



VII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

16-18 junio 2016
Unidad de Seminarios, BUAP

"GENERACION DE NUEVAS TECNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"



Alteración de la Viabilidad Celular en Células HeLa Inducida por DAS

Martínez Vilchis Claudia Paulina¹, Campos Rodríguez Rafael¹, Escartin Gutiérrez Julio Rodrigo¹, Argüello García Raúl², Enríquez Rincón Fernando², Figueroa Arredondo Paula¹

¹ Escuela Superior de Medicina - ESM, del Instituto Politécnico Nacional – IPN.

figueroapaula@hotmail.com

²CINVESTAV Zacatenco.

1.RESUMEN

Dialil Sulfuro (DAS) es una molécula procedente del ajo, esta tiene actividad inhibitoria en células tumorales. El objetivo principal de este trabajo fue usar modelos *in vitro* con cultivos celulares procedentes de cáncer cervicouterino (células Hela), para retarlos con diferentes concentraciones y determinar el tipo de muerte celular.

Basados en los resultados de citometría de flujo, se proponen cuatro concentraciones de DAS evaluar el efecto que tienen estas en la viabilidad celular en comparación con el control negativo sin tratamiento. La concentración 100 mM presentó un 67% de la población celular en apoptosis total y un 20% de la población celular viable. Mientras que la concentración 1 mM presentó un 10% de la población celular en apoptosis total y un 89% de la población celular con apoptosis temprana. Estos resultados indican que la molécula de DAS induce efecto citotóxico sobre la línea celular Hela, presentando un efecto dosis respuesta.

Nuestra metodología es la siguiente. Para los ensayos de viabilidad, las células tratadas con diferentes concentraciones de DAS (37°C por 18h), se procesan mediante una doble tinción con los colorantes fluorescentes Diacetato de Fluoresceína (células vivas) y Ioduro de Propidio (células muertas) y se llevará a cabo su análisis por citometría de flujo.

Para la tesis de la alumna de Maestría en Ciencias de la Salud Claudia Paulina Martínez Vilchis se estudiaron posibles cambios en la viabilidad de los cultivos, se indujo la citotoxicidad con tratamientos *in vitro* con DAS sobre la línea celular HeLa. Se determinaron la viabilidad, muerte celular programada y necrótica.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, el cual se caracteriza por presentar una elevada proliferación celular, principalmente por la pérdida de control del ciclo celular. El cáncer cervicouterino a nivel mundial presenta una elevada incidencia y mortalidad, sin embargo; en México ocupa el tercer lugar de incidencia y mortalidad.

Un estudio integral de la molécula Dialil Sulfuro (DAS) derivada del ajo, tiene como finalidad caracterizar la capacidad de ésta para inducir citotoxicidad sobre células tumorales, con la finalidad, a largo plazo de fundamentar científicamente el uso de esta molécula como parte de un tratamiento antitumoral.

Estudios en modelos murinos (ratón) encontraron recientemente que el Dialil Sulfuro (DAS), una molécula organosulfurada, presentó actividad inhibitoria del crecimiento tumoral.



3. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue usar modelos *in vitro* con cultivos celulares procedentes de cáncer cervicouterino (células Hela), para retarlos con diferentes concentraciones de Dialil Sulfuro (DAS) y determinar el tipo de muerte celular.

4. TEORÍA

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para la determinación de la viabilidad celular, se retaron a las células HeLa (derivadas de cáncer cervicouterino) y células Vero (células inmortalizadas derivadas de riñón de mono verde) con diferentes concentraciones de DAS: 1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM; Las cuales se incubaron over night a 37 °C al 5% de CO₂. Como control positivo se utilizaron 50 mg/ml Ifosfamida, como control negativo se utilizaron células sin tratamiento.

El Diacetato de Fluoresceína (DAF) es un fluorocromo que tiñe solamente células metabólicamente activas (viables). El Ioduro de Propidio (IP), es un fluorocromo impermeable que solo atraviesa la membrana celular cuando esta presenta fisuras, al entrar en la célula interacciona con los ácidos nucleicos (no viables).

ENSAYO DE APOPTOSIS

Para este ensayo se retaron nuevamente las células HeLa y Vero con diferentes concentraciones de DAS (1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM), las células taradas se incubaron over night a 37 °C al 5% de CO₂. Como control positivo se utilizaron 50 mg/ml Ifosfamida, como control negativo se utilizaron células sin tratamiento.

Para la evaluación de la apoptosis, se empleó una doble tinción con los fluorocromos: Anexina V FITC y IP. El objetivo de realizar esta técnica fue el uso de colorantes fluorescentes, esto se realizó por medio de citometría de flujo

Al inicio de la apoptosis, ocurren determinados cambios en la célula, entre ellos, sucede la translocación de Fosfatidilserina en la membrana. Cuando la célula ha iniciado el proceso de apoptosis sufre una translocación que hace que pase de la cara interna de la membrana a exponerse en la cara externa; Anexina V FITC es una proteína que tiene gran afinidad a este fosfolípido.

La tinción con Anexina V FITC se hace en conjunto con un colorante vital como el Ioduro de Propidio, el cual, ya se sabe, que es excluido por células viables que no presentan daños en la membrana, en tanto que las células dañadas permiten el paso del colorante.

Al realizarse la tinción utilizando ambos compuestos, entonces es posible determinar si las células son viables o se encuentran en apoptosis.

- ❖ Las células viables dan como resultado negativo a ambos fluorocromos.
- ❖ Las células que se encuentran en apoptosis temprana solo han logrado translocar el fosfolípido Fosfatidilserina siendo positivas a Anexina V FITC.
- ❖ Las células que se encuentran en apoptosis tardía o que ya han muerto son positivas a ambos colorantes.
- ❖ Las células necróticas solo son positivas a IP.



3. PARTE EXPERIMENTAL

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD

La determinación de la viabilidad se realizó mediante citometría de flujo de doble canal en ambas líneas celulares, de la cual se obtuvieron los porcentajes de dos poblaciones, las células viables y las no viables.

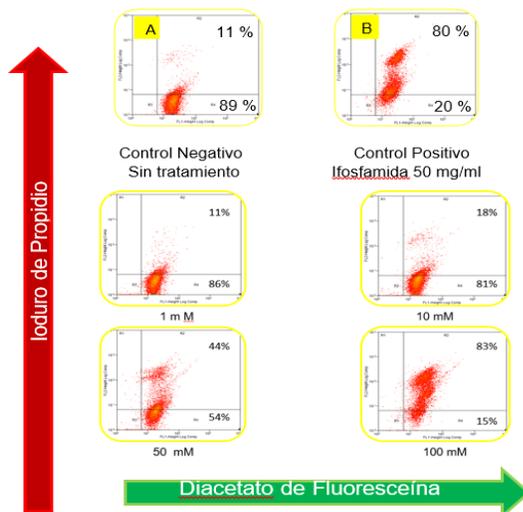


Figura 1.- Ensayo de Viabilidad de células HeLa utilizando DAS como tratamiento

En el ensayo descrito en la figura 1 se observar el efecto que presente DAS al ser utilizado como tratamiento en las células HeLa. En el control negativo obtuvimos un 89% de células viables, mientras tanto en el control positivo con ifosfamida un 80% de células no viables; al hacer una comparación entre los controles con las concentraciones de trabajo observamos que la concentración 1 mM presento un comportamiento similar al del control negativo, presentando un 86% de células viables, siendo este el porcentaje más alto de células viables en este ensayo. Este porcentaje de células viables disminuyo a medida que se aumentó la concentración de DAS, presentando un 54% y un 15% en las concentraciones de 50 mM y 100 mM respectivamente, lo cual sugiere que el efecto es dosis respuesta al utilizar DAS como tratamiento en las células HeLa.

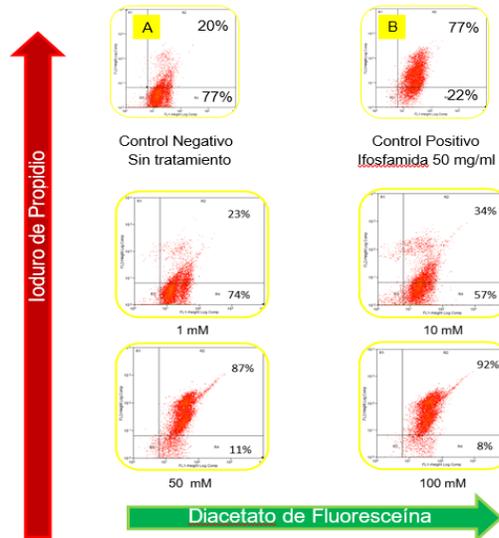


Figura 2.- Ensayo de Viabilidad de células Vero utilizando DAS como tratamiento

En el ensayo descrito en la figura 2 se observan los ensayos de viabilidad al ser utilizado DAS como tratamiento en las células Vero. En el control negativo obtuvimos un 77% de células viables, mientras tanto en el control positivo con ifosfamida un 22% de células viables; al hacer una comparación entre los controles con las concentraciones de trabajo observamos que la concentración 1 mM presentó un comportamiento similar al del control negativo, presentó un 74% de células viables, siendo este el porcentaje más alto de células viables en este ensayo. Este porcentaje de células viables disminuyó a medida que se aumentó la concentración de DAS, presentando un 11% y un 8% en las concentraciones de 50 mM y 100 mM respectivamente, lo cual sugiere, al igual que en las células HeLa, un efecto dosis respuesta al utilizar DAS como tratamiento en las células Vero.

ENSAYO DE APOPTOSIS

La determinación de la viabilidad se realizó mediante citometría de flujo de doble canal en ambas líneas celulares, de la cual se obtuvieron los porcentajes de cuatro poblaciones: las células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas.

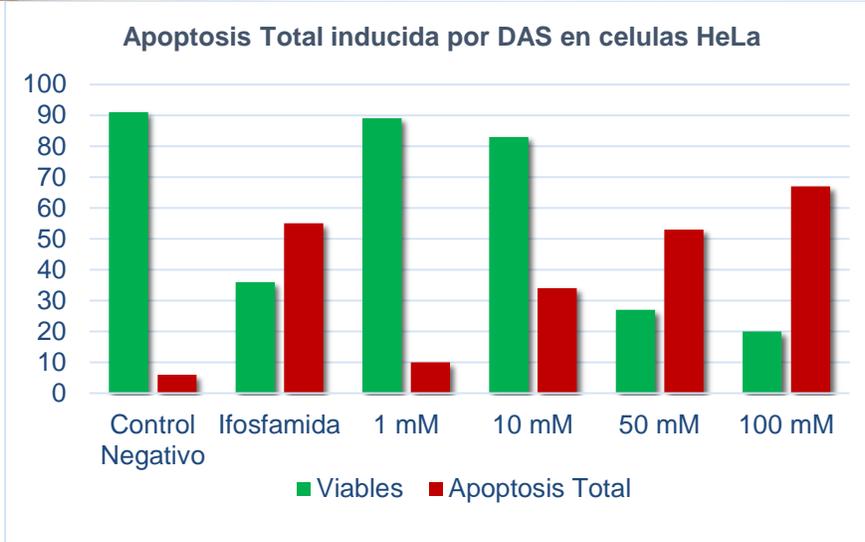


Figura 3.- Apoptosis en células HeLa tratadas con DAS

En la figura 3 observamos la gráfica de apoptosis total inducida por DAS en células HeLa, en donde fue evidente el decremento de las células viables y de forma simultanea observamos el incremento de las células no viables, lo cual nos permito ver de forma más evidente el efecto dosis respuesta de DAS, así mismo corroborar que DAS es un buen inductor de apoptosis en las células HeLa. En la concentración de 50 mM observamos un 71% de apoptosis total del cual, el 42% fue de células en apoptosis temprana y un 29 % de células en apoptosis tardía; mientras tanto en la concentración de 100 mM obtuvimos un 76 % de apoptosis total de cual, el 13% fue de células en apoptosis temprana y un 65% de células en apoptosis tardía, en este ensayo ambas concentraciones fueron buenas inductoras de apoptosis

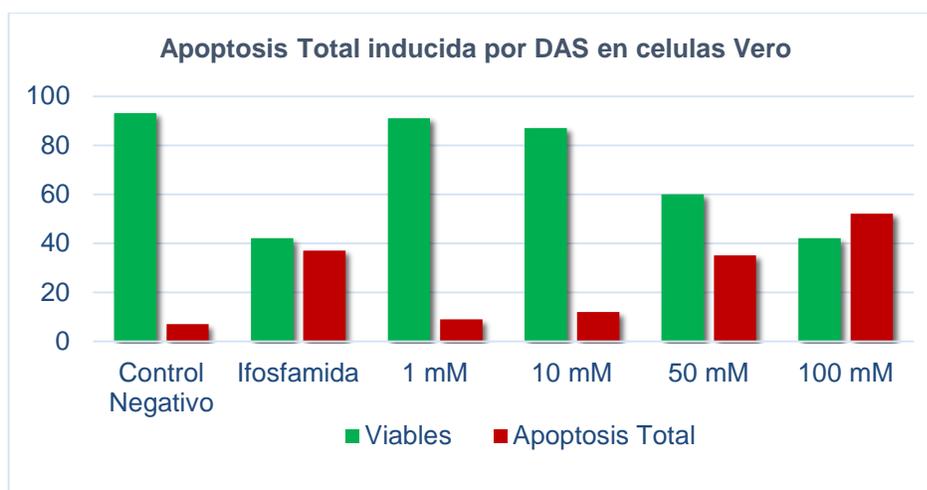


Figura 4.- Apoptosis en células Vero tratadas con DAS



En la figura 4 observamos la gráfica de apoptosis total inducida por DAS en células Vero, en donde fue evidente el decremento de las células viables y de forma simultanea observamos el incremento de las células no viables, lo cual nos permito ver de forma más evidente el efecto dosis respuesta de DAS. En la concentración de 50 mM observamos un 31% de apoptosis total del cual, el 17% fue de células en apoptosis temprana y un 14% de células en apoptosis tardía; mientras tanto en la de 100 mM obtuvimos un 43% de apoptosis total del cual, el 20% fue de células apoptosis temprana y un 23% fue de células en apoptosis tardía, en este ensayo ambas concentraciones fueron buenas inductoras de apoptosis.

4. CONCLUSIONES

Al utilizar DAS como tratamiento antitumoral *in vitro* sobre ambas líneas celulares, se observó que DAS induce pérdida en la viabilidad, con un efecto dosis dependiente sobre ambas líneas celulares.

Utilizando DAS como tratamiento sobre las células Hela para revelar el tipo de muerte celular (Anexina V), se observó que DAS induce casi exclusivamente apoptosis y el efecto es dosis dependiente, es decir, a mayor concentración de DAS aumentan las células en apoptosis total. Mejor aún a concentraciones altas la apoptosis tardía (células necróticas que transitaron por apoptosis) es predominante y por el contrario, a concentraciones bajas de DAS predomina la apoptosis temprana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hu Y, Chen L, Yi C, Yang F, Chen J. Experimental study on inhibitory of diallyl sulfide on growth and invasion of human osteosarcoma MG-63 cells. *Journal of Huazhong University Science and Tecnology*. 2012; 581-5.
2. Tsan-Hung Chiu a, Kai-Ying Lan b. Diallyl sulfide Promotes Cell-Cycle Arrest Through the p53 Expression and Triggers Induction of Apoptosis Via Caspase- and Mitochondria-Dependent Signaling Pathways in Human Cervical Cancer Ca Ski Cells. *Nutrition and Cancer*. Mar 2013; 505–514.