



# 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 DPS

Martínez Vilchis Claudia Paulina<sup>1</sup>, Campos Rodríguez Rafael<sup>1</sup>, Escartin Gutiérrez Julio Rodrigo<sup>1</sup>, Argüello García Raúl<sup>2</sup>, Enríquez Rincón Fernando<sup>2</sup>, Figueroa Arredondo Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior de Medicina - ESM, del Instituto Politécnico Nacional – IPN.

[figueroapaula@hotmail.com](mailto:figueroapaula@hotmail.com)

<sup>2</sup>CINVESTAV Zacatenco.

### 1. RESUMEN

Dipropil Sulfuro (DPS) es una molécula procedente de la cebolla, de la cual no se ha reportado actividad inhibitoria en células tumorales. El objetivo principal de este trabajo es 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 DPS, evaluar el efecto que tienen estas en la viabilidad celular en comparación con el control negativo sin tratamiento. La concentración 100 mM presentó un 79% de la población celular en apoptosis total y un 11% de la población celular viable. Mientras que la concentración 1 mM presentó un 3% de la población celular en apoptosis total y un 95% de la población celular viable. Estos resultados indican que la molécula de DPS induce efecto citotóxico sobre la línea celular Hela, pero aun no podemos confirmar que presenta un efecto dosis respuesta.

Nuestra metodología es la siguiente. Para los ensayos de viabilidad, las células tratadas con diferentes concentraciones de DPS (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 DPS sobre la línea celular HeLa. Se determinó 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 cervico uterino 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 Dipropil Sulfuro (DPS) derivada de la cebolla, 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.

Dipropil Sulfuro (DPS), es una molécula organosulfurada, la cual se encuentra poco reportada en la bibliografía lo que hace que no se conozcan sus efectos.

### 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 Dipropil Sulfuro (DPS) 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 DPS: 1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM; Las cuales se incubaron over night a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>. 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 DPS (1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM), las células taradas se incubaron over night a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>. 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.

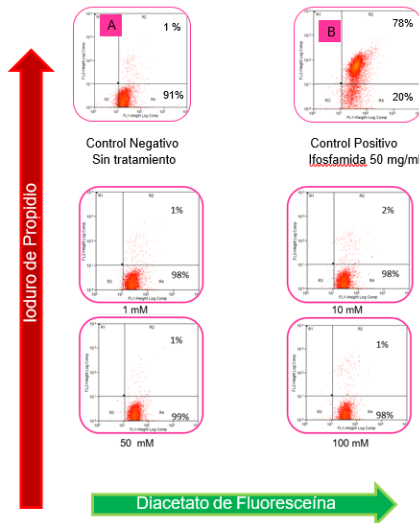


Figura 1.- Ensayo de Viabilidad de células HeLa utilizando DPS como tratamiento

En el ensayo descrito en la figura 1 se observar el efecto que presento DPS al ser utilizado como tratamiento en las células HeLa. En el control negativo obtuvimos un 91% de células viables, mientras tanto en el control positivo con ifosfamida un 78% de células no viables; al comparar los controles con los porcentajes de los tratamientos observamos que no se induce muerte en las células, ya que los porcentajes de los tratamientos son homogéneos con los porcentajes del control negativo.

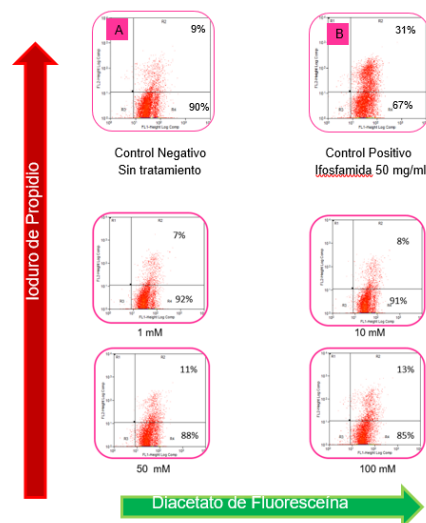


Figura 2.- Ensayo de Viabilidad de células Vero utilizando DAS como tratamiento

En el ensayo descrito en la figura 2 se observar los ensayos de viabilidad al ser utilizado DPS como tratamiento en las células Vero obtuvimos que en las concentraciones 1 mM y 10 mM presentaron un comportamiento similar al del control negativo, mientras que las concentraciones



50 mM y 100 mM presentaron los porcentajes de 11% y 13% de células no viables respectivamente, sin embargo; estos porcentajes continúan siendo bajos para poder afirmar el efecto citotóxico de las moléculas.

### 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.

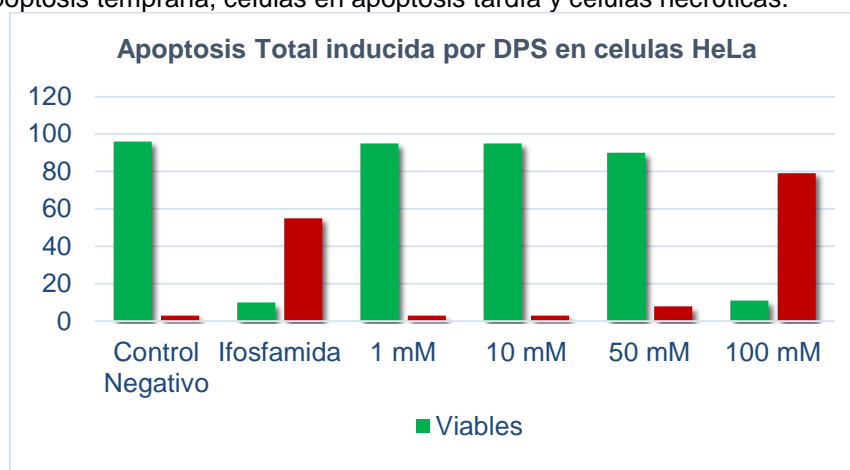


Figura 3.- Apoptosis en células HeLa tratadas con DPS

En la figura 3 observamos la gráfica de apoptosis total inducida por DPS en células HeLa, en donde solo fue evidente el decremento de las células viables y un incremento de las células no viables en la concentración 100 mM, mientras que en las concentraciones restantes el porcentaje de células viables fue mayor al 90%.

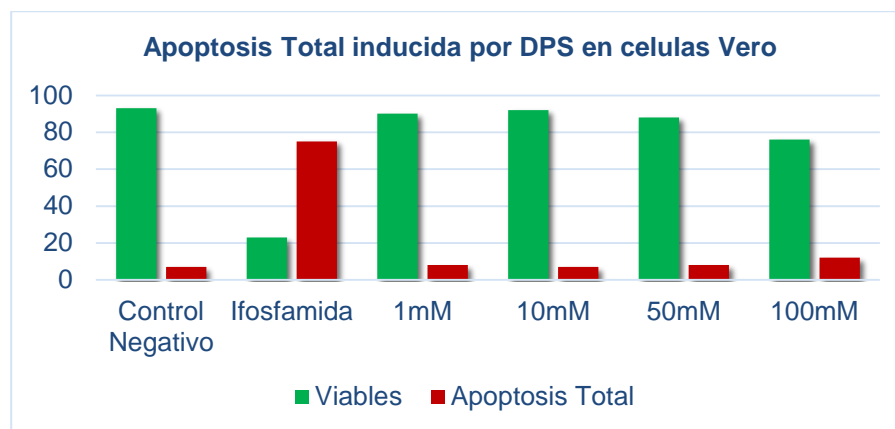


Figura 4.- Apoptosis en células Vero tratadas con DPS

En la figura 4 observamos la gráfica de apoptosis total inducida por DPS en células Vero, en donde los porcentajes de células viables fueron mayores al 70% en todas las concentraciones, si bien, la



CONACYT    CCADET    CIO    PUEBLA    INNS

# 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"

UASLP    UANL    CENIT    JOSLYN    Surge Suppression

concentración 100 Mm presento un el valor más alto de células no viables en este ensayo (12%) no podemos decir que esta fue una buena inductora de apoptosis en las células Vero.

#### 4. CONCLUSIONES

Los ensayos de viabilidad utilizando DPS como tratamiento en ambas líneas celulares, observamos que en las células HeLa la concentración más alta (100 mM) este presenta un efecto citotóxico leve (7%) en comparación con el que presentan las Vero (13%). Sin embargo, interesantemente, en los tratamientos con DPS, las células Vero presentan una mayor sensibilidad al compuesto, es decir la viabilidad de las Vero usando DPS es menor en comparación con la que presenta el tratamiento con DPS sobre las células HeLa. Esta observación apoya la hipótesis de que la sensibilidad de las células tumorales a estos organosulfurados es diferente a la presentada por las células no tumorales.

En cuanto a la estimación de muerte celular utilizando DPS como tratamiento sobre las células HeLa (ensayos de Anexina V) se observó que a la concentración más alta (100 mM), se presenta muerte de tipo apoptosis (79%), disminuyendo el efecto (8%) en la siguiente concentración (50 mM). Por el contrario, en el ensayo usando células Vero, ninguna de las concentraciones utilizadas causó apoptosis ni muerte celular de ningún tipo.

DPS no demostró ser un inductor de muerte satisfactorio.

#### 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.