alteración del gen p53 confiere un riesgo muy elevado de desarrollar cáncer y la mutación de este es uno de los cambios genómicos más frecuentes en el cáncer humano.

El gen que codifica para la proteína p53 ha sido implicado en muchas formas de cáncer humano heredado y esporádico. La pérdida de la función de p53 por mutación o inactivación, produce inestabilidad genómica, y restricción del ciclo celular. La alteración de p53 es la mutación más común en el cáncer humano.

El ciclo celular se regula por una competencia y un balance entre reguladores negativos y positivos de la proliferación, que determina cuando una célula prolifera, se diferencia o muere (Karp, 2006).

Muerte Celular

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

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

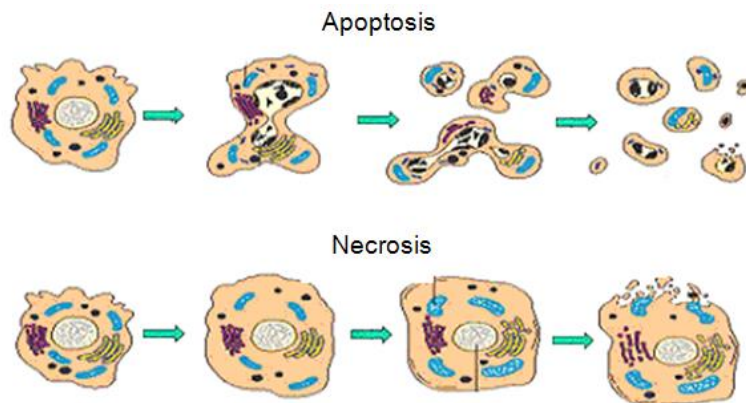


Figura 2. Esquema de dos tipos de muerte celular, (www.nature.com/html).

Apoptosis

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

El volumen celular disminuye y el citoplasma se condensa, en el núcleo la cromatina se condensa adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, con agregación de los poros nucleares y disolución de la lámina nuclear, llegando a presentarse fragmentación del núcleo. Las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente, la célula colapsa,

produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior; los cuerpos apoptóticos son retirados del espacio extracelular por células fagocíticas y, por tanto, no causa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación (Becker *et al.*, 2007; Lizarbe, 2007).

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de ácido aspártico seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa (Rojas *et al.*, 2009). Existen dos vías alternativas para activar a las caspasas:

La vía extrínseca inicia por la unión de distintos ligandos (FasL, TNF o TRAIL) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1 o TRAILR1/R2, respectivamente). Este hecho provoca que, a través de proteínas adaptadoras que presentan dominios de muerte (como FADD), se active la procaspasa 8 (Lizarbe, 2007). Finalmente, la caspasa 8 (caspasa iniciadora), puede activar a la caspasa 3, (caspasa ejecutora) iniciándose así el programa de muerte celular (Ouyang *et al.*, 2012)

La vía intrínseca, es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, que inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas de estrés que utilizan esta segunda ruta de señalización, donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, el Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y el Segundo Activador de Caspasas Proveniente de Mitocondria SMAC/DIABLO (Porter y Urbano, 2006). El citocromo c liberado se une al Factor Activador de Proteasas de Apoptosis (Apaf-1) para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa 9 la cual es una caspasa iniciadora, y la caspasa 9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Ouyang *et al.*, 2012), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis.

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

Necrosis

Otro tipo de muerte celular es la necrosis, ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas tóxicas o,

por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune (Lizarbe, 2007). La necrosis comienza con la pérdida de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis. Como consecuencia de la lesión celular, el daño de la membrana plasmática conduce a la entrada de agua y de iones extracelulares. Los organelos intracelulares, como las mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y el núcleo, sufren alteraciones irreversibles que son causadas por el detrimento celular y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (lisis celular). Como resultado final del daño en la membrana celular el contenido citoplasmático, incluidas las enzimas lisosómicas, quedan libres en el espacio extracelular (Figura 2). Por lo tanto, la muerte celular necrótica a menudo se asocia con una vasta lesión de tejidos vecinos y una respuesta inflamatoria intensa (Ouyang *et al.*, 2012)

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, es una molécula de gran tamaño que está presente en el citoplasma y se libera al medio cuando hay pérdida de integridad de la membrana celular, por lo que al ser detectada extracelularmente se comprueba que la célula presentó un daño en la integridad de la membrana plasmática, la cual también es considerada una característica de muerte por necrosis (Karp, 2006).

La proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células en los organismos pluricelulares se regula cuidadosamente por mecanismos de muerte celular manteniendo el equilibrio del mismo (Rojas *et al.*, 2009).

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

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016, reporta que murieron 8.2 millones de personas por esta enfermedad; los varones principalmente por cáncer de pulmón, estómago, riñón, colon y esófago; mientras que las mujeres por mama, pulmón, estómago, colon y cervical. El cáncer cervicouterino aparece en la cuarta posición con respecto al tipo de padecimiento en mujeres a nivel mundial con incidencia de 527,000 y mortalidad de 285,000 decesos reportados (Globocan.iarc.fr, 2016).

Cáncer cervicouterino

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

Actualmente se ha observado que el 99.7% de los casos de cáncer cervicouterino están relacionados con la infección por virus del papiloma humano (VPH), la cual es una infección de transmisión sexual muy común, que puede producir lesiones en el útero o matriz (Doorbar, 2006). De acuerdo con su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en virus de alto riesgo (tipos 16, 18, 45, 56), de riesgo moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y de bajo riesgo (tipos 6, 11, 13, 14, 40, 42, 43, 44). Los tipos 16 y 18 son responsables de cerca de 70 a 76% de todas las lesiones precursoras y los cánceres invasores (Li *et al.*, 2011). La infección por virus del papiloma humano se acompaña, algunas veces, de alteraciones celulares llamadas histológicamente neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), que en la práctica clínica se definen como lesiones de bajo y alto grado. Estas lesiones, de acuerdo con la clasificación diagnóstica propuesta por la Organización Mundial de la Salud, se manifiestan por cambios característicos en el núcleo y el citoplasma de la célula y se clasifican en NIC I, II y III, de acuerdo con el grado de afectación del grosor epitelial, que a su vez determina el tipo de células detectables en los estudios citológicos. La NIC-I es una lesión intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de esta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (Hernández, 2004).

Los tipos de cáncer más frecuentes en la mujer mexicana son el de mama, cervicouterino, pulmón, colorrectal, estómago e hígado (Figura 3) (Globocan.iarc.fr, 2016). De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), el cáncer cervicouterino es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México y es la tercera causa de muerte por cáncer ginecológico en mujeres mayores de 25 años precedido por el cáncer de mama (INEGI, 2016). En 2014 se presentaron 3,063 nuevos casos y 4,056 defunciones por causa de este padecimiento. En contraste con otros tumores, el carcinoma de cérvix es relativamente frecuente en mujeres jóvenes, siendo la edad de mayor incidencia del tumor invasivo entre los 45 y 60 años. (Globocan.iarc.fr, 2016).

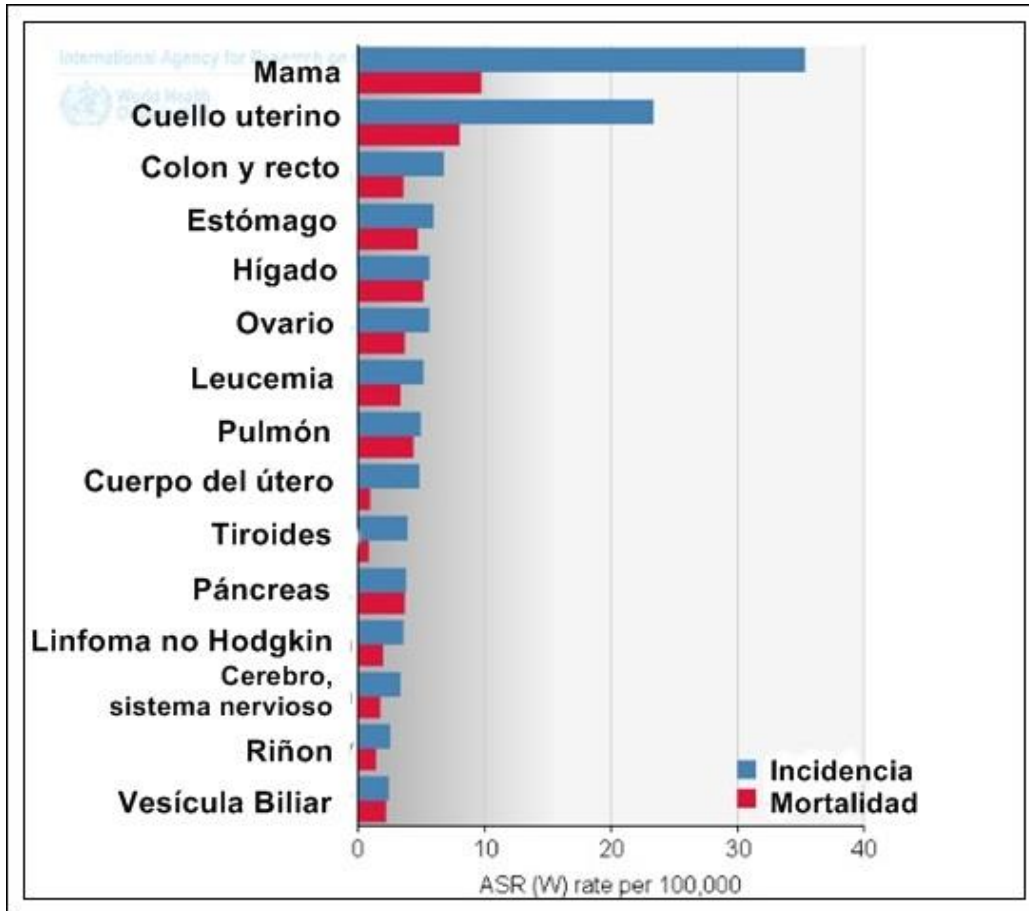


Figura 3. Principales tipos de cáncer presentes en mujeres para el año 2012 en México. El cáncer cervicouterino aparece como segundo lugar, para todas las edades, tomado y modificado de (GloboCan.iarc.fr, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) enlista como factores de riesgo para el cáncer cervicouterino:

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

Tratamientos

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

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

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

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

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

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

Los tratamientos de radioterapia y quimioterapia afectan a células en estado de proliferación, ya que inducen daño directo sobre el ADN, deteniendo la progresión del ciclo celular, induciendo muerte celular o ambos. Los fármacos más utilizados en el tratamiento de cáncer cervicouterino son: Cisplatino, Paclitaxel, Gemcitabina, Topotecan y Bleomicina Tabla 1.

Tabla 1. Quimioterapéuticos aplicados para el tratamiento del cáncer cervicouterino.

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Efectos secundarios	Tipo de cáncer	IC50 (CaCU HeLa a 24, 48, 72 h mg/ml)	Método
CISPLATINO	Se unen al ADN inhibiendo su duplicación y la división celular	Dosificación diaria: 15-20 mg /día durante 5 días cada 3-4 semanas por ciclo no debe superar 120 mg/m ²	Nauseas y vómito nefrotoxicidad, neuropatía (cisplatino), mielo supresión (carboplatino)	CaCU Testículo Ovario Vejiga Cabeza y cuello Pulmón	2.4, 0.7 y 0.1	MTT (Lee <i>et al.</i> , 2005)
TAXOL	Inhibición de despolimerización de tubulina, Inhibidor de mitosis	175 mg por vía intravenosa durante 3 horas	Mielo supresión vómitos, diarrea y alopecia	CaCU Mama, Ovario Pulmón y Sarcoma de kaposi	0.3, 0.1	MTT (Lee <i>et al.</i> , 2005)
TOPOTECAN	Inhibidor de la topoisomerasa I, obstruye síntesis de ADN. Induce fragmentos de hebras simples de ADN asociados a la proteína.	0.25 a 1 mg (oral) 4 mg (vía intravenosa)	Mielo supresión, diarrea, nauseas y alopecia	CaCU Pulmón ovario	8.0, 2.6 y 0.8	MTT (Lee <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 1. Tomado y Modificado de: Am J Health-Syt Pharm 2005 American Society of Health-System Pharmacists.

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

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

La quimioterapia puede afectar a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente como: las células de la mucosa bucal, de la mucosa intestinal o las células de los folículos pilosos. Es por todo esto que durante el

tratamiento con quimioterapia aparecen efectos secundarios como consecuencia del daño a células sanas, efectos suelen ser reversibles, es decir, que van a mejorar o desaparecer, una vez finalizado el tratamiento con quimioterapia. Los efectos secundarios observados durante la aplicación de una quimioterapia son debidos a la pérdida de células normales. El efecto más notable se aprecia en el descenso del número de células blancas, así como de sus precursoras presentes en la médula ósea, por lo que el sistema inmune se abate permitiendo así, la presencia de enfermedades oportunistas. Los cultivos de linfocitos ofrecen grandes ventajas al ser indicadores extremadamente sensitivos de los efectos citotóxicos inducidos por quimioterapia, ya que se puede hacer seguimiento de alteraciones o daño en el ADN, transformación celular, muerte celular y afectación en el potencial proliferativo de estas células (Blum y Pabst, 2007; Penn, 1981).

No obstante, el éxito de los tratamientos contra el cáncer, éstos son eficientes en estadios tempranos de la enfermedad, sin embargo, son poco eficientes en los estadios terminales. Este hecho ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer, destacando la búsqueda de compuestos sintéticos con actividad anticancerígena.

Actualmente se ha encontrado que fármacos que son utilizados en patologías no tumorales con una aplicación clínica bien definida, su acción no está restringida únicamente a la aplicación para cual fue diseñado. Se ha identificado que presentan actividad anti proliferativa e inductora de apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales.

Al respecto, han llamado la atención los compuestos pertenecientes al grupo de los ditiocarbamatos por sus diferentes actividades biológicas, y sobre todo porque son compuestos cuya aplicación clínica ha sido evaluada.

Los Ditiocarbamatos son de interés farmacéutico debido a sus numerosos efectos biológicos incluyendo la antioxidante, fungicida, bactericida, plaguicida y antiviral (Wynne *et al.*, 2003).

El Disulfiram (DSF) [bis (dietilcarbamoil) disulfuro], se aprobó como un fármaco desde hace décadas (Sauna *et al.*, 2005), fue sintetizado en 1881 por Grotky e introducido en terapéutica como vermícida. Hald y Jacobsen descubrieron, en 1948, la reacción alcohol-Disulfiram, y a partir de entonces se introdujo en el tratamiento de la actividad alcohólica. (Salazar *et al.*, 2010), aunado a esto, se utiliza en la aplicación en la industria de la goma como acelerador de la vulcanización y como aditivos para aceites y grasas por su actividad antioxidante. Además, se ha sugerido en el tratamiento de la dependencia de cocaína (Wickström *et al.*, 2007)

La enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) en humanos comprende una superfamilia de isoenzimas que poseen importantes funciones fisiológicas y toxicológicas. La enzima ALDH se expresa constitutivamente en tejidos de mamíferos, con el nivel más alto en el hígado, seguido por el riñón, útero, y el cerebro (Alnouti y

Klaassen, 2008). ALDH2, como una enzima clave que oxida el acetaldehído, es crucial para el metabolismo del alcohol (Koppaka *et al.*, 2012). El etanol se metaboliza a acetaldehído por la enzima alcohol-deshidrogenasa, y este acetaldehído se metaboliza a acetato por la enzima aldehído-deshidrogenasa. Figura 4 (Koppaka *et al.*, 2012).

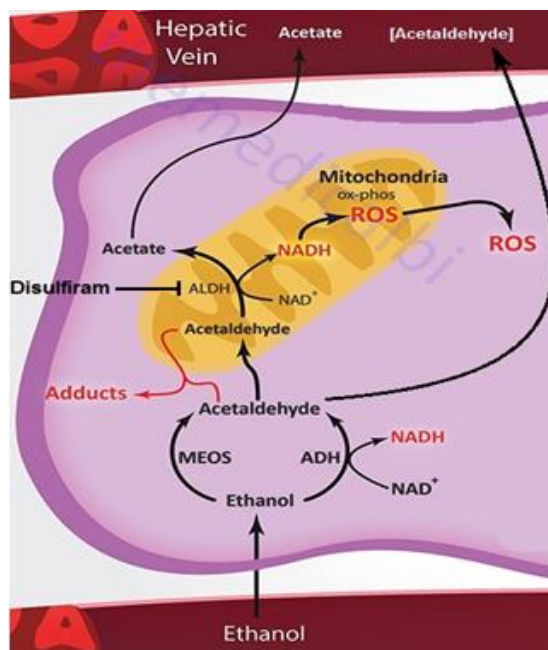


Figura 4 Vía metabólica del etanol en presencia del Disulfiram. Tomada y modificada de <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/ethanol-metabolism-sp.php>.

El DSF produce una inhibición irreversible de la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH) debido a la capacidad del fármaco para competir con la nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) por los sitios de unión en la ALDH (Koppaka *et al.*, 2012). La acumulación de acetaldehído en sangre es 5 a 10 veces mayor a lo normal, contribuye a la reacción que aparece después de la ingesta de alcohol en pacientes tratados con DSF, reacción también conocida como efecto Antabus. (Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2016) Los estudios muestran que el DSF tiene una baja toxicidad (Suneet *et al.*, 2004), sin embargo, al ser administrado previamente a una ingestión de alcohol, en los primeros minutos (5-10), produce una serie de efectos adversos muy desagradables que pueden ser graves e incluso mortales (como son náuseas, vómito, cefalea pulsátil, enrojecimiento, disnea, sudoración, visión borrosa, vértigos, taquicardia e hipotensión (Salazar *et al.*, 2010). El restablecimiento de la actividad enzimática es dependiente de una nueva síntesis, lo cual aparece gradualmente durante el curso de una semana o más. (Salazar *et al.*, 2010).

Farmacocinética del Disulfiram.

El Disulfiram se comercializa en comprimidos de 250 mg. La dosis inicial es de 500 mg/día por vía oral durante 1-2 semanas y después, una dosis de 250 mg/ día. La dosis de mantenimiento es de 125-500 mg / día, sin exceder los 500 mg/ día.

El DSF difunde con facilidad al interior celular y aumenta los niveles intracelulares de -SH, y, por tanto, puede actuar sobre las reacciones de oxidación-reducción intracelulares. El metabolismo no se ve afectado de forma apreciable por la disminución leve o moderada de la función hepática. Hasta el 20% de la dosis puede permanecer en el organismo durante una semana o más. La absorción del DSF desde el tracto gastrointestinal es rápida pero incompleta.

La biodisponibilidad es del 80-90%, y es posible que los comprimidos de DSF tengan una mayor biodisponibilidad cuando se administran con los alimentos. Debido a su elevada liposolubilidad, el DSF se distribuye ampliamente y se acumula en diversos depósitos grasos.

El 5-20% de la dosis ingerida de DSF no es absorbida y se excreta en las heces sin modificar. El 70-76% de la dosis se elimina por orina ya metabolizado. Una pequeña parte puede eliminarse por los pulmones en el aire expirado en forma de disulfuro carbónico, la vida media es de aproximadamente 60-120 horas.

Los datos preclínicos sobre seguridad informan que el DSF no aumentó significativamente el número de aberraciones cromosómicas de linfocitos cultivados *in vitro* y de linfocitos de pacientes tratados con este compuesto. Sin embargo, el DSF indujo intercambio de cromátidas hermanas en las células de la médula ósea y en las espermatogonias de ratones tratados con dosis de 800 y 200-800 mg/kg, respectivamente.

No existen datos en animales con relación al potencial carcinogénico y de toxicidad reproductiva de DSF (Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2016). Existen publicaciones que sugieren que a la reacción Disulfiram-etanol contribuyen también tres metabolitos del DSF.

Como se mencionó anteriormente la absorción del DSF desde el tracto gastrointestinal es rápida pero incompleta. En 1977, Cobby y colaboradores demostraron que el DSF no es el principio activo del efecto que ejerce la acción en la inhibición de la enzima ALDH, tras ser ingerido se reduce rápidamente a dietilditiocarbamato (DDC), el cual es parcialmente excretado a carbono disulfuro en el aire espirado y se metaboliza parcialmente en el hígado a Me-DDTC, el cual se metaboliza posteriormente al metabolito activo MeDTC, después de aproximadamente 4 h, la concentración de MeDTC alcanza su máximo, pero el máximo efecto de la inhibición enzimática (aldehído deshidrogenasa -ALDH-) se obtiene después de 3 días de tratamiento. La vida media plasmática para el Me-DTC es de aproximadamente 10 horas, pero el efecto de inhibición enzimática de la ALDH es considerablemente mayor (Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2016).

Al evaluar la estabilidad del DSF en sangre se determinó que el DSF se redujo rápida y cuantitativamente a DDC en 4 minutos *in-vitro*. El DDC ya formado se descompuso en sangre humana y de perro con semividas de 70 y 100 minutos respectivamente. En contraste con la inestabilidad de DDC y DSF en sangre, el MeDDC resultó ser estable durante más de 2 horas (Cobby *et al.*, 1977). Por otro lado, la concentración plasmática máxima del DSF, DDTC y MeDDTC fue de .038, 0.77, 0.30 $\mu\text{g/ml}$, en un tiempo de 9.2, 8.5, 10.5 h respectivamente, datos que indican que posiblemente el DSF no sea quien lleve a cabo la acción de inhibición de la enzima ALDH (Faiman *et al.*, 1984).

Otras investigaciones indican que el Me-DTC se considera un inhibidor posible de la ALDH 1 con una potencia inhibitoria muy inferior a la inhibición ejercida por sus dos metabolitos, quienes se unen de manera irreversible a la ALDH 1 y ALDH 2 a través de un enlace covalente con el residuo de cisteína del sitio activo de la enzima.

El DSF rápidamente se reduce en la sangre para formar DDC por la acción de la enzima glutatión reductasa (Strömme, 1963; Cobby. *et al*, 1977) y también se reduce no enzimáticamente por la albúmina (Agarwal *et al.*, 1983). Posteriormente, DDC es metabolizado tanto por las enzimas tiol metiltransferasa y tiopurina metiltransferasa a Me-DDTC (Gessner y Jakubowski, 1972 ;Glaser *et al.*, 1993 ;Lill *et al.*, 1996) que, a su vez, se oxida principalmente por el citocromo P-450 con una menor contribución de FMO a Me-DTC (Johansson *et al.*, 1989;Hart *et al.*, 1990) y MeDTC-SO (Hart y Faiman, 1992;Madan *et al.*, 1993; Madan *et al.*, 1995). El MeDTC-SO se ha encontrado que es un potente inhibidor de la ALDH, tanto *in vitro* e *in vivo* y se ha sugerido que estos sulfóxidos son especies activas responsables de los efectos inhibitorios del DSF *in vivo* (Hart y Faiman, 1992,1994). Específicamente, se ha propuesto que MeDTC-SO inactiva ALDH a través de carbamoylación de un grupo tiol en el sitio activo de la enzima. Consistente con la hipótesis, SDEG, el producto generado por carbamoylación de los endógenos tiol glutatión (GSH) por MeDTC-SO, fue identificado como un conjugado de mayor presencia en la bilis de ratas tratadas con DSF o DDC (Jin *et al.*, 1994).

El MeDDTC-SO fue identificado en las incubaciones de Me-DDTC con preparaciones microsomales de hígado de rata (Madan y Faiman, 1994a). La formación de MeDDTC-SO ha demostrado ser catalizada principalmente por el citocromo P-450 con una contribución menor de FMO. Aunque MeDDTC-SO mostró inhibir a la ALDH tanto *in vitro* como *in vivo*, este sulfóxido no se detectó en el plasma de las ratas tratadas con DSF, Me-DDTC o MeDDTC-SO (Madan y Faiman, 1994b). Por lo tanto, este sulfóxido de ditiocarbamato (y / o la sulfona correspondiente, MeDDTC-SO₂) también pueden jugar un papel en la mediación de la inhibición de la ALDH de DSF *in vivo*.

Por otro lado, estudios sobre el herbicida tiocarbamato Eptam o (EPTC), un análogo estructural de MeDTC, ha demostrado que ocurren reacciones sucesivas de oxidación cuando el compuesto es incubado en microsomas de hígado de ratón o de pescado, lo que lleva a la formación de sulfóxido y sulfona de EPTC (Chen y Casida, 1978; Cashman *et al.*, 1989). Se ha propuesto que MeDTC conlleva a reacciones similares

para formar la sulfona correspondiente (MeDETC-SO₂), un potente inhibidor de la ALDH, tanto *in vitro* e *in vivo* (Nagendra *et al.*, 1994; Mays *et al.*, 1995).

Sin embargo, los intentos de detectar MeDTC-SO₂ ya sea en incubaciones de MeDTC o MeDTC-SO con microsomas de hígado de rata o en el plasma de ratas tratadas con MeDTC-SO o MeDTC-SO₂ no tuvieron éxito (Nagendra *et al.*, 1994), y se sugirió que la alta reactividad de MeDTC-SO₂ hacia nucleófilos endógenos puede impedir su detección en matrices biológicas (Mays *et al.*, 1995).

Para obtener una mejor comprensión del mecanismo por el cual el DSF se somete a activación metabólica e inhibe a la ALDH *in vivo*, se investigó el papel de MeDTC-SO, MeDTC-SO₂, MeDDTC-SO y MeDDTC-SO₂ como intermedios reactivos y como mediadores potenciales de los efectos inhibidores, se utilizó para identificar y cuantificar los conjugados NAC de estos intermediarios de carbamoilación en la orina de las ratas tratadas con DSF y DDTC, por otra parte se evaluaron paralelamente estudios *in vitro* para comparar la actividad de carbamoilación y la correspondiente potencia inhibidora de la ALDH de estos sulfóxidos y sulfonas metabolitos de DSF y DDTC. En la tabla 2 se muestran resultados reportados en función de su reactividad química (Hu, *et al.*, 1997).

Tabla 2. Orden de reactividad enzimática de los metabolitos del DSF identificados en la orina de ratas tratadas con DSF y DDTC (Hu *et al.*, 1997).

	Me-DDTC-SO ₂ >	Me-DTC-SO ₂ >	Me-DDTC-SO >	Me-DTC-SO
Tasa inicial ($\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	648	109	59	1,03
Cte tasa de la reacción ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	102	85,7	6,3	1,3

(Hu *et al.*, (1997)

Por otro lado, Zaldivar-Machorro y colaboradores (2011) determinan la actividad inhibitoria del DSF y metabolitos en la enzima Betaína aldehído deshidrogenasa (PaBADH) de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Inhibición *in vitro* de PaBADH y el orden de potencia del DSF y sus metabolitos.

Cinética	MeDDTC-SO ₂ >	DSF >	MeDTC-SO ₂ >	MeDDTC-SO >	MeDTC-SO
k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) -NADH ⁺	81.4 ± 1.3	38.7 ± 1.4	18 ± 0.7	2.9 ± 0.2	0.5 ± 0.0

Modificado de Zaldivar *et al.*, (2011)

Recientemente se ha propuesto al DSF como un agente anticancerígeno al igual que sus metabolitos (Chen *et al.*, 2006), con varios efectos en la síntesis de ADN y la proliferación celular (Yakisich *et al.*, 2001). También

induce la apoptosis en células de melanoma humano metastásico (células 46A-C81, C81-61 y C83-2C) tratadas a una dosis de 25-50 ng/ml.

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

También se ha sugerido que la muerte celular inducida por DSF es el resultado del transporte del ion Cu^{2+} hacia la célula que sugiere que los metabolitos del DSF pueden tener un efecto más significativo. Además de inducir la apoptosis, se ha demostrado que el DSF inhibe directamente el crecimiento de las células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha demostrado que los iones metálicos divalentes (especialmente Cu^{2+}) mejoran su actividad antineoplásica (Sauna *et al.*, 2005).

No obstante, en estos hallazgos, no es claro si la actividad biológica del DSF es causada por sus metabolitos o por sí mismo, ya que éste es metabolizado una vez que entra a la célula (Figura 5). Además, actualmente se han generado nuevos análogos o derivados de éste con el propósito de estudiar la actividad biológica con respecto a la estructura química del compuesto.

La vía metabólica para la biotransformación del DSF se muestra en la figura 5, en donde el DSF se reduce a DDC, para posteriormente sufrir una metilación sulfurada para formar el MeDDTC, el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa para formar el MeDTC y finalmente por oxidación se forma el (MeDTC-SO) y (MeDTC-SO₂); y o la vía superior puede continuar con MeDDTC y por oxidación se genera el (MeDDTC-SO) y (MeDDTC-SO₂) (Zaldivar-Machorro *et al.*, 2011).

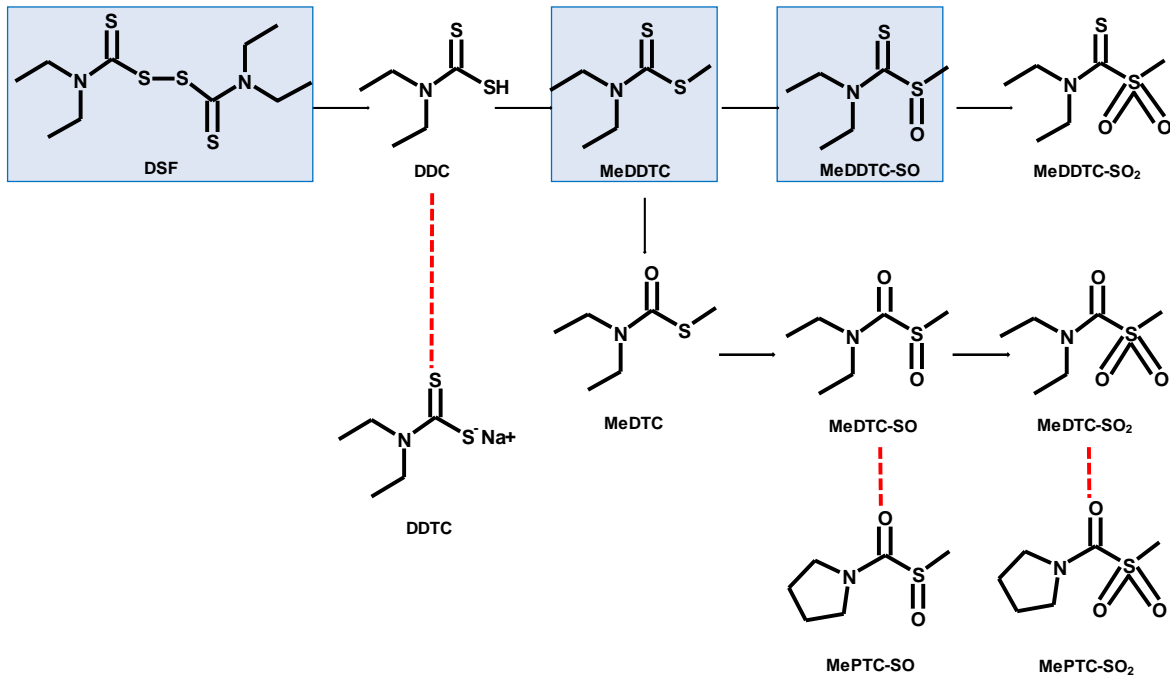


Figura 5. Vía metabólica del Disulfiram (DSF), donde son utilizadas las siguientes abreviaturas: DSF, bis(dietiltiocarbamoil)disulfuro; el cual se reduce a DDC ácido N,N-dietiltiocarbámico; el cual sufre una reacción de metilación para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbámico; el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el MeDDTC, S-metil-N,N-dietiltiocarbámico y MeDDTC-SO, S-metil-N,N-dietiltiocarbámico sulfóxido, éste último es el precursor de MeDDTC-SO₂, S-metil-N,N-dietiltiocarbámico sulfona; TMT, tioriltransferasa; TPMT, tiopurina metiltransferasa; CP-450, complejo citocromo P-450 (Imagen tomada y modificada de Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011).

De igual manera, se sugiere que el DSF y sus metabolitos (Della *et al.*, 2000) pueden presentar actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón, así como leucemias entre otras. (Wickström *et al.*, 2007) (Tabla 4). Dada esta actividad anticancerígena del DSF y sus metabolitos, se han sintetizado análogos de los metabolitos del DSF con el fin de evaluar su actividad citotóxica y antiproliferativa, además de determinar si poseen actividad selectiva, esto es, que no afecte células de tejidos normales o cultivos primarios de células no tumorales.

Tabla 4. Antecedentes de la evaluación de la actividad antitumoral del Disulfiram en diferentes líneas celulares tumorales.

Tejido	Línea celular	Disulfiram μM	Método	Autores
Melanoma metastásico	C81-46a	0.05	MTT	Cen et al., 2002
	C81-61	0.05		
	C83-2C	0.05		
Cérvix	HeLa	0.4	Azul tripano	Wickstrom et al., 2007
Próstata	VCaP, LNCaP, PC3, DU143	1.0	Azul tripano	Iljin et al., 2009
Glioblastoma	U251MG	0.464	MTT	Liu et al., 2012
	U87MG	0.464		
	U373MG	0.197		
Mama	MDA-MB-231	0.125	MTT	Robinson et al, 2013
Páncreas	PANC-1	13		Dastjerdi et al., 2013
Ovario	OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-30, OVMZ-31, OVMZ-37, OVMZ-38	0-5	MTT	Papaoiouannou et al., 2013
Mesotelioma pleural	H2595	1	MTT	Cheriyen et al., 2014
Hígado	HepG2	1.42		Zhang et al., 2015
Ovario	A2780	~25	MTT	Rezk et al., 2015
	OVMZ-30	~30		
Mama	MCF7	0.5-0.75	MTT	Fesehee et al., 2016
Mama	MCF7 Y 4T1	0.5	MTT	Fesehee et al., 2016

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo la segunda causa de muerte por cáncer ginecológico en mujeres mexicanas (INEGI, 2016).

Los agentes quimioterapéuticos disponibles como tratamiento para el cáncer cervicouterino no actúan específicamente sobre las células cancerosas generando efectos secundarios severos. La toxicidad de estos medicamentos limita su efectividad, y muchos cánceres no se eliminan mediante aquellas dosis de quimioterapia que el paciente pueda tolerar, ya que estos tratamientos son altamente agresivos y muestran poca selectividad que deterioran notablemente la calidad de vida de las pacientes, además son ineficientes en etapas avanzadas de esta enfermedad. Por ello, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral continúa. Entre estos compuestos están los Ditiocarbamatos, como el Disulfiram (DSF), sus metabolitos y análogos (Della *et al.*, 2000), compuestos que actualmente son utilizados clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y principalmente en el tratamiento de adicciones como el abuso del alcohol. Actualmente, se ha reportado que tienen actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón, así como leucemias (Wickström *et al.*, 2007).

HIPÓTESIS

Se ha descrito que el Disulfiram presenta actividad antitumoral en diferentes tipos celulares de cáncer, lo que implica que los metabolitos Metildietilditiocarbamato (MeDDTC) y el Metildietilditiocarbamato sulfóxido (MeDDTC-SO) del Disulfiram, presenten actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y/o apoptótico del Metildietilditiocarbamato (MeDDTC) y el Metildietilditiocarbamato sulfóxido (MeDDTC-SO), así como el Disulfiram, en cultivos de líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa, CaSki y ViBo), así como en cultivos de células no tumorales.

Objetivos específicos

- ❖ Evaluar la actividad antiproliferativa de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO y del Disulfiram mediante la determinación de la concentración requerida para inducir un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}) en cultivos de las líneas celulares de cáncer cervicouterino
- ❖ Evaluar el efecto citotóxico necrótico de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO y del Disulfiram en cultivos de células de cáncer cervicouterino y de linfocitos de sangre periférica humana.
- ❖ Determinar si los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO y el Disulfiram inducen muerte celular por apoptosis en células de cáncer cervicouterino.
- ❖ Evaluar el efecto antiproliferativo (IC_{50}) de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO y del Disulfiram sobre células linfocíticas provenientes de sangre periférica de donadores sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los compuestos

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad.

Los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO del Disulfiram fueron sintetizados por el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza a cargo del Dr. Ignacio Regla.

La preparación del stock de los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO se realizó en frío (4-8°C), y para el caso de DSF se preparó a temperatura ambiente. Se pesaron 10 miligramos de cada compuesto, y se solubilizaron en 250 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) y/o Etanol. Se realizaron diluciones hasta obtener la concentración requerida para aplicar la IC₅₀ y evaluar cada compuesto.

Para los ensayos de curva dosis-respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 200 a 1.56 µg/ml para la determinación de la IC₅₀. Para esto se tomaron 20 µl de la solución de trabajo y se llevaron a 1 ml con medio RPMI-1640 al 5 % STN en tubos cónicos de plástico de 1.5 ml, para tener una concentración 400 µg/ml, del cual se tomaron 500 µl y fueron llevados a 1 ml con medio RPMI 5 % de STN para obtener una concentración de 200 µg/ml, de esta manera se continuaron las diluciones hasta obtener la concentración de 1.56 µg/ml, para cada concentración se completa el volumen a 1 ml.

Una vez obtenida la IC₅₀, para cada línea celular de CaCu, esta concentración se tomó de manera puntual, para lo cual se realizó una dilución del compuesto a partir del stock.

Para la realización de cada determinación se utilizaron como control negativo, células sin tratamiento únicamente RPMI-1640 al 5 % de STN, y células tratadas a concentraciones requeridas del vehículo utilizado para solubilizar los compuestos (Disulfiram, MeDDTC y MeDDTC-SO), siendo la cantidad empleada en la determinación de la IC₅₀ en RPMI-1640 al 5 % de STN.

El etanol es altamente tóxico, sin embargo, se ha reportado que en concentraciones de 1 % en cultivos celulares de CaCu no afecta el potencial proliferativo ni induce la formación de cuerpos apoptóticos (Hernández, 2004), por lo que se plantea no exceder este parámetro. Lo mismo aplica para el DMSO.

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino

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

Las líneas celulares provenientes de CaCu fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, USA), con rojo de fenol, suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina 10^6 U/l (Grunenthal, MEX), y STN (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5 %, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantienen incubados a 37 °C, 5 % CO₂ y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70 % (Morgan y Darling, 1993). A partir de estos cultivos, se sembraron en cajas de 96 pozos (3500 células / pozos) en las mismas condiciones, después de haber estimulado las células con los compuestos (Disulfiram, MeDDTC, MeDDTC-SO) a partir de una concentración de 1.56 µg/ml a 200 µg/ml (tomado del stock), se obtuvo una gráfica dosis respuesta que originó los intervalos para determinar la IC₅₀, (concentración adecuada del Disulfiram y sus metabolitos (MeDDTC, Me DDTC-SO) para disminuir el 50 % del número celular en las líneas celulares tumorales de CaCu, y después de 24 horas de tratamiento, la densidad celular fue evaluada por la técnica de incorporación de cristal violeta.

Cuantificación del número celular mediante la técnica de incorporación del colorante de cristal violeta.

Se realizaron cultivos de las líneas de CaCu: CaSki, HeLa y ViBo en placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (3,500 células/pozo), con medio de cultivo RPMI 1640 al 5% SFB por 24 h, transcurridas 24 h de adhesión, se trataron los cultivos retirando el medio y colocando medio con las condiciones que a continuación se describen: Control testigo, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco; Control del vehículo, células tratadas con la máxima cantidad de volumen del disolvente para el compuesto; Tratamientos, una curva con distintas concentraciones de los compuestos Disulfiram, MeDDTC y MeDDTC-SO. En todos los casos el volumen final de cada pozo fue de 100 µl. Transcurridas las 24 h de tratamiento, se evaluó el número celular utilizando la técnica de incorporación de cristal violeta, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron durante 20 minutos con glutaraldehído al 1.1% (SIGMA- Aldric, USA); durante 15 min, cumplido el tiempo se retiró el fijador y se lavaron con agua bidestilada, y secadas al aire, en seguida se

adicionó 50 μ l / pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA- Aldric, USA) pH 6.0, y se mantuvieron por 20 minutos en agitación constante, posteriormente al término del tiempo de tinción las placas de cultivo se lavaron más de tres veces hasta eliminar el exceso de colorante que no se incorporó a las células y se dejó secar al aire para después adicionar 50 μ l / pozo de ácido acético al 10% por 20 minutos a temperatura ambiente y en constante agitación con la finalidad de solubilizar el colorante cristal violeta asimilado por las células. Posteriormente se procedió a determinar la absorbancia de la solución de ácido acético por espectrofotometría en un lector de placas tipo ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 590 nm, las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control (Kueng *et al.*, 1989). Los datos obtenidos se analizaron en hoja de cálculo de Excel y se calculó la IC_{50} , es decir, la concentración necesaria para inducir un decremento del 50% en el número celular.

Para proceder en cada una de las evaluaciones posteriores se verificó que el efecto de los compuestos sea del 50% para cada una de las tres líneas celulares de CaCu.

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

Para realizar el cultivo de linfocitos humanos, se colectaron 20 ml de sangre heparinizada de personas aparentemente sanos en tubos con EDTA. Se transfirieron 5 ml de sangre periférica a tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) con 5 ml de ficol Histopaque (Sigma-Aldrich, USA), y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm más cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, se dejaron centrifugando por 25 minutos más. Terminada la centrifugación se obtuvieron 4 fases de las cuales se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, (nube blanca). Posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a un tubo estéril y resuspendido en 10 ml de PBS cada uno, a continuación, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se centrifugaron la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendido nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero y se determinará el número celular utilizando la cámara de Neubauer.

Para evaluar la proliferación por incorporación de carboxifluoresceina (CFSE) (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en PBS y se le agregó a la suspensión celular 10 μ l de (CFSE) (2 μ M por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS suplementado 5 % de SFB, y se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (PHA) los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad

de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 $\mu\text{l/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA) 10 $\mu\text{g/ml}$ 1×10^6 (Micro Lab S.A., Méx.)

Una vez marcadas y en presencia de PHA, las células contenidas en cada tubo fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc. USA) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB con una cantidad de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μl e incubadas 48 h. Para el tratamiento pasado el tiempo de 48 h se retiró el medio de cultivo y se agregó la IC_{50} de los compuestos a evaluar en medio de cultivo fresco RPMI-1640 al 20 % de SFB, en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml, se agregó la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total. En el ensayo se utilizó como control negativo células sin tratamiento y células tratadas con 1 % de Etanol y/o DMSO (concentración máxima empleada de etanol en la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$). Las células se cosecharon a las 72 h de cultivo (24 horas de estímulo) y la marca fluorescente fue determinada por citometría de flujo. Los datos capturados fueron analizados por medio del software Flowing 2.5.1.

Para la evaluación, primeramente, los cultivos fueron observados y fotografiadas cada una de las condiciones en un Microscopio invertido AE30/AE31, MOTIC, con un aumento de 40 veces. Los linfocitos fueron cosechados a partir de los cultivos de cada pozo y centrifugando a 1,500 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno a 4 °C durante 5 min, se retiró el verseno centrifugando por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se realizaron dos lavados resuspendiendo en 500 μl de PBS, y se agregó 500 μl de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA) adquiriendo los datos con el programa FACS Diva versión 6.1.2 y finalmente se procesaron los datos en el programa Flowing 2.5.1.

Determinación de la muerte celular por necrosis mediante la liberación de la enzima LDH en el sobrenadante de cultivos células tumorales de CaCu y de linfocitos humanos no tumorales.

El procedimiento para evaluar la muerte celular por necrosis consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente específicas para células tumorales (cáncer cervicouterino) y células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana). El efecto necrótico se determinó mediante la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) con un kit (CytoTox 96) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, que brevemente consiste como a continuación se enuncia. Cumplidas las 24 h de tratamiento con las IC_{50} determinada para cada compuesto en cada línea celular de CaCu, fueron considerados un control positivo, un control basal o negativo a los cuales solo se cambió el medio de cultivo por medio fresco y un control que contemplo la cantidad máxima de DMSO o Etanol utilizada para solubilizar los compuestos y una muestra por cada una de las IC_{50}

correspondientes de cada compuesto dependiendo de la línea celular. Se realizó el tratamiento para cada una de las líneas celulares y 1 hora antes de cumplir el tiempo de estímulo se agregó tritón X-100 al 1% al control positivo. Cumplidas las 24 horas y se recuperó el medio de cultivo en placa de fondo cónico y se centrifugó a 4 ° C durante 5 minutos a 4000 rpm, se colocaron 40 µl del medio centrifugado en una placa de fondo plano con 40µl de la mezcla de reacción del kit y se incubaron durante 25 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, pasado el tiempo de reacción se aplicó inmediatamente 40µl de solución de paro. La LDH oxida el lactato a piruvato, los protones movilizados reaccionan con la sal de tetrazolio 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) reduciéndola a formazán. El aumento en la cantidad de formazán producida en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El colorante formazán es soluble en agua y puede ser detectado por espectrofotometría a 492 nm de absorbancia. Finalmente, el ensayo se evaluó en un lector de placas tipo ELISA (CHROMATE) a 492 nm, y los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100.

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

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm² (17,500 células/caja de cultivo), en un volumen de 0.5 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. A las 24 horas se trataron los cultivos con la IC₅₀ del compuesto a evaluar en medio de cultivo fresco al 5 % de STN, al control testigo se le realizó únicamente cambio de medio fresco, al control positivo se le agrega medio fresco con camptotecina (Hela:7 µg/ml, CaSki:5 µg/ml, y ViBo:12 µg/ml), y como control del vehículo se utilizó etanol a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Después de 24 horas se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS durante 3 minutos cada uno en agitación suave. Posteriormente las células fueron fijadas durante 15 min con paraformaldehído al 2 % en PBS, el cual se preparó al momento. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y se permearon con una solución de tritón X-100 al 0.5 % en PBS durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron 3 veces con PBS para colocar un volumen aproximado de 10 µl por muestra del fluorocromo DAPI (SIGMA-Aldrich, USA) dejando incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e inmediatamente se retiró el exceso de DAPI lavando 3 veces con PBS durante 3 minutos cada lavado, finalmente se procedió a montar las muestras en portaobjetos usando medio de montaje antifolding (Vectashield, USA), y fueron selladas con resina de nitrocelulosa y almacenadas en congelación a -10°C para su posterior evaluación. Las preparaciones posteriormente se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Inmunolocalización de la caspasa 3 activa por Inmunofluorescencia.

Para determinar si el DSF y sus metabolitos (MeDDTC y MeDDTC-SO) inducen un incremento en la concentración de caspasa 3 activa, como parámetro para inducir apoptosis, fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm² 17,500 células, en un volumen de 0.5 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. A las 24 horas de cultivo las líneas celulares de CaCu se trataron con la IC₅₀ correspondiente a cada compuesto a evaluar en medio de cultivo fresco al 5 % de STN, al control testigo se le realizó únicamente cambio de medio fresco, al control positivo se preparó con medio fresco y camptotecina (Hela:7 µg/ml, CaSki:5 µg/ml, y ViBo:10 µg/ml), y como control de vehículo se utilizó el disolvente correspondiente a cada compuesto (Etanol o DMSO) a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Para realizar la detección de la caspasa-3 activa en ensayos de inmunocitoquímica, después de 24 horas de tratamiento con las IC₅₀ del Disulfiram y sus metabolitos, se retiró el medio de cultivo, primeramente las células se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído al 2 % en PBS, al término del tiempo se lavaron las células cuidadosamente 3 veces con PBS y posteriormente las células se permearon con una solución de tritón X-100 al 0.5 % (GIBCO,USA) en PBS durante 5 minutos a 4 °C, y nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, enseguida se realizó un bloqueo con PBS-BSA Tween 20 (Albumina Sérica de Bovino) durante una hora, después se adicionó el anticuerpo primario para caspasa-3 activa (Anti-caspasa 3 activa anticuerpo producido en conejo 1:50 en PBS; SIGMA - Aldrich, USA) y se incubó durante 24 horas a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó al anticuerpo secundario con fluorocromo (anticuerpo desarrollado en cabra anti-conejo anti-caspasa-3 activa con FITC 1:200 en PBS, Neomarker Fremont, USA) en cámara húmeda y en oscuridad durante 2 horas, posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS; se les aplicó 10 µl por muestra del fluorocromo DAPI (4',6- diamidino-2- phenylindole, SIGMA-Aldrich, USA), y se incubaron durante 1 minuto e inmediatamente se lavaron con 3 veces con PBS, finalmente se realizó el montaje de las muestras en portaobjetos con medio de montaje (VECTASHIELD Mounting Medium, VECTOR LABORATORIES, USA), y fueron selladas con resina de nitrocelulosa. Finalmente, las preparaciones fueron observadas y fotografiadas por un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP), en las cuales la coloración verde indicó la presencia de caspasa- 3 activa.

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

Se sembraron 17,500 células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCu HeLa CaSki y ViBo, en un volumen de 0.5 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. Al paso de las 24 h se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio fresco RPMI-1640 al 5 % de STN conteniendo la IC₅₀ determinada para cada línea celular del Disulfiram y sus metabolitos (MeDDTC y MeDDTC-SO), al control testigo se les realizó únicamente cambio de medio fresco, al control positivo se agregó medio fresco con camptotecina (Hela: 7 µg/ml, CaSki: 5 µg/ml, y ViBo:10 µg/ml), y como control de vehículo se utilizó el disolvente correspondiente a cada compuesto (Etanol o DMSO) a una concentración de 0.5 % en RPMI-1640 a 5 % de STN y se incubó por 24 h. Posteriormente se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo. El procedimiento se detalla de la siguiente manera: las células fueron cosechadas y fijadas a las 24 horas de cultivo, con metanol - PBS 1:1 durante 1 hora, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario policlonal anti-caspasa 3 activa, desarrollado en conejo (SIGMA) 1:500 en PBS y se dejó incubando toda la noche a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo desarrollado en cabra anti-conejo anti-caspasa-3 activa con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), y se mantuvo en oscuridad durante 3 horas, posteriormente fueron lavadas las muestras 3 veces con PBS. Finalmente, el botón celular fue diluido en 500 ml de PBS y evaluado en el citómetro de flujo marca FACSAria II; adquiriendo un mínimo de 10,000 eventos para finalmente los datos fueron procesados en el programa WinMDI.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se mostraron como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 3 repeticiones. Las medias y las desviaciones estándar (SD) se calcularon utilizando Excel (Microsoft Office, versión 2010). Para el análisis estadístico de las diferencias se realizó mediante análisis de varianza (ANDEVA) para la comparación entre medias, utilizando el programa estadístico SPSS v.10.0 para Windows seguida de la prueba de Tukey, para determinar la diferencia entre pares de medias se utilizó una prueba de t-Student con un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Los datos provenientes de citometría de flujo fueron adquiridos con el software FACS Diva versión 6.1.2, para su análisis se seleccionó el área correspondiente al control delimitando la fluorescencia basal, en base a eso se observó el desplazamiento de los tratamientos.

RESULTADOS

Actividad antiproliferativa del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCU (CaSki, HeLa y ViBo) y células no tumorales.

Con la finalidad de evaluar si el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO tienen un efecto antiproliferativo en líneas celulares de CaCu, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratados con diferentes concentraciones de los compuestos y la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% del número celular (IC_{50}) fue calculada (Figura 6; Tabla 5).

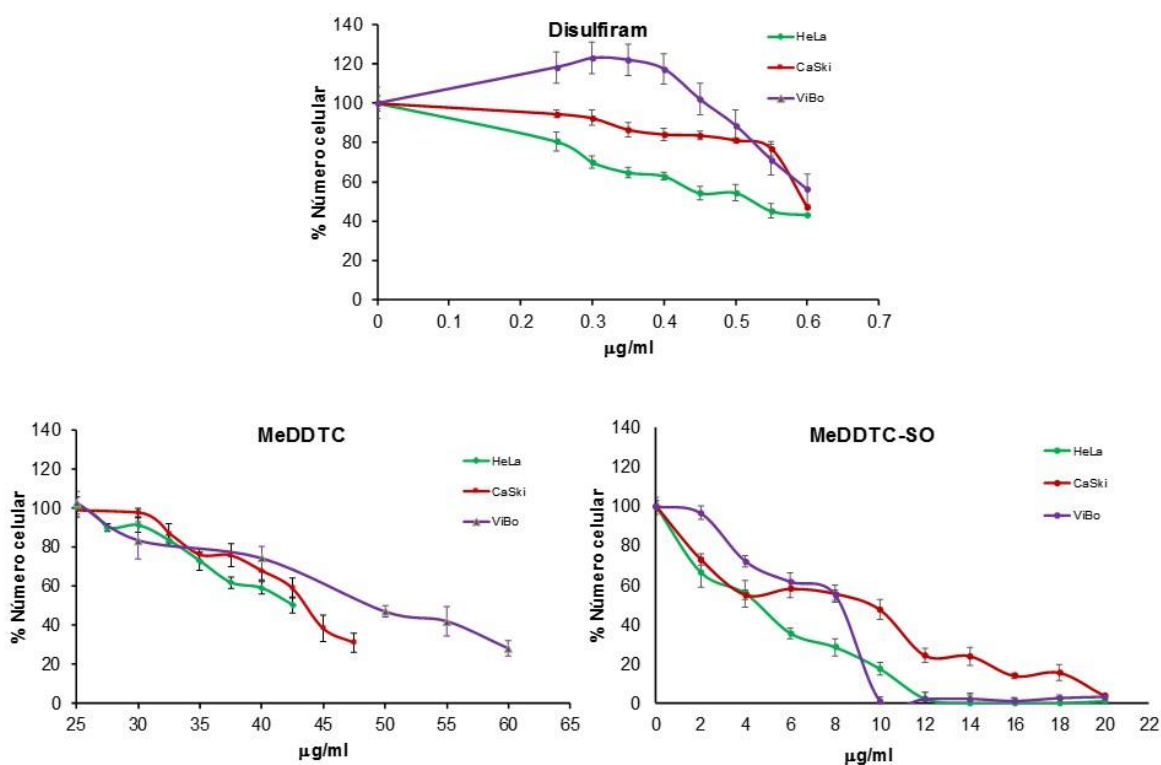


Figura 6. Efecto del DSF y sus metabolitos MeDDTC, y MeDDTC-SO sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa, CaSki, y ViBo. 3500 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de los compuestos por 24 horas, posteriormente el número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos en la Figura 6, indican que el efecto antiproliferativo del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en las tres líneas tumorales afectan el potencial proliferativo de manera dosis dependiente, con sus respectivas IC_{50} , mostradas en la Tabla 5.

	HeLa	CaSki	ViBo
	μM (μg/ml)		
DSF	1.7 (0.5)	2.0 (0.6)	2.3 (0.7)
MeDDTC	257 (42)	263 (43)	306 (50)
MeDDTC-SO	25.1 (4.5)	22.3 (4)	44.7 (8)

TABLA 5. Valores de CI_{50} calculadas de los compuestos Disulfiram y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO para las tres líneas celulares tumorales (HeLa, CaSki y ViBo). Se muestran las concentraciones de IC_{50} en $\mu\text{g/ml}$ y su equivalente en μM .

No obstante que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO presentan una actividad antiproliferativa en las células de cáncer cervicouterino, el DSF presentó una mayor actividad, mientras que el MeDDTC disminuyó la potencia en 132 a 151 veces con respecto al DSF y el MeDDTC-SO solo lo disminuyó en 11 a 19 veces, sugiriendo que la actividad antiproliferativa del DSF es disminuida.

Actividad antiproliferativa del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células no tumorales.

Una vez que los resultados anteriores evidencian que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO presentan una actividad antiproliferativa en las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo, es necesario determinar el efecto antiproliferativo de estos compuestos en células no tumorales.

Para llevar a cabo este propósito, cultivos de una población enriquecida de linfocitos de sangre periférica humana, fueron tratados con los compuestos a las 48 horas de cultivo y la actividad antiproliferativa fue evaluada a las 72 h (24 h de estímulo) a través del ensayo de generación de colonias de activación y proliferación, observados con un microscopio invertido, tomando fotografías de cada una de las condiciones experimentales (Fig. 7) y la proliferación celular de estos mismos cultivos fue evaluada mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, cuantificada por citometría de flujo (Fig.8).

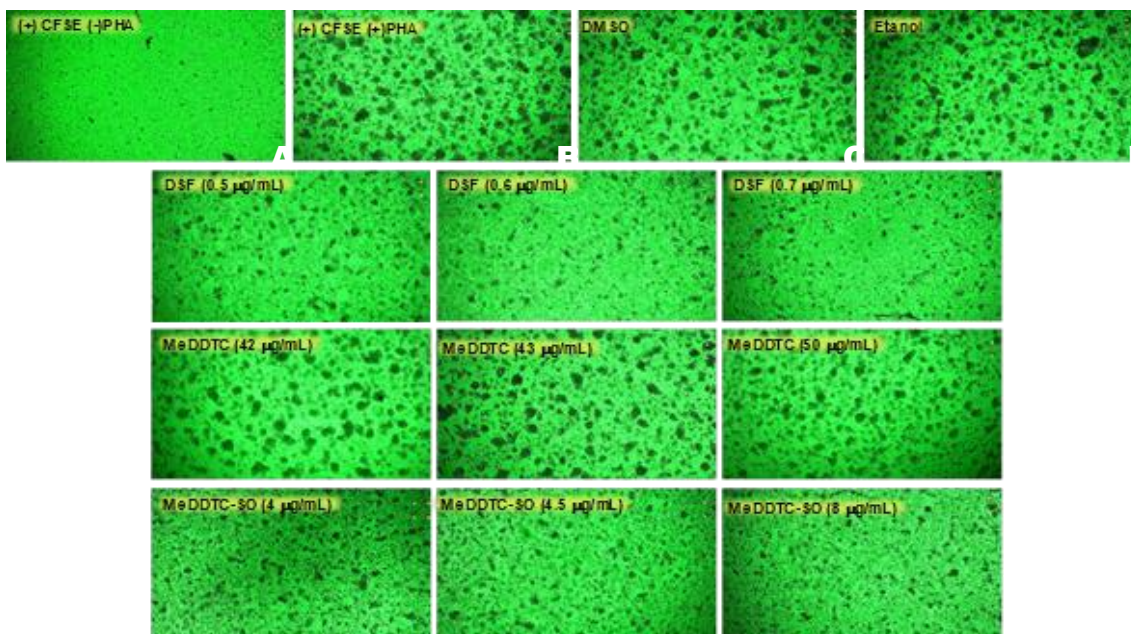


Figura 7. Efecto del Disulfiram (DSF) y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en la formación o permanencia de las colonias de activación en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. Se sembraron 200,000 células/pozo, en placas de cultivo de 96 pozos, y fueron tratadas con las respectivas IC_{50} obtenidas para las células tumorales a las 48 horas de cultivo. Las células se cosecharon a las 72 h de cultivo (24 horas de estímulo) y la marca fluorescente fue determinada por citometría de flujo. Los datos capturados fueron analizados por medio del software Flowing 2.5.1 los cultivos fueron observados en un Microscopio invertido AE30/AE31, MOTIC, con un aumento de 40 veces.

Como se puede apreciar en la figura 7, las colonias de activación en los cultivos control y los vehículos (DMSO y Etanol), presentaron una densidad abundante de células, con tamaño relativamente grande y un número elevado. Sin embargo, el DSF y el MeDDTC-SO inducen una disminución en el número y tamaño de las colonias, indicando que estos compuestos afectan la proliferación de las células linfocíticas. No obstante, el efecto inhibitor del DSF y del MeDDTC-SO, en el tratamiento de MeDDTC se observan colonias de buen tamaño y en un número similar al del control o etanol, sugiriendo que este compuesto podría no afectar la proliferación de las células linfocíticas. De manera paralela, los resultados de proliferación celular mostrados en la figura 8, tabla 6, indican que el DSF inhibió la proliferación de las células linfocíticas en un 30 a un 41%, mientras que el MeDDTC-SO, generó una inhibición del 51 a un 55%. Resultados que junto con los descritos en la figura 7 para estos compuestos, confirman que el DSF y el MeDDTC-SO inhibieron en el potencial proliferativo de las células linfocíticas. Así mismo, los resultados mostrados para el MeDDTC en la figura 7 en conjunto con los obtenidos en la figura 8, confirman que este compuesto no afecta la proliferación de las células linfocíticas a estas concentraciones.

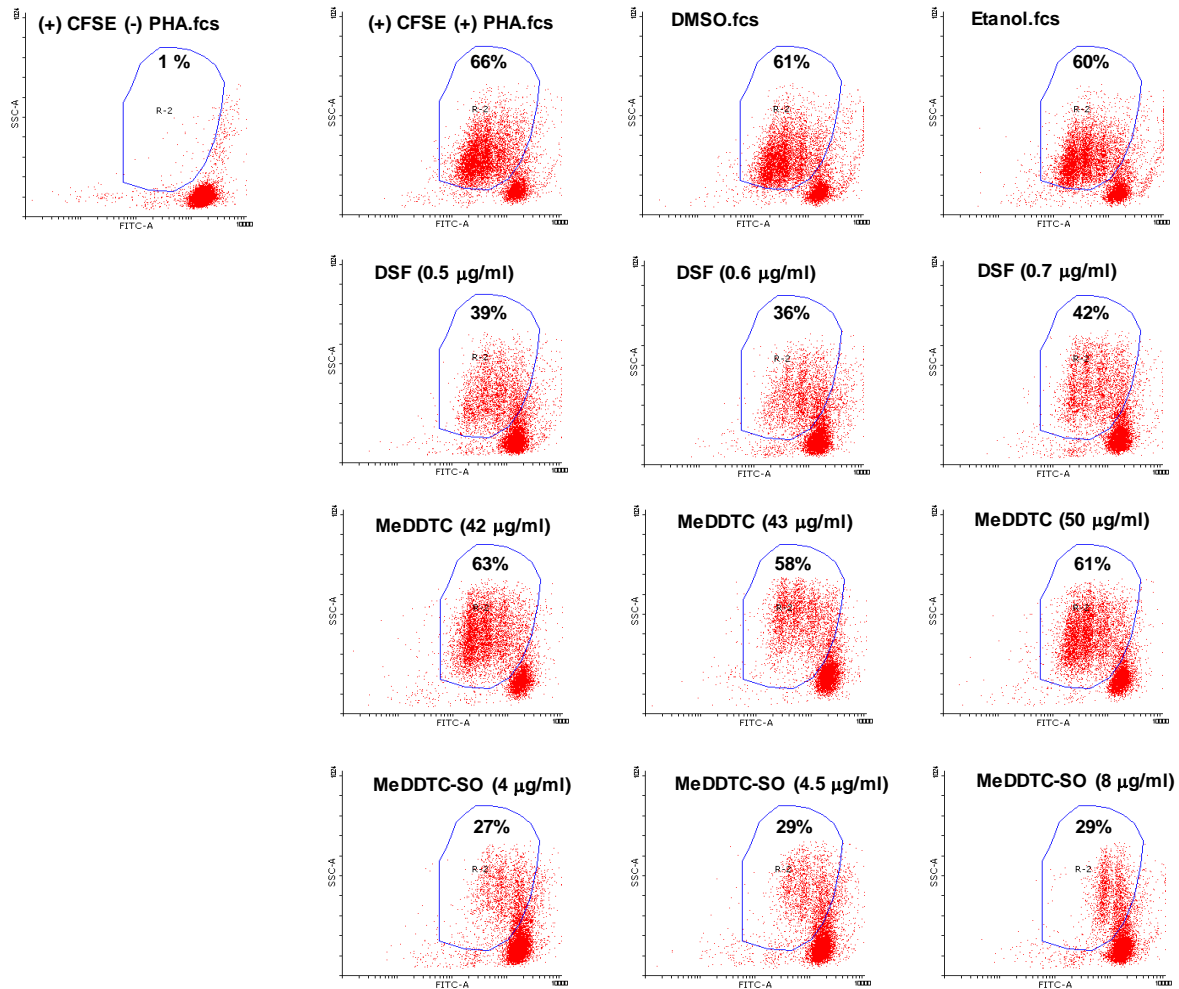


Figura 8. Efecto del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en la proliferación de una población enriquecida de linfocitos de donadores aparentemente sanos marcados con CFSE, y estimuladas con PHA. Se sembraron 200,000 células/pozo marcada con carboxifluoresceína, en placas de cultivo de 96 pozos y fueron tratadas con las concentraciones de las respectivas IC_{50s} obtenidas para las células tumorales a las 48 horas de cultivo y las células fueron cosechadas a las 72 h de cultivo (24 horas de estímulo). La proliferación celular fue determinada por citometría de flujo. En el eje de las X de cada grafico se muestra la intensidad de la fluorescencia que representa la población celular, y en el eje de las Y indica la complejidad de la población celular. El ensayo es representativo de un mínimo de tres ensayos.

Condición	IC50 (µg/ml)	Región de proliferación (R2)	% Proliferación	% Inhibición
(+) CFSE (-) PHA		1		
(+) CFSE (+) PHA		66		
DMSO		61	100	0
DSF	0.5	39	65	35
DSF	0.6	36	59	41
DSF	0.7	42	70	30
Etanol		60	100	0
MeDDTC	42	63	104	0
MeDDTC	43	58	95	5
MeDDTC	50	61	101	0
MeDDTC-SO	4	27	45	55
MeDDTC-SO	4.5	29	49	51
MeDDTC-SO	8	29	49	51

TABLA 6. Efecto de las concentraciones de IC₅₀s obtenidas para las células tumorales con el Disulfiram y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en cultivos de células linfocíticas.

Actividad Necrótica del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCu (CaSki, HeLa y ViBo) y células no tumorales.

Se ha descrito que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría ser generado por una acción citotóxica. Una de las principales características de la actividad citotóxica es el rompimiento de la membrana citoplasmática, liberando el contenido intracelular al exterior de la célula y es considerada una característica primordial de la muerte necrótica. En el citoplasma están presentes una gran variedad de moléculas con funciones específicas, entre las cuales se encuentran algunas enzimas, como la Lactato Deshidrogenasa (LDH), la cual convierte el lactato en piruvato. La LDH es una molécula grande que está presente en el citoplasma y se libera al medio cuando hay pérdida de la integridad de la membrana celular, por lo que al ser detectada extracelularmente es considerada un marcador de muerte necrótica (Karp, 2006).

Con el propósito de establecer si el Disulfiram y los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO ejercen una acción necrótica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con la IC₅₀ obtenida para cada uno de los compuestos antes mencionados, y la actividad de LDH liberada en el sobrenadante de cultivo fue considerada como una medida de la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática. Las tres líneas celulares se trataron con Tritón x-100 en experimentos independientes, y la LDH liberada se ajustó al 100% como un control positivo. Los resultados obtenidos describen el efecto

necrótico para cada uno de los compuestos evaluados en este trabajo al ser aplicado y analizado en cada línea celular de CaCu (Figuras 9).

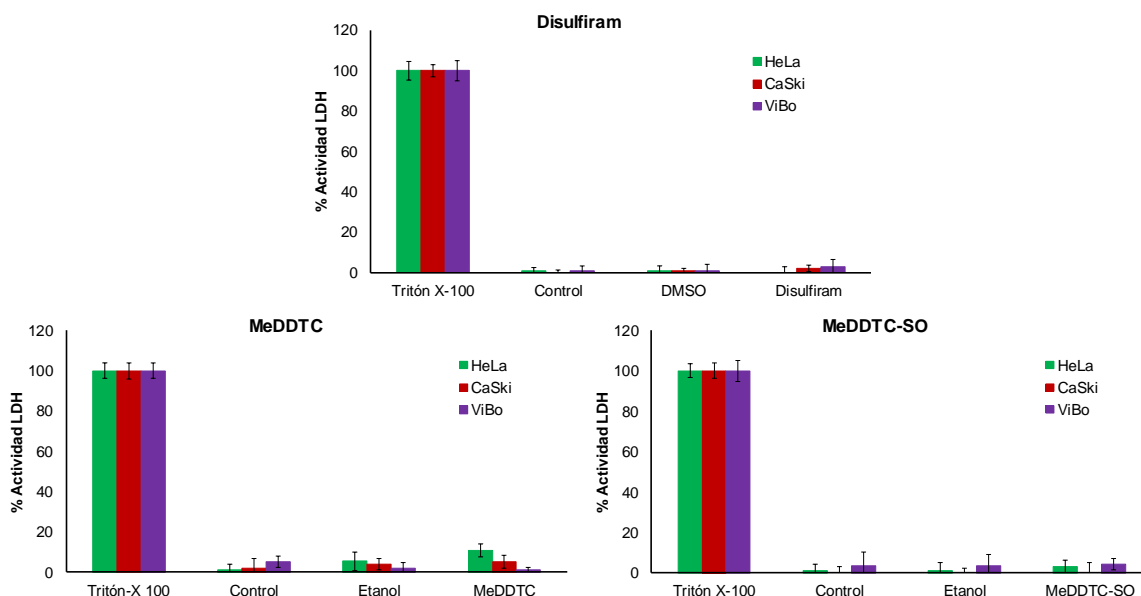


Figura 9. Actividad necrótica del Disulfiram y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en las líneas celulares de CaCu (HeLa, CaSki y ViBo). Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (3,500 células /pozo) y tratadas con las IC_{50} s calculadas para cada línea celular durante 24h. La actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares mediante el uso del kit (LDH-Cytotoxicity Assay kit (Biovision: NO Cat. K311-400)). (*. $p < 0.05$, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey). *. $p < 0.05$, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey.

Los resultados mostrados en la figura 9, indican que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO, no indujeron a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a liberar LDH al exterior celular, indicando que el DSF y sus metabolitos no inducen a estas células a una muerte necrótica (Figura 9) y que el decremento en el número celular observado es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

Con respecto a las células no tumorales, el proceso de muerte necrótica se evaluó usando cultivos de células linfocíticas humanas de sangre periférica. Se activaron con PHA y se trataron con los valores de IC_{50} de los compuestos utilizados anteriormente. Al igual que en las células tumorales, los resultados indican que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO no inducen a las células linfocíticas a liberar LDH al medio extracelular, indicando que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a una muerte celular por necrosis (Figuras 10).

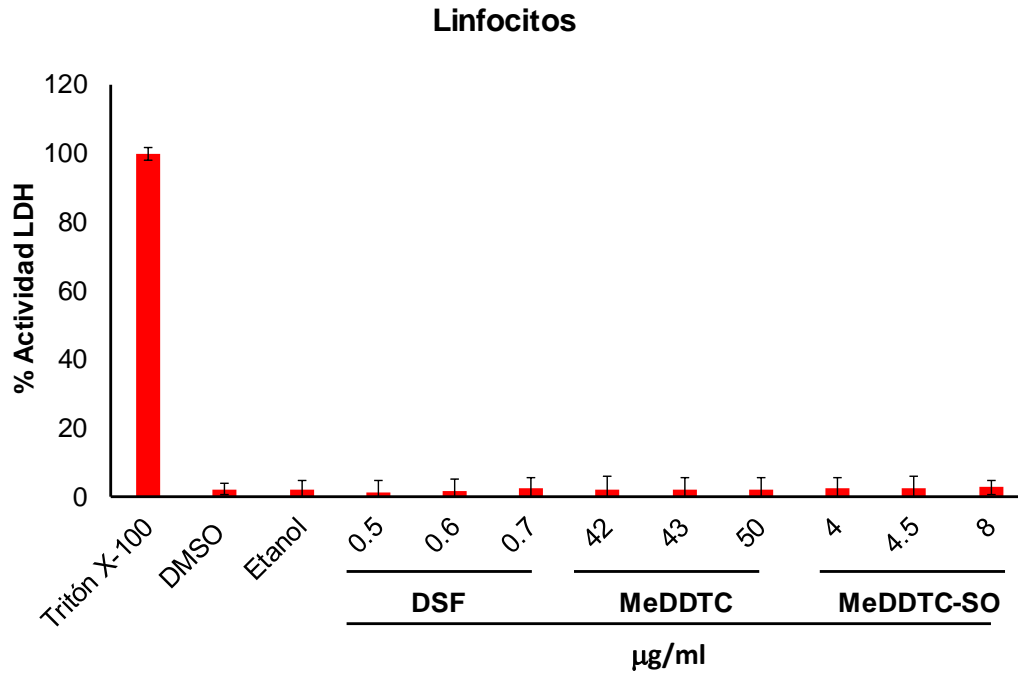


Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad (necrosis) del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en cultivos de linfocitos humanos. Los linfocitos se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos, se trataron con la IC_{50} calculada del Disulfiram y sus metabolitos a las 48 horas de cultivo para cada línea celular y se evaluaron después de 24 h de estímulo. La actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares. *. $p < 0.05$, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey.

Efecto apoptótico del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células de CaCu (CaSki, HeLa y ViBo). Determinación de cuerpos apoptóticos (DAPI) y detección de caspasa 3 activa.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos: contracción celular, la condensación de la cromatina, núcleos más compactos, formación de cuerpos apoptóticos, pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas, entre otras, así como la activación de algunas caspasas. Con el fin de evaluar si el DSF y sus metabolitos inducen a las células CaSki, HeLa y ViBo a una muerte apoptótica, cultivos de las tres líneas celulares fueron tratadas con las IC_{50} s del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO durante 24 h y posteriormente fueron teñidas con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la morfología celular fue observada por microscopia de contraste de fases y epifluorescencia (Figuras 11,12 y 13). En estas mismas preparaciones y de manera simultánea, la caspasa-3 activa fue detectada por inmunocitoquímica y observada por epifluorescencia en un microscopio Eclipse TSR2-FL-NIKON.

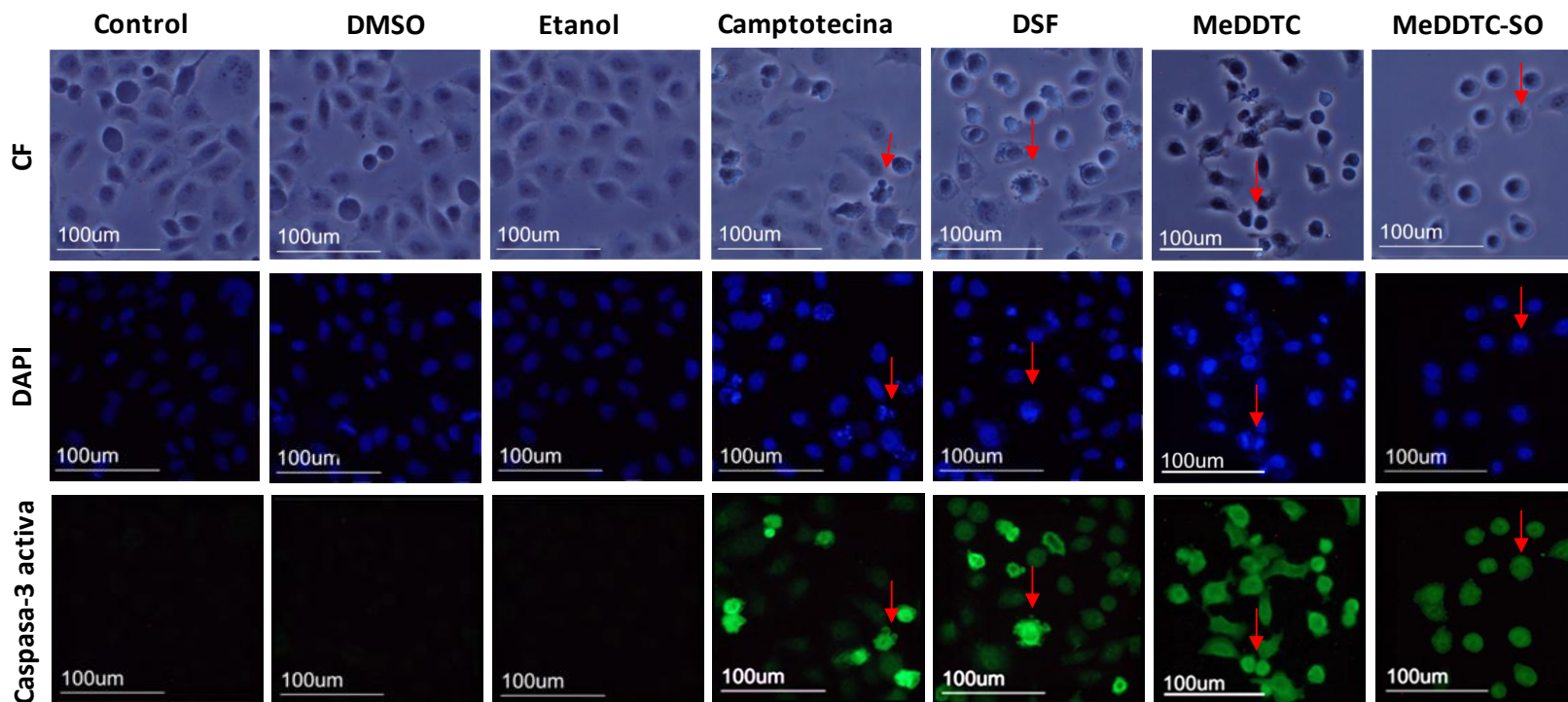


Figura 11. Inmunodetección de la caspasa-3 activa. Cultivos de células HeLa, tratados con las IC_{50} determinada para los compuestos (DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO). Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm^2 (17,500 células / caja de cultivo), por 24 horas para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con las concentraciones IC_{50} de los compuestos mencionados correspondiente a la línea celular durante 24 horas, dando un tiempo total 48 h. Células sin tratamiento (control); células tratadas con Etanol y/o DMSO; células tratadas con camptotecina (control positivo). Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunolocalización y observadas en un microscopio de epifluorescencia con una barra de calibración de $100\ \mu\text{m}$. Las flechas indican los cambios en la morfología celular al aplicar el tratamiento de los compuestos en contraste de fases (CF), la contracción del núcleo, la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación de ADN (Tinción de DAPI), así como la tinción positiva a la presencia de la caspasa 3 activa. Las microfotografías son una representación de por lo menos tres ensayos independientes.

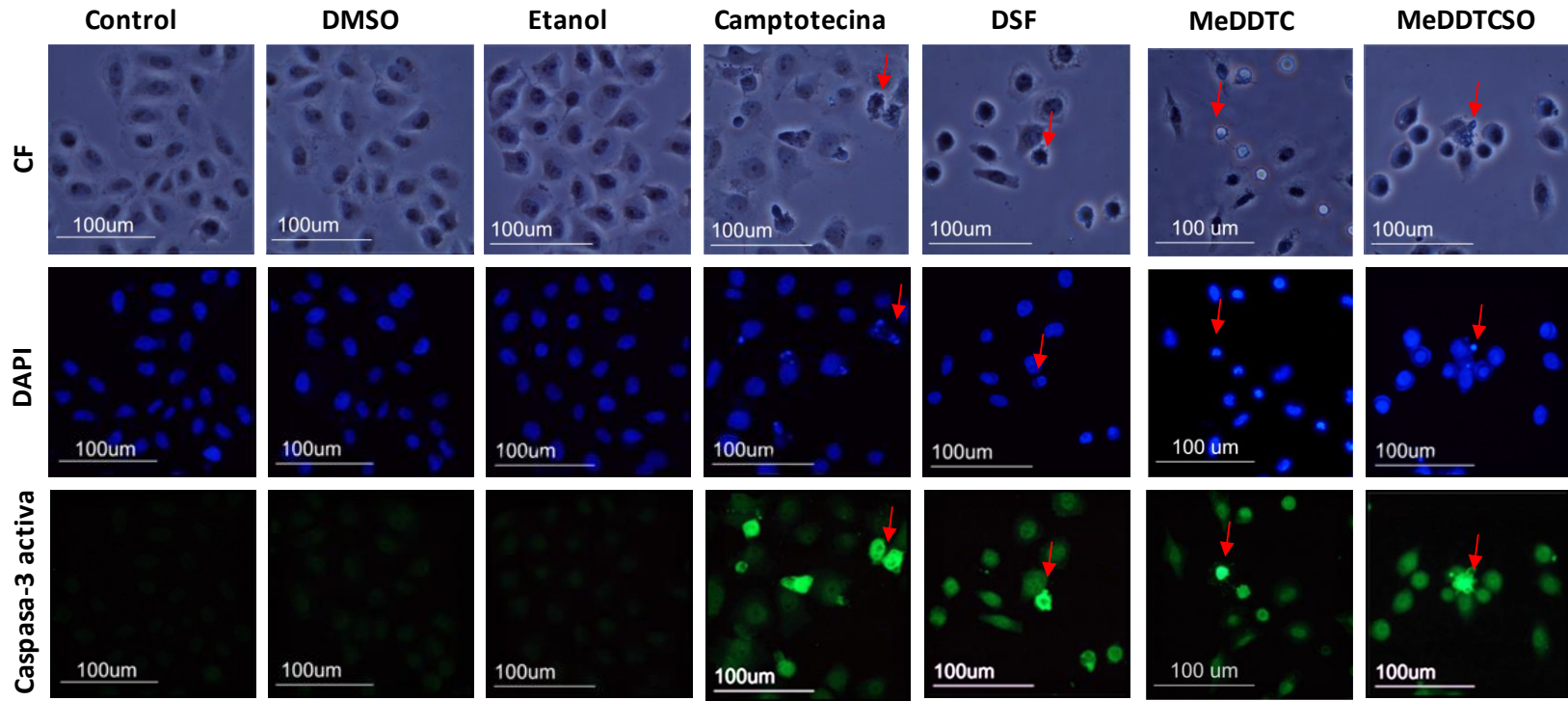


Figura 12. Inmunodetección de la caspasa-3 activa. Cultivos de células CaSki, tratados con las IC_{50} determinada para los compuestos (DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO). Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm^2 (17,500 células / caja de cultivo), por 24 horas para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con las concentraciones IC_{50} de los compuestos mencionados correspondiente a la línea celular durante 24 horas, dando un tiempo total 48 h. Células sin tratamiento (control); células tratadas con Etanol y/o DMSO; células tratadas con camptotecina (control positivo). Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunolocalización y observadas en un microscopio de epifluorescencia con una barra de calibración de $100\ \mu\text{m}$. Las flechas indican los cambios en la morfología celular al aplicar el tratamiento de los compuestos en contraste de fases (CF), la contracción del núcleo, la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación de ADN (Tinción de DAPI), así como la tinción positiva a la presencia de la caspasa 3 activa. Las microfotografías son una representación de por lo menos tres ensayos independientes.

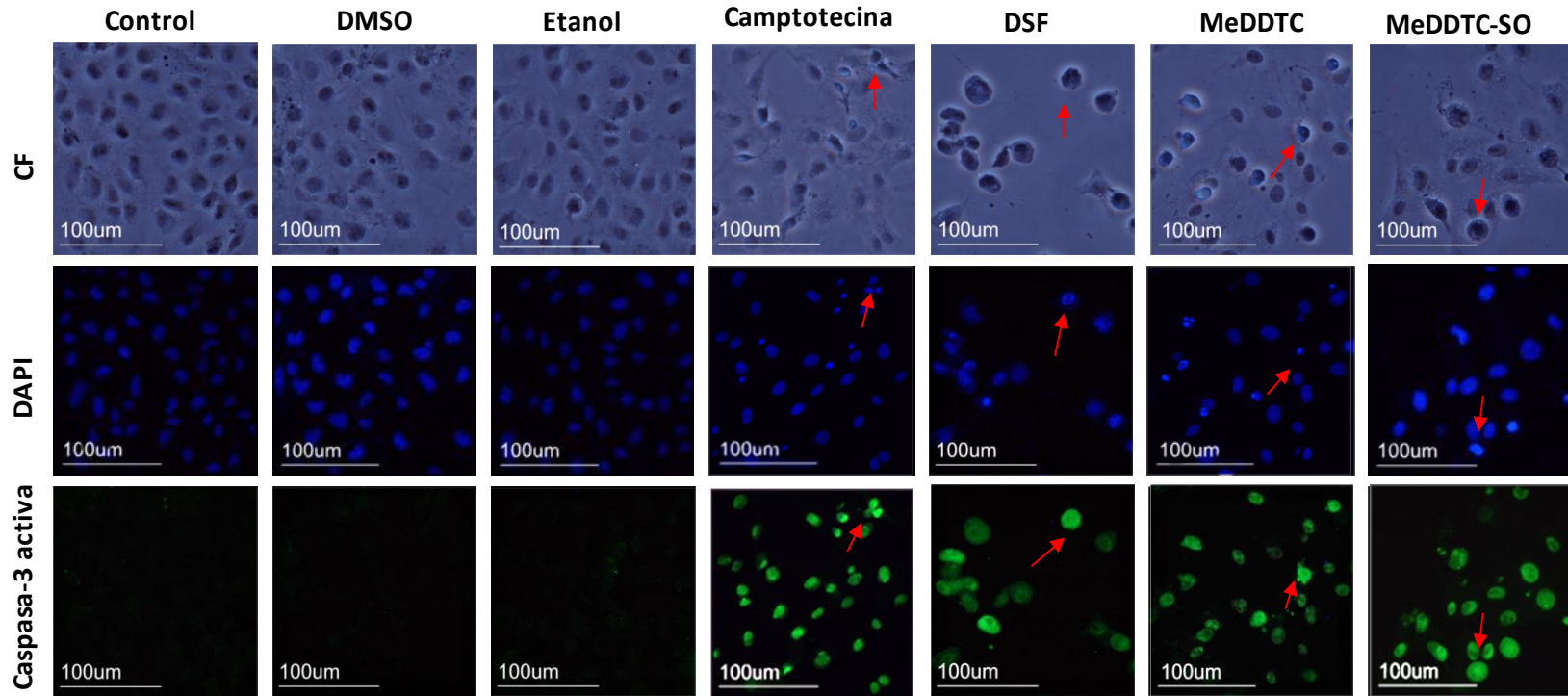


Figura 13. Inmunodetección de la caspasa-3 activa. Cultivos de células ViBo, tratados con las IC_{50} determinada para los compuestos (DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO). Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1 cm^2 (17,500 células / caja de cultivo), por 24 horas para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con las concentraciones IC_{50} de los compuestos mencionados correspondiente a la línea celular durante 24 horas, dando un tiempo total 48 h. Células sin tratamiento (control); células tratadas con Etanol y/o DMSO; células tratadas con camptotecina (control positivo). Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunolocalización y observadas en un microscopio de epifluorescencia con una barra de calibración de $100\ \mu\text{m}$. Las flechas indican los cambios en la morfología celular al aplicar el tratamiento de los compuestos en contraste de fases (CF), la contracción del núcleo, la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación de ADN (Tinción de DAPI), así como la tinción positiva a la presencia de la caspasa 3 activa. Las microfotografías son una representación de por lo menos tres ensayos independientes.

Los resultados presentados en las figuras 11, 12 y 13 muestran que la morfología de las células del control y del vehículo (DMSO y Etanol) son muy similares, es decir, las células presentan una forma poliédrica con un citoplasma extendido y con proyecciones citoplasmáticas (Contraste de fases). El núcleo presenta un tamaño regular, con la cromatina distribuida por todo el núcleo (DAPI). Sin embargo, en los cultivos tratados con los compuestos, la morfología se ve alterada, las células presentan una forma esférica (pierden la forma poliédrica) con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas y con un tamaño disminuido (contracción celular) (Contraste de fases). También se observan núcleos compactos con cromatina condensada y en algunas células con núcleos fragmentados y con formación de cuerpos apoptóticos (DAPI), lo cual indica que el DSF y sus metabolitos inducen en las células tumorales a presentar características morfológicas típicas de células apoptóticas. Con respecto a la detección de la caspasa-3 activa, los resultados muestran que las células control y las células tratadas con el vehículo (DMSO y Etanol) no son positivas a la caspasa-3 activa, mientras que las células tratadas con el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO son positivas a esta caspasa, sugiriendo que el proceso apoptótico inducido por el DSF y sus metabolitos en las células tumorales es dependiente de caspasas. No obstante, estos resultados, las técnicas utilizadas no establecen de manera directa y precisa, cuántas células de la población celular son positivas a la caspasa-3 activa. Con la intención de cuantificar el número de células tumorales que son positivas a la caspasa-3 activa, cultivos de las tres líneas celulares fueron tratados con las IC_{50} s correspondientes a cada compuesto y las células positivas a la caspasa-3 activa fueron determinadas mediante inmunocitoquímica y cuantificadas por citometría de flujo en un citómetro FACS ARIA II BD (Figura 14, tabla 7).

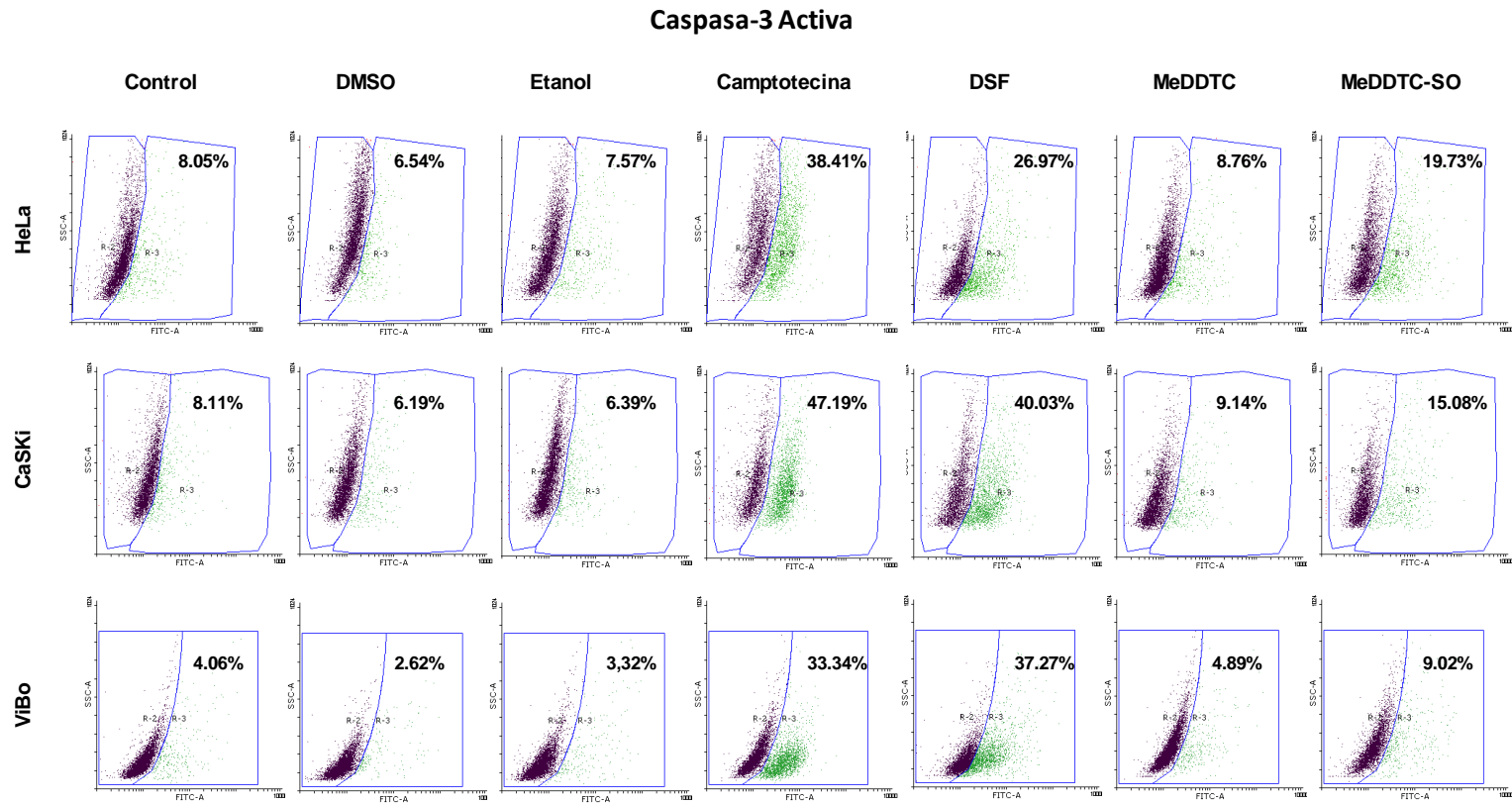


Figura 14. Determinación y cuantificación de la caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales de CaCu HeLa, CaSKI y ViBo tratados con el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos (17,500 células / pozo, posteriormente fueron tratadas con las concentraciones IC₅₀ de los compuestos mencionados correspondiente a cada línea celular durante 24 horas. Dando un tiempo total de 48 h. Células sin tratamiento (control); células tratadas con Etanol y/o DMSO; Camptotecina como control positivo, células tratadas con la IC₅₀ correspondiente a la línea celular de CaCu. Los cultivos fueron cosechados, fijados e incubados con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se incubaron con el anticuerpo secundario con FITC durante 2 horas a 37°C, para finalmente ser evaluados por citometría de flujo

Los resultados mostrados en la figura 14 establecen que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO inducen la activación de la caspasa-3 activa en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, resultados que son acordes con los cambios morfológicos y la formación de cuerpos apoptóticos mostrados en las figuras 11, 12 y 13. Sin embargo, en la figura 14 se puede observar que el DSF induce un mayor número de células positivas a la caspas-3 activa, siguiéndole en cantidad el MeDDTC-SO y por último el MeDDTC. Estos resultados son congruentes con la actividad antiproliferativa, es decir, el DSF presenta la actividad antiproliferativa mayor, siguiéndole el MeDDTC-SO y al último el MeDDTC-SO, secuencia lógica que también se mantiene en la actividad apoptótica donde el DSF presentó la mayor actividad apoptótica, siguiéndole el MeDDTC-SO y al final el MeDDTC.

DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo la segunda causa de muerte por cáncer ginecológico en mujeres mexicanas (INEGI, 2016). Los agentes quimioterapéuticos disponibles no actúan específicamente sobre las células cancerosas, además, su efectividad está limitada por su actividad citotóxica, siendo poco tolerados por las pacientes en fase terminal, debido a las dosis altas que se requieren para el tratamiento. Por ello, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral continúa. Recientemente se ha descrito que algunos fármacos conocidos presentan actividades biológicas nuevas al ser revalorados, un ejemplo de estos compuestos es el Disulfiram (DSF). Este fármaco se ha utilizado para el tratamiento del alcoholismo por más de 60 años, con una farmacocinética bien establecida y una seguridad y tolerancia autorizada por la Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA) que recomienda su dosificación (Jiao *et al.*, 2016; Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2016) y considerándolo como una sustancia relativamente no tóxica cuando se administra en dosis terapéuticas (Shu *et al.*, 2006). El Disulfiram (DSF), sus metabolitos y análogos (Della *et al.*, 2000), se han utilizado clínicamente como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y principalmente en el tratamiento de adicciones como el abuso del alcohol y la cocaína. Actualmente, se ha reportado que tienen actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón, así como leucemias (Wickström *et al.*, 2007). En este trabajo, se determinó que el DSF presenta actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de IC₅₀ de 1.7 a 2.3 μM , las cuales coinciden con el trabajo de Wickström y colaboradores (2007), quienes reportan una concentración de 0.4 μM , para la línea celular HeLa. Además, el hecho de que las líneas celulares HeLa y CaSki estén infectadas con el papiloma virus 18 y 16 respectivamente, así como la ausencia de éste en las células ViBo (HPV-), sugiere que el efecto antiproliferativo del DSF es independiente del HPV. Con respecto a los metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO, nuestros resultados muestran que éstos presentaron actividad antiproliferativa en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, lo cual indica que la actividad antiproliferativa presente en el DSF se conserva en estos dos metabolitos y dicha actividad es significativamente mayor en el DSF.

Desde el punto de vista metabólico y basándonos en la ruta metabólica del DSF propuesta Zaldivar-Machorro, es relevante hacer notar que el metabolito MeDDTC de acuerdo con esta propuesta, este metabolito sería posterior al DSF y catalogado dentro del inicio de esta ruta, indicando con respecto a nuestros resultados que la actividad antiproliferativa presente en el DSF es significativamente menor. Sin embargo, al comparar la actividad antiproliferativa del MeDDTC con el MeDDTC-SO (catalogado como un metabolito posterior al MeDDTC) dicha actividad es mayor en este último sugiriendo que la actividad antiproliferativa del DSF puede verse incrementada o disminuida dependiendo del metabolito.

Con respecto al efecto antiproliferativo del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO en células no tumorales, nuestros resultados indican que el DSF y su metabolito MeDDTC-SO presentan un efecto inhibidor de la proliferación de células linfoides de sangre periférica humana de un 41-55% al aplicar las IC_{50} s obtenidas para las células de CaCu. Sin embargo, es importante resaltar que el MeDDTC no afectó el potencial proliferativo de las células linfoides, esto sugiere que el DSF y algunos de sus metabolitos presentan poca o nula selectividad afectando a las células no tumorales, (linfocitos de sangre periférica humana) y también sugiere que existen metabolitos derivados del DSF que pueden ser compuestos selectivos con las células no tumorales. Con respecto a la actividad necrótica, el Disulfiram y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO no indujeron actividad necrótica ni en las líneas celulares tumorales ni en las células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana), indicando que la baja actividad necrótica presente en el DSF es conservada en sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO y que la actividad antiproliferativa de éstos, se lleva a cabo mediante un mecanismo diferente a la muerte celular necrótica. Estos resultados son relevantes ya que los efectos colaterales generados por los fármacos utilizados en la quimioterapia son el resultado de la actividad necrótica, lo que sugiere que los efectos colaterales del DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO serían menores o mejor tolerados por los pacientes. Existen reportes que concuerdan con lo descrito por la FDA de Estados Unidos, ya que consideran al DSF como un compuesto de baja toxicidad en concentraciones terapéuticas (Jiao *et al.*, 2016). Además, estudios previos demuestran que el DSF es inductor de apoptosis para una amplia gama de líneas celulares de cáncer *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 2003; Cen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Lin, *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2011; Hoda *et al.*, 2016). Sin embargo, con respecto a los metabolitos del DSF la información es escasa. Reportes recientes describen que el DDTC (Dietilditiocarbamato sódico) en líneas de melanoma (c81-46a) a una dosis de 0.888 μ M y el PDTC (Pirrolidina ditiocarbamato) en células de cáncer de mama (MCF-7) con una concentración de 10-25 μ M, así como en células de cáncer de ovario (OVA-14, Cauv-1, OVP-10, MDAH2774 Y SKOV-3) en un rango de concentraciones que fluctúan entre 1-16 μ M, causan un efecto apoptótico (Cheriyán *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2010; Jakubowska-Mućka *et al.*, 2012). En este contexto, nuestros resultados muestran que el DSF y sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO inducen a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a presentar cambios en la morfología celular, observamos células de forma esférica, contraídas, con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas y condensación de la cromatina, compactación y fragmentación nuclear así como la formación de cuerpos apoptóticos, que en conjunto con la inducción de la caspasa-3 activa, indican que el DSF induce muerte por apoptosis en las células tumorales de CaCu y que sus metabolitos MeDDTC y MeDDTC-SO conservan esta actividad. Sin embargo, los resultados de inmunodetección de caspasa-3 activa en estas células, así como la cuantificación de células positivas a dicha caspasa determinada por citometría de flujo, indican que el DSF es un inductor de apoptosis (de 27 al 40 %.), que al ser inicialmente metabolizado a MeDDTC, dicha actividad es disminuida en un rango

de 4.9 a 9.1%, y que al igual que en la actividad antiproliferativa, cuando el MeDDTC es metabolizado a MeDDTC-SO las células que presentan la caspasa-3 activa comienza a recuperarse en un rango de 9 al 19.7%), confirmando que el DSF al ser inicialmente hidrolizado a MeDDTC disminuye su actividad antiproliferativa y apoptótica, las cuales se comienzan a recuperar cuando el MeDDTC es metabolizado a MeDDTC-SO y lo cual sugiere que el grupo sulfóxido no solo es importante para la actividad antiproliferativa, sino también para la inducción de apoptosis. Estos resultados *in vitro* son consistentes a lo reportado en la literatura con respecto al DSF ya que induce apoptosis de una manera significativa en células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, sin embargo, no existen reportes de estudios de los metabolitos del DSF MeDDTC y MeDDTC-SO que describan actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica en células tumorales y no tumorales, lo que nos lleva a proponer al DSF y a sus metabolitos como candidatos para ser estudiados como compuestos con actividad antitumoral con potencial terapéutico. Es importante tomar en cuenta que el DSF suministrado a animales, es rápidamente metabolizado en el estómago a ácido dietilditiocarbámico (DDTC) el cual, a través de un metabolismo de fase II da lugar finalmente a dietiltiometilcarbamato (Me-DDTC) (Faiman *et al.*, 1984), y éste a su vez se metaboliza dando lugar a sus sulfóxido y sulfona. En este contexto se puede sugerir que sus metabolitos son posiblemente los responsables del efecto antitumoral y hace necesario continuar con la evaluación de los demás metabolitos de la ruta metabólica del DSF, generando información que nos permitirá no solo establecer cuáles de los metabolitos presentan la actividad antitumoral, sino que además, permite definir cuál de estos metabolitos presentan mejores características antitumorales que lo harían el mejor candidato para ser evaluado como agente antitumoral con potencial terapéutico, digno de ser estudiado en modelos *in vivo*. Además, el estudio de la relación-estructura-actividad de estos metabolitos, podrá servir de modelo para generar compuestos sintéticos que mejoren su actividad biológica.

CONCLUSIONES

Los metabolitos MeDDTC Y MeDDTC-SO conservan la actividad antiproliferativa del Disulfiram en células de cáncer cervicouterino, éstos compuestos inducen cambios morfológicos característicos de la muerte celular apoptótica y producen un incremento de la caspasa3-activa en estas líneas celulares tumorales. El Disulfiram y el MeDDTC-SO, afectan la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana. Sin embargo, el MeDDTC no presenta efecto antiproliferativo en estas células no tumorales. El Disulfiram y los metabolitos no inducen una muerte celular necrótica tanto en células tumorales como en células no tumorales.

PERSPECTIVAS

No obstante, el avance en la caracterización de la actividad antitumoral del disulfiram, sería conveniente en un futuro cercano evaluar el total de los metabolitos con el fin de hacer un análisis comparativo que nos permita establecer cuál de estos metabolitos presenta la mejor actividad antitumoral. De igual manera y debido a la relevancia que tiene el proceso metastásico en la problemática del cáncer, sería pertinente evaluar si el DSF y sus metabolitos ejercen una actividad antimetastásica. También sería relevante determinar el mecanismo de acción de estos compuestos para establecer posibles blancos que podrían tener una aplicación terapéutica. Además, es importante probar estos compuestos en modelos *in vivo* para valorarlos como agentes terapéuticos contra el cáncer. Por último, sería interesante analizar la relación estructura -actividad de estos compuestos con el propósito de considerar la estructura de estas moléculas como un punto de partida que permita realizar cambios en estas moléculas que conlleven a una mejora de la actividad.

REFERENCIAS

1. Agarwal, R. P., McPherson, R. A., y Phillips, M. (1983). Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 42(2), 293-310.
2. Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Watson, D. (2006). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. España.
3. Alnouti, Y., y Klaassen, C. D. (2008). Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicological sciences*, 101(1), 51-64.
4. Antabus.Fichatécnica.https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/ft/12723/FT_12723.pdf
5. Becker, J. R., Jatlow, P., y McCance-Katz, E. F. (2007). Disulfiram effects on responses to intravenous cocaine administration. *Drug and alcohol dependence*, 87(2), 202-209.
6. Blum, K. S., y Pabst, R. (2007). Lymphocyte numbers and subsets in the human blood: Do they mirror the situation in all organs? *Immunology letters*, 108(1), 45-51.
7. Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard, E. A., White, H. A., y Widemann, C. G. (2004). *Biología celular*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York.
8. Cashman, J. R., Olsen, L. D., Young, G., y Bern, H. (1989). S-Oxygenation of eptam in hepatic microsomes from fresh-and salt water striped bass (*Morone saxatilis*). *Chemical research in toxicology*, 2(6), 392-399.
9. Cen, D., Brayton, D., Shahandeh, B., Meyskens, F. L., y Farmer, P. J. (2004). Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6914-6920.
10. Cen, D., González, I. R., Buckmeier, A. J., Kahlon, S. R., Tohidian, B. N., y Meyskens L. F. (2002). Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: A Redox-related Process. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, pp. 197-204.
11. Chen, D., Cui, Q. C., Yang, H., y Dou, P. (2006). Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug y copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Research*, 66, pp. 10425-10433.
12. Chen, Y. S., y Casida, J. E. (1978). Thiocarbamate herbicide metabolism: microsomal oxygenase metabolism of EPTC involving mono-and dioxygenation at the sulfur and hydroxylation at each alkyl carbon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26(1), 263-267.

13. Cheriyan, V. T., Wang, Y., Muthu, M., Jamal, S., Chen, D., Yang, H., y Rishi, A. K. (2014). Disulfiram Suppresses Growth of the Malignant Pleural Mesothelioma Cells in Part by Inducing Apoptosis. *PLoS ONE*, 9(4), e93711.
14. Cobby, J., Mayersohn, M., y Selliah, S. (1977). The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 202(3), 724-731.
15. Daniel K., Chen D., Orlu S., Cui Q., Miller F., y Q. Dou. (2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Reviews*. 7: 897-908.
16. Dastjerdi, N., Babazadeh, Z., Rabbani, M., Gharagozloo, M., Esmaeili, A., y Narimani, M. (2013). Effects of disulfiram on apoptosis in PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(4), 287-294.
17. Degterev, A., y Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 9, pp. 378-390.
18. Della, R. F., Cucciolla, V., Borriello A., Della, P. V., Manna, C., Galletti. P., y Zappia, V. (2000). Pyrrolidine Dithiocarbamate Induces Apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, pp. 942-946.
19. Faiman, M. D., Jensen, J. C., y Lacoursiere, R. B. (1984). Elimination kinetics of disulfiram in alcoholics after single and repeated doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 36(4), 520-526.
20. Fasehee, H., Dinarvand, R., Ghavamzadeh, A., Esfandyari-Manesh, M., Moradian, H., Faghihi, S., y Ghaffari, S. H. (2016). Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo investigations. *Journal of Nanobiotechnology*, 4, 32.
21. Fasehee, H., Zarrinrad, G., Tavangar, S. M., Ghaffari, S. H., y Faghihi, S. (2016). The inhibitory effect of disulfiram encapsulated PLGA NPs on tumor growth: Different administration routes. *Materials Science and Engineering: C*, 63, 587-595.
22. Gessner, T., y Jakubowski, M. (1972). Diethyldithiocarbamic acid methyl ester: A metabolite of disulfiram *Biochemical pharmacology*, 21(2), 219-230.
23. Glauser, T. A., Nelson, A. N., Zembower, D. E., Lipsky, J. J., y Weinshilboum, R. M. (1993). Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(1), 23-32.

24. Globocan.iarc.fr. (2016). *Redirect*. [online] Available at: <http://globocan.iarc.fr/> [Accessed 19 Oct. 2016].
25. Gogvadze, V., y Orrenius S. (2006). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact*. Vol.163, pp.4-14.
26. Gourley, M. y Williamson, J. (2006). Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Drugs Aging* 17:249-255.
27. Guo, X., Xu, B., Pandey, S., Goessl, E., Brown, J., Armesilla, A. L., 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.
28. Hald, J., y Jacobsen, E. (1948). The Formation of Acetaldehyde in the Organism after Ingestion of Antabuse (Tetraethylthiuramdisulphide) and Alcohol. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*, 4(3-4), 305-310.
29. Hart, B. W., y Faiman, M. D. (1992). In vitro and in vivo inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by S-methyl N, N-diethylthiolcarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochemical pharmacology*, 43(3), 403-406.
30. Hart, B. W., y Faiman, M. D. (1994). In Vivo Pharmacodynamic Studies of the Disulfiram Metabolite S-Methyl N, N-Diethylthiolcarbamate Sulfoxide: Inhibition of Liver Aldehyde Dehydrogenase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 18(2), 340-345.
31. Hart, B. W., Yourick, J. J., y Faiman, M. D. (1990). S-methyl-N, N-diethylthiolcarbamate: A disulfiram metabolite and potent rat liver mitochondrial low K_m aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Alcohol*, 7(2), 165-169.
32. Hernández, J.M.V. (2004). Determinación de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y la de su derivado 5''-hidroxi-7, 8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico-uterino HPV-18: CaLo, HeLa e InBI" Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México, D.F., 60 p.
33. Hoda, M., Pajaniradje, S., Shakya, G., Mohankumar, K., y Rajagopalan, R. (2016). Anti-proliferative and apoptosis-triggering potential of disulfiram and disulfiram-loaded polysorbate 80-stabilized PLGA nanoparticles on hepatocellular carcinoma Hep3B cell line. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), 1641-1650.

34. Hu, P., Jin, L., y Baillie, T. A. (1997). Studies on the Metabolic Activation of Disulfiram in Rat. Evidence for Electrophilic S-Oxygenated Metabolites as Inhibitors of Aldehyde Dehydrogenase and Precursors of Urinary N-Acetylcysteine Conjugates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(2), 611-617.
35. Ilijin, K., Ketola, K., Vainio, P., Halonen, P., Kohonen, P., Fey, V., y Kallioniemi, O. (2009). High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clinical Cancer Research*, 15(19), 6070-6078.
36. INEGI (2016). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 19 de octubre del 2016. Disponible en: HYPERLINK "<http://www.inegi.gob.mx>" www.inegi.gob.mx
37. Jakubowska-Mućka, A., Sieńko, J., Zapala, Ł., Wolny, R., y Lasek, W. (2012). Synergistic cytotoxic effect of sulindac and pyrrolidine dithiocarbamate against ovarian cancer cells. *Oncology reports*, 27(4), 1245-1250.
38. Jiao, Y., N Hannafon, B., y Ding, W. Q. (2016). Disulfiram's Anticancer Activity: Evidence and Mechanisms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(11), 1378-1384.
39. Jin, L., Davis, M. R., Hu, P., y Baillie, T. A. (1994). Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. *Chemical research in toxicology*, 7(4), 526-533.
40. Johansson, B., Petersen, E. N., y Arnold, E. (1989). Diethylthiocarbamic acid methyl ester: A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethyldithiocarbamic acid methyl ester. *Biochemical pharmacology*, 38(7), 1053-1059.
41. Karp, G. (2006). Señalización celular y transducción de señales: comunicación entre células. *Biología celular y molecular. 4ta edición. México: Ed. Mc Graw Hill.*
42. Klug, W. S., Cummings, M. R., y Spencer, C. A. (2006). Conceptos de genética. 8ª edición. Prentice Hall. Madrid.
43. Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Vasiliou, V. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520-539.

44. Kueng, W., Silber, E., y Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*, 182(1), 16-19.
45. Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., y Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer*, 128(4), 927-935.
46. Lill, J. S., Mays, D. C., y Lipsky, J. J. (1996). S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 26(10), 1025-1033.
47. Lim, S., y Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
48. Lin, J., Haffner, M. C., Zhang, Y., Lee, B. H., Brennen, W. N., Britton, J., & Yegnasubramanian, S. (2011). Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *The Prostate*, 71(4), 333-343.
49. Liu, G. Y., Frank, N., Bartsch, H., y Lin, J. K. (1998). Induction of apoptosis by thiuramdisulfides, the reactive metabolites of dithiocarbamates, through coordinative modulation of NFκB c-fos/c-jun, and p53 proteins. *Molecular carcinogenesis*, 22(4), 235-246.
50. Liu, P., Brown, S., Goktug, T., Channathodiyil, P., Kannappan, V., Hugnot, J. P., y Wang, W. (2012). Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British journal of cancer*, 107(9), 1488-1497.
51. Lizarbe, M.A. (2007). El Suicidio y la Muerte Celular. *Rev.R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* Vol 101, no. 2, pp.1-33.
52. Macarulla, M, Ramos F y Taberno J. (2009). Comprender el cáncer. AMAT. Barcelona.
53. Madan, A., Parkinson, A., y Faiman, M. D. (1993). Role of flavin-dependent monooxygenases and cytochrome P450 enzymes in the sulfoxidation of S-methyl N, N-diethylthiolcarbamate. *Biochemical pharmacology*, 46(12), 2291-2297.
54. Madan, A., Parkinson, A., y Faiman, M. D. (1995). Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N, N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. *Drug metabolism and disposition*, 23(10), 1153-1162.

-
55. Madan, A., y Faiman, M. D. (1994). Diethyldithiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 18(4), 1013-1017.
 56. Madan, A., y Faiman, M. D. (1994a) NADPH-dependent, regioselective S-oxidation of a thionosulfur- and thioether-containing xenobiotic, diethyldithiocarbamate methyl ester by rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 22(2), 324-330.
 57. Madan, A., y Faiman, M. D. (1994b). Diethyldithiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 18(4), 1013-1017.
 58. Mays, D. C., Nelson, A. N., Fauq, A. H., Shriver, Z. H., Veverka, K. A., Naylor, S., y Lipsky, J. J. (1995). S-Methyl N, N-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low K m mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemical pharmacology*, 49(5), 693-700.
 59. Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (2016).
 60. Monroy, A, Rangel. R., Rocha, Z., Trejo, B., Ramírez, G., Martínez, R. y Weiss-Steider, B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, Vol. 7, pp.69.
 61. Morgan, S., y Darling, D. (1993). Cultivo de las células animales. Editorial Acriba. España.
 62. Nagendra, S. N., Madan, A. y Faiman, M. D. (1994). S-Methyl N, N-diethylthiocarbamate sulfone, an in vitro and in vivo inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1465-1467.
 63. Oh, H. D., Bang, J. S., Choi, H. M., Yang, H. I., Yoo, M. C. y Kim, K. S. (2010). Fetal bovine serum requirement for pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptotic cell death of MCF-7 breast tumor cells. *Eur J Pharmacol.*; 649:135–139.
 64. OMS (2016). Estadísticas de mortalidad. Consultada el 16 de febrero de 2016. www.who.int/es.
 65. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B. y Bao, J. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), pp.487-498.
-

-
66. Papaioannou, M., Mylonas, I., Kast, R. E., y Brüning, A. (2014). Disulfiram/copper causes redox-related proteotoxicity and concomitant heat shock response in ovarian cancer cells that is augmented by auranofin-mediated thioredoxin inhibition. *Oncoscience*, 1(1), 21–29.
 67. Pardo, F. J. (1998). Anatomía, patología general y especial de las neoplasias. Editorial Científico-Médico. España.
 68. Penn, I. (1981). Depressed immunity and the development of cancer. *Clinical and experimental immunology*, 46(3), 459.
 69. Porter A y Urbano A. (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? *Bioessays* 28: pp. 834-843.
 70. Rezk, Y. A., Yang, K., Bai, S., Mclean, K., Johnston, C., Reynolds, R. K., y Buckanovich, R. J. (2015). Disulfiram's antineoplastic effects on ovarian cancer. *Journal of Cancer Therapy*, 6(14), 1196.
 71. Robinson, T., Pai, M., Liu, J., Vizeacoumar, F., Sun, T., Egan, S., y Zacksenhaus, E. (2013). High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: interaction with IQ motif-containing factors. *Cell Cycle*, 12(18), 3013-3024.
 72. Rojas, M., Salmen, S. y Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA*. Vol 4/Num 3/ 2009
 73. Ryan C. y G. Wilding. (2000). Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Drugs Aging*.17:249-255.
 74. Salazar, M. y P, C. (2010). Tratado de psicofarmacología: Bases y Aplicación Clínica, España: Médica Panamericana. pp. 315.
 75. Sauna, Z. E., Shukla, S., y Ambudkar, S. V. (2005). Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Molecular BioSystems*, 1(2), 127-134.
 76. Shine-Gwo, S., Yu-Rung Kao, Felicia Ying-Hsiueh Wu, y Cheng-Wen Wu (2003). Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol* 64: pp. 1076–1084.
 77. Strömme, J. H. (1963). Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. *Biochemical pharmacology*, 12(7), 705-715.
 78. Suh, J. J., Pettinati, H. M., Kampman, K. M., y O'brien, C. P. (2006). The status of disulfiram: a half of a century later. *Journal of clinical psychopharmacology*, 26(3), 290-302.
-

79. Suneet, S., Zuben E. Sauna, Rajendra Prasadb, y Suresh V. Ambudkara. (2004). Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322. pp. 520–525.
80. Valdespino-Gómez, M.V., Valdespino-Castillo, V.E. y Márquez-Holmberg, M. (2009). Alteraciones en los señalamientos intracelulares en el cáncer. *Cir Ciruj*;77:329-339
81. Wang, W., McLeod, H. L., y Cassidy, J. (2003). Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *International journal of cancer*, 104(4), 504-511.
82. Wickström, M., Danielsson, K., Rickardson, L., Gullbo, J., Nygren, P., Isaksson, A., Larsson, R. y Löuborg, H. (2007). Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochemical Pharmacology*, 71, pp. 25-33.
83. Wynne, J.H., Jensen, S. D., y Snow, A. W. (2003). One-Pot Synthesis of S-Alkyl Thiocarbamates. *J. Org. Chem*, Vol. 68, No. 9, pp. 3733-3735
84. Yakisich, J. S., Sidén, A., Eneroth, P. y Cruz M. (2001). Disulfiram is a potent in vitro Inhibitor of DNA topoisomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, pp. 586-590.
85. Yip, N. C., Fombon, I. S., Liu, P., Brown, S., Kannappan, V., Armesilla, A. L., y Wang, W. (2011). Disulfiram modulated ROS–MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *British journal of cancer*, 104(10), 1564.
86. Zaldívar-Machorro V J, López, O M, Demare P R, Regla I y Muñoz C R A. (2011). The disulfiram metabolites S-ethyl-N, N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate bateine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie* 93: pp. 286-295.
87. Zhang, L., Tian, B., Li, Y., Lei, T., Meng, J., Yang, L., y Zhang, Y. (2015). A copper-mediated disulfiram-loaded pH-triggered PEG-shedding TAT peptide-modified lipid nanocapsules for use in tumor therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 7(45), 25147-25161.