



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Estudio de los Mecanismos Moleculares Involucrados en la Diferenciación de Células de Rabdomiosarcoma”

PRESENTADA POR:
Jessica Roxana Montiel
BAJO LA DIRECCIÓN DE:
Dra. Andrea Vasconsuelo

Bahía Blanca, Mayo 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Estudio de los Mecanismos Moleculares Involucrados en la Diferenciación de Células de Rabdomiosarcoma”

Firma del Alumno/a

Firma del Director/a

ÍNDICE.....	3
ABREVIATURAS	5
AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS	11
Objetivos generales	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Modelo experimental	11
Tratamientos celulares.....	12
Marcación de organelas e inmunocitoquímica	15
Microscopía de fluorescencia convencional y de campo claro.....	16
Análisis de la expresión génica	17
RESULTADOS	22
Análisis morfológico por microscopía y descripción diferencial de las células RD y C2C12	22
<i>Células C2C12</i>	26

<i>Células RD</i>	28
DISCUSIÓN	43
FORMACIÓN ADQUIRIDA DURANTE ESTE TRABAJO DE TESIS	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ABREVIATURAS

AC *Adenilil Ciclasa*

AMPC *Adenosín monofosfato cíclico*

IP3 *Inositol trifosfato*

ATP *Adenosín trifosfato*

DAG *Diacilglicerol*

DAPI *4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato.*

DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium*

MAPKs *Quinasa de proteínas activadas por mitógenos*

MHCI *Cadena pesada de miosina I*

MTT *Mitotracker Red*

MYOD *Proteína 1 de diferenciación miogénica*

PIP, *Fosfatidilinositol monofosfato*

PIP2, *Fosfatidilinositol bifosfato*

PKA *Proteína quinasa A*

PKC *Proteína quinasa C*

PLC *Fosfolipasa C.*

PLC, *Proteína Lipasa C*

PMA *Phorbol 12-myristate-13-acetate*

PMA, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PP1 *Proteínas fosfatasas 1.*

PP2A *Proteínas fosfatasas 2A.*

RMS *Rabdomiosarcoma*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Doctora Andrea Vasconsuelo, por apreciar todo el potencial en mí y enseñarme a verlo. Especialmente por su empatía, por instruirme, comprometerse, guiarme y disfrutar junto a mí de este trayecto.

A la Universidad Nacional del Sur, al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) por mi formación académica.

A la Doctora Lorena Milanesi y a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología del Desarrollo y Química Biológica por su compañerismo, por los ánimos que me dan y por la ayuda de cada uno para esta tesis de grado.

A mis profesores. Principalmente a mi profesora consejera, la Doctora Ana Julia Nebbia por su apoyo y escucha.

A mis padres. Mi refugio, motivación e inspiración. Nada de lo alcanzado en toda mi vida, hubiera sido posible sin el amor inconmensurable y la confianza de ellos. Son el motor de lo que soy académicamente, pero sobre todo como persona.

A mi familia, compañeros y amigos, que siempre creyeron en mí incluso en los momentos donde yo no encontraba la forma y me esperaron con un abrazo para celebrar cada uno de mis avances.

Finalmente, a mí, por salir adelante y no rendirme. Lo hice por mí, pero también por ustedes. Gracias.

“Tomarse en serio las cosas que uno hace, dedicarse en cuerpo y alma a lograr el objetivo que uno se ha impuesto y convencerse de que lo importante es ponerse metas pequeñas, un día a la vez, y así terminar lo que uno empieza”

El cáncer representa un problema de salud pública mundial. La investigación científica ha sido de crucial importancia para aportar conocimiento y herramientas que permiten detectar precozmente la aparición de tumores, para disminuir la mortalidad y para el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo, las terapias de uso habitual poseen efectos colaterales no deseados; debido principalmente a que afectan también a las normales.

La reversión de células cancerosas puede ser un nuevo enfoque para el desarrollo de terapias menos agresivas. Básicamente, la reversión de las células tumorales implica la regeneración de los mecanismos estándar de control del crecimiento, que desaparecieron en las células malignas. Es un proceso biológico que implica la reprogramación de las células tumorales de forma que logren la conversión del fenotipo tumoral en normal. Las observaciones de reversión son escasas y los mecanismos moleculares de estos procesos no están totalmente esclarecidos.

En este trabajo de Tesis se utilizó la línea celular de rhabdomyosarcoma, un tumor maligno agresivo generado a partir de células mesenquimales precursoras de la miogénesis de músculo estriado. Se origina por una disrupción en la regulación del crecimiento y diferenciación, de las células precursoras de la miogénesis que impide que éstas alcancen el fenotipo diferenciado.

Mediante el uso de moduladores específicos de las vías AC/AMPc/PKA y PLC/DAG/PKC, y con análisis morfológicos, en una primera instancia, se identificó a la vía PLC/DAG/PKC como parte del mecanismo molecular responsable del mantenimiento del fenotipo desdiferenciado de las células tumorales RD. En una segunda etapa, mediante estudios de la expresión génica de los marcadores de diferenciación MyoD y MHCI, se obtuvieron resultados que confirman que la inhibición de dicha vía induce diferenciación.

Se requieren más ensayos para confirmar que la vía AC/AMPc/PKA no participa en el proceso de diferenciación de las células RD, y para extender estos estudios a otros sistemas mensajeros que podrían ser parte del mecanismo molecular responsable del fenotipo tumoral. Dicho conocimiento es clave para el desarrollo de terapias que involucren la reversión tumoral.

El término “cáncer” refiere a un complejo grupo de enfermedades que pueden originarse en cualquier parte del organismo. Esta patología que representa un problema de salud pública mundial, se define como un crecimiento anormal de células que tienden a proliferar descontroladamente y, en algunos casos, a metastatizar (*National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (online)*, s.f.). Si bien, el aporte de la biología molecular y celular al estudio del proceso de la carcinogénesis ha sido de crucial importancia para detectar precozmente la aparición de tumores, para disminuir la mortalidad y para el desarrollo de nuevas terapias, actualmente en clínica se usan tratamientos que generalmente no son cáncer-específicos; provocando efectos secundarios no deseados (Carneiro y El-Deiry, 2020). Por ello, es de importancia impulsar investigaciones cuyo objetivo sea el desarrollo de terapias específicas, orientadas a inhibir el crecimiento tumoral sin afectar los tejidos sanos.

Numerosos estudios aportan información que ayuda a comprender los mecanismos moleculares que participan en el proceso de transformación de las células normales a malignas. Han sido involucrados los oncogenes, los genes supresores de tumores, el proceso de reparación del ADN, el microambiente, la neoangiogénesis, el metabolismo, la inestabilidad cromosómica, el sistema inmunológico y, sobre todo, se han caracterizado miles de mutaciones en el genoma. Siendo éstos solo algunos ejemplos donde la falta de regulación conduce a la transformación maligna de las células normales (Hanahan y Weinberg, 2011).

El conocimiento actual sobre la problemática del cáncer indica que la célula cancerosa para establecer un tumor y diseminarse requiere de la obtención de al menos ocho atributos o capacidades adquiridas: 1) activación y mantenimiento de señales proliferativas, 2) evasión de señales supresoras del crecimiento, 3) resistencia a la muerte celular por apoptosis, 4) activación y mantenimiento de una proliferación indefinida (inmortalidad replicativa), 5) inducción de la angiogénesis, 6) activación de mecanismos de invasión y metástasis (señalización aberrante de la vía Wnt- β -catenina; con bajos niveles de cadherina E y localización nuclear de β -catenina), 7) reprogramación del metabolismo energético, para soportar la continua proliferación celular y 8) evasión al sistema inmune. Además, dichas capacidades adquiridas son facilitadas por: (1) la inflamación que aporta moléculas bioactivas al microambiente tumoral y (2) la gran inestabilidad genética fuente creadora de las variantes genéticas (Weinberg y Hanahan, 2000; 2011). Todo este conocimiento es el disparador para el estudio de la reversión del cáncer. Si bien el proceso de reversión tumoral se describió por primera vez en el siglo XX durante el estudio de los teratomas de ovario, las observaciones de reversión son escasas (Telerman y Amson, 2009) y los mecanismos moleculares de estos procesos no están totalmente esclarecidos (Askanazy, 1907). Básicamente, la reversión de las células tumorales implica la regeneración de los mecanismos estándar de control del crecimiento, que desaparecieron en las células malignas. Es un proceso

biológico que implica la reprogramación de las células tumorales de forma que logren la conversión del fenotipo tumoral en normal (Kenny y Bissell, 2003).

El rabdomiosarcoma (RMS) es un tumor maligno agresivo generado a partir de células mesenquimales precursoras de la miogénesis de músculo estriado y, por lo tanto, puede aparecer en cualquier parte del cuerpo. Se origina por una disrupción en la regulación del crecimiento y diferenciación, de las células precursoras de la miogénesis que impide que éstas alcancen el fenotipo diferenciado. El RMS es el tumor maligno de los tejidos blandos más frecuente en niños y adolescentes (Young y col., 1986). Los sitios primarios más comunes de aparición del RMS son la cabeza, el cuello, las vías genitourinarias y las extremidades; aunque hay otras áreas, tales como la región troncal que son menos frecuentes. Además, cabe destacar que el RMS puede diseminarse de forma local (vecindad inmediata al lugar de origen), regional (migración a ganglios que drenan el lugar de origen) o a distancia (por transporte mediante la corriente sanguínea), siendo en este último caso, los pulmones, los huesos y la médula ósea los sitios de diseminación típicos. El pronóstico para pacientes que presentan metástasis es malo, ya que en estos casos el RMS es resistente a los protocolos habituales de tratamiento y tienen una baja oportunidad de curación (Masià Fontana, 2013).

El término metástasis refiere a la transferencia de células tumorales desde un órgano afectado hacia otro no contiguo. Este proceso inicia con la disrupción de la interacción entre células, se alteran las membranas y hay invasión e infiltración a los tejidos vecinos, alcanzando y penetrando a los vasos de la circulación, con el consecuente transporte de células tumorales al torrente sanguíneo y posterior llegada a otros tejidos y formación de tumores secundarios (Mayoral-Chávez. 2004).

En el proceso de metástasis, la interacción célula-célula juega un rol fundamental. La unión celular implica la participación de un mecanismo complejo, en el que participan numerosos componentes moleculares como las superfamilias de glucoproteínas transmembranales: las Cadherinas y las Integrinas. Defectos en los niveles de expresión o función de éstas proteínas han sido asociados con la diseminación de células tumorales (revisado en Beavon, 2000; Desgrosellier and Cheresch, 2010).

Las células de RMS expresan altos niveles de Cadherina N e Integrina $\alpha 9$, reguladas positivamente por la vía *Notch*, favoreciendo así la movilidad, invasión, agresión y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células tumorales (Masià Fontana, 2013).

La línea celular embrionaria RD de RMS, es una herramienta útil para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes al fenotipo maligno de dichas células.

El grupo en el cual se llevó a cabo esta Tesis de grado, lleva más de 15 años estudiando la apoptosis en músculo esquelético. La relación de dicho proceso con el envejecimiento y la sarcopenia, así como también, su posible regulación hormonal y los mecanismos moleculares subyacentes. En dichas investigaciones se han utilizado las líneas celulares RD de RMS y C2C12. Esta última es una línea celular no tumoral de mioblastos murinos derivadas de células satélites que se comportan como el

linaje progenitor (subclon de los mioblastos C2). A partir de ella y validando resultados con cultivos primarios de músculo esquelético de ratón neonato, se ha determinado parte del mecanismo molecular que promueve la apoptosis en el músculo esquelético frente a distintos estímulos. Además, se ha demostrado también la presencia de receptores de hormonas sexuales en dichas células (Milanesi y col., 2008; 2009) y se evidenció que la muerte celular programada era regulada por hormonas esteroideas en las células musculares (Vasconsuelo y col., 2008; Boland y col., 2008; Pronsato y col., 2012; 2013a; 2013b; 2017;2019; La Colla y col., 2014; 2015a; 2015b; 2015; 2017; Pronsato y Milanesi, 2016). De interés para esta Tesis, el grupo de trabajo, ha conseguido inducir la diferenciación de mioblastos murinos utilizando 1% de suero de caballo (Gili y col., 2016).

Resultados preliminares utilizando células RD cultivadas con medio suplementado con 1% de suero equino o bovino, sugieren que es posible la reversión de su morfología tumoral a una morfología de músculo normal (Figura 1).

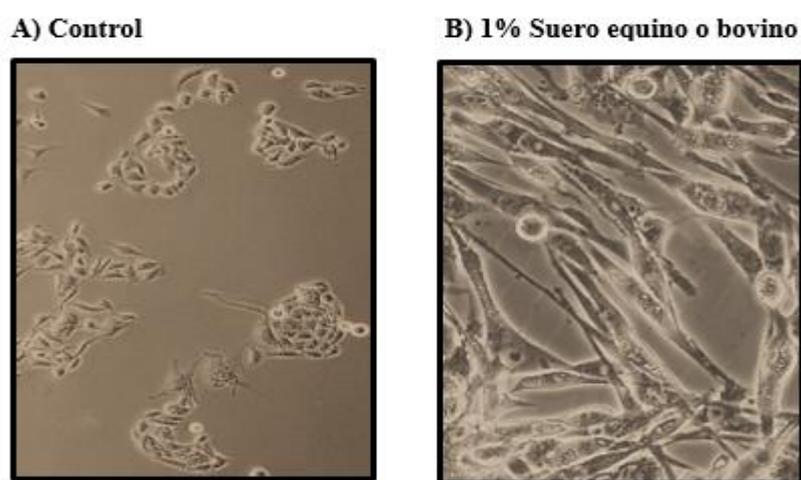


Figura 1. Reversión de la morfología tumoral

A) Células RD cultivadas en medio de crecimiento (DMEM con 10% de suero bovino o equino) (control) y B) Células RD cultivadas en medio de diferenciación (DMEM con 1% de suero equino o bovino), durante 5 días. Magnificación 20X.

Como se puede observar en el control, las células RD se caracterizan por ser redondeadas y formar agrupaciones circulares que dan lugar a pequeños tumores. Al ser tratadas con 1% de suero equino o bovino adoptan una forma de fibra, estirada y multinucleada con núcleos alineados.

Si bien existen estudios de las vías de señalización involucradas en procesos de diferenciación de RMS (Mauro, 2002; Roma y col., 2011; Sun y col., 2015) no se conoce en su totalidad el mecanismo molecular responsable. Profundizar estos estudios aportará información de posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de estrategias de curación más específicas que involucren la diferenciación del fenotipo maligno a uno menos agresivo.

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta el marco teórico expuesto, en el presente trabajo se estableció la siguiente hipótesis: el uso de moduladores específicos de determinadas vías de señalización que inducen la diferenciación de las células tumorales permiten identificar a dichas vías como posibles blancos para revertir las propiedades malignas de las células tumorales.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Revertir el fenotipo indiferenciado de células cancerosas, induciendo la diferenciación celular.
- Identificar y caracterizar las vías de señalización involucradas en el proceso de diferenciación.

Objetivos específicos

- Inducir la diferenciación de la línea celular RD a músculo esquelético.
- Investigar si el proceso de diferenciación inducido en las células RD es mediado por las vías de señalización Adenilil Ciclasa/ AMP cíclico/ Protein Quinasa A (AC/cAMP/PKA) y Fosfolipasa C/ Inositol Trifosfato + Diacilglicerol/ Protein Quinasa C (PLC/IP3 + DAG/ PKC).

MATERIALES Y MÉTODOS

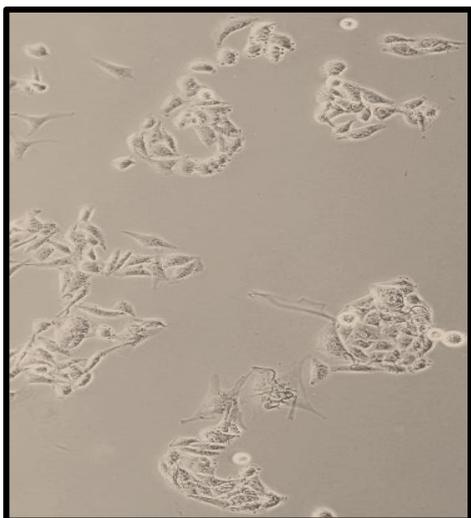
Modelo experimental

Líneas celulares RD y C2C12

Las células RD, obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC® número: CCL-136™), son multinucleadas y grandes. Corresponden a la línea celular de rabdomiosarcoma embrionario primario derivadas del linaje muscular, hiperploides, susceptibles a virus, de una niña de siete años (Figura 2A).

Las células C2C12 (ATCC® número: CRL-1772™) corresponden a la línea celular de mioblastos murinos derivadas de células satélites que se comportan como el linaje progenitor (son un subclon de los mioblastos C2) (Figura 2B).

A) Línea celular RD



B) Línea celular C2C12



Figura 2. Cultivos celulares

Microfotografías de cultivos celulares de (A) células RD y (B) células C2C12. Magnificación 20X.

Cultivos de células RD y C2C12

Las células RD y C2C12 fueron cultivadas bajo las mismas condiciones en medio de cultivo DMEM de crecimiento (medio Eagle modificado por Dulbecco), sin rojo fenol, suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (30', 56 °C), 2 % de estreptomicina y penicilina. Las células crecen a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 94,5 % aire / 5,5 % CO₂. Los cultivos se mantienen en medio fresco, repicándolos cuando superan el 70% de confluencia o, se suplementa con medio fresco cada 48 a 72hs. Para inducir la diferenciación de ambas líneas celulares, cuando alcanzan el 70% de confluencia se reemplaza el medio de DMEM de crecimiento por medio de diferenciación (DMEM con 1% de suero bovino o equino), durante 4-5 días.

Tratamientos celulares

Para investigar la participación, de las distintas vías de señalización, en el proceso de diferenciación celular se incubarán los cultivos de células con compuestos que selectivamente activan o inhiben dichos sistemas transductores. Alternativamente se tratarán las células con activadores e inhibidores específicos de cada vía, así se evaluará si los distintos compuestos son capaces de inducir diferenciación; y, si los correspondientes inhibidores de la vía que se estimuló son capaces de bloquear el efecto. La verificación de este doble criterio (activación y supresión de la diferenciación celular con activadores e inhibidores, respectivamente de una misma vía) constituirá un indicador de la participación

de un mecanismo de transducción de señales determinado. En este enfoque experimental se evaluarán los efectos de los diferentes moduladores en la morfología celular, observando la aparición de características de fibras musculares diferenciadas (células multinucleadas, alargadas y con tendencia a fusionarse y alinearse entre ellas; mostrando un patrón de crecimiento direccionado lineal, no circular) y disminución/desaparición del número de tumores en cultivos de las células RD (Tabla 1; Figura 3 y Figura 4). Previamente se realizarán curvas dosis/tiempo respuesta de cada compuesto o se seleccionará, basado en la bibliografía existente, un rango de dosis efectivo en nuestro sistema experimental (Tabla 2).

Vía de señalización / Blanco específico	Activador	Inhibidor
AC/cAMP/PKA	Forskolina: Activador de AC.	Rp-cAMPS: (análogo de AMPc) Antagonista de PKA.
PLC/DAG/PKC	PMA: (análogo de DAG) Activador de PKC.	Neomicina: Inhibidor de PLC. Bisindolmaleimida: Inhibidor de PKC. Estauroporina: Inhibidor de PKC.
Fosfatasa (PP1 y PP2A)	-----	Caliculina A: Inhibidor de PP1 y PP2A.
Reservorios de Calcio	-----	Tapsigargina: inhibidor de la Ca ²⁺ ATPasa del retículo sarcoendoplásmico.
Canales regulados por ATP	ATP	

Tabla 1. Moduladores seleccionados para analizar vías mensajeras

Modulador	Concentración Utilizada
Forskolina	20 µM
PMA	100 µM
ATP	15 µM
Rp-cAMPS	1 mM
Neomicina	3 mM
Bisindolmaleimida	30 µM
Estauroporina	1 nM
Caliculina A	1 mM
Tapsigargina	5 µM

Tabla 2. Concentraciones de uso de los moduladores seleccionados para analizar vías mensajeras

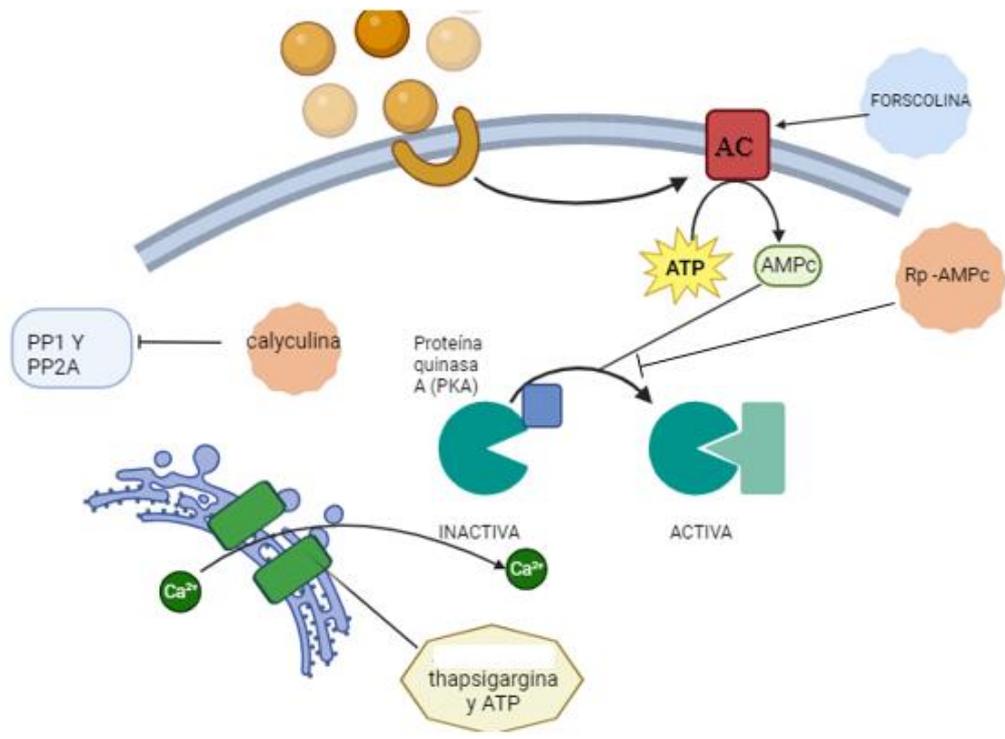


Figura 3. Cascada de señalización AC/cAMP/PKA

Se indican los principales sitios de acción de los moduladores utilizados en este trabajo.

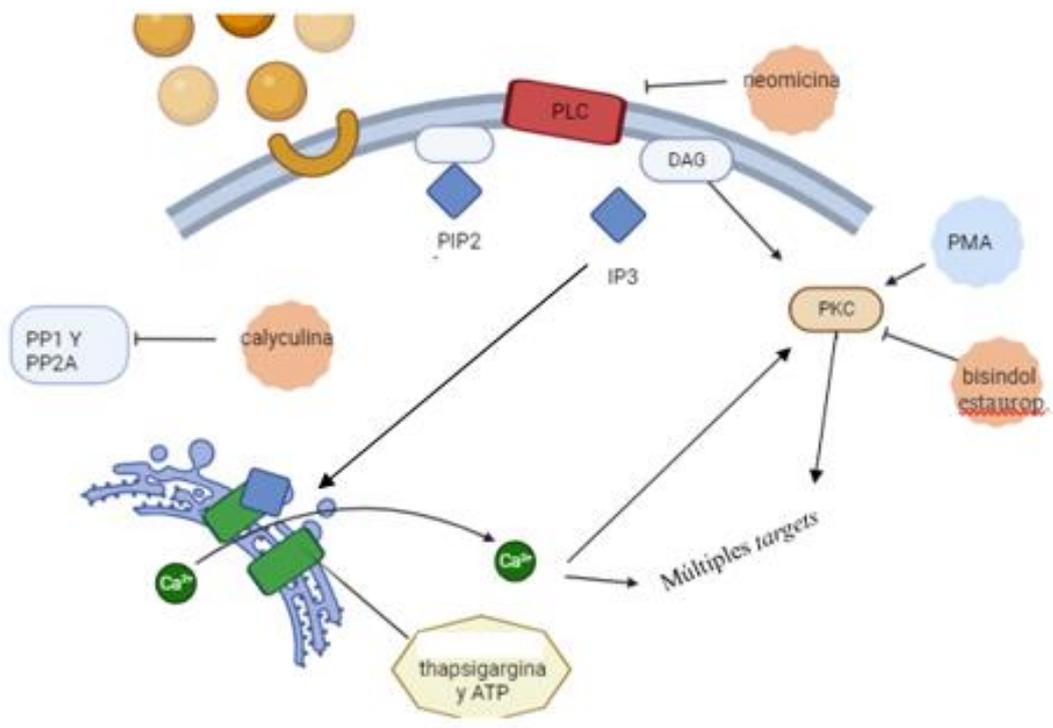


Figura 4: Cascada de señalización PLC/DAG/PKC

Se indican los principales sitios de acción de los moduladores utilizados en este trabajo.

Marcación de organelas e inmunocitoquímica

Las células se cultivan en cajas de Petri para microscopía de 3 cm. Cuando las células alcanzan la confluencia esperada (70% aproximadamente) se efectúan los tratamientos descritos en Materiales y Métodos. Luego se realizaron tinciones con colorantes fluorescentes específicos y/o marcaciones con anticuerpos.

Tinción mitocondrial con Mitotracker Red (MTT): Para la marcación de las mitocondrias, las células fueron incubadas con el colorante mitocondrial *MitoTracker Red* (1 μ M, 30 min, 37°C, protegido de la luz). Este compuesto es un colorante catiónico lipofílico fluorescente. El potencial negativo de la mitocondria permite que el colorante ingrese en la organela. Una vez en el interior mitocondrial, el colorante forma uniones covalentes (reacciona con grupos tioles) estables con las proteínas mitocondriales, marcando específicamente a la organela. Después del período de incubación, se realizan lavados (3 de 10 min cada uno). Se utilizó un buffer PBS (pH 7,4), compuesto por NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, KH₂PO₄ 0.24 g/l y Na₂HPO₄ 1.44 g/l, para efectuar los correspondientes lavados, y metanol puro (20 min, -20°C) para la fijación y permeabilización celular. Luego, se realizaron nuevamente lavados con el buffer PBS para eliminar restos de metanol. Todo el procedimiento se realiza al resguardo de la luz. Seguido, se procede a la tinción de núcleos con DAPI.

Tinción nuclear con DAPI: El 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI) se une específicamente al ADN doble hebra. Como dicho marcador no puede pasar a través de la membrana celular, se utiliza para teñir células permeabilizadas. Por lo tanto, luego de realizar los distintos tratamientos, la tinción con MTT, la fijación y permeabilización con metanol a -20 °C durante 20 minutos y el posterior lavado con PBS, las células se incuban con una dilución 1:500 en PBS de una solución stock de DAPI (5 mg/ml), durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación suave. Luego de 3 lavados con PBS durante 15 minutos cada uno, las muestras son analizadas en un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse Ti-S) equipado con filtros adecuados para capturar las señales fluorescentes.

Cuando se realizaron las inmunocitoquímicas, luego de llevar a cabo los distintos tratamientos, las células se lavan con PBS 1X y se fijan durante 20 min a temperatura ambiente con paraformaldehído 3 % en PBS (preparado en el momento). Para permeabilizar las células se incluirá 0.05 % Triton X-100. Los sitios no-específicos de ligado a proteínas se bloquean con 5 % de albúmina bovina en PBS 1X (1 hora). Se incuban toda la noche (4°C) en presencia o ausencia (control negativo) de los anticuerpos primarios y luego de lavar 3 veces 10 min con PBS 1X, se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fluoróforo. Finalmente se preparan para su visualización (Milanesi y col., 2008; 2009; Pronsato y col., 2013a; 2013b). La especificidad de cada una de las marcaciones fue demostrada mediante la realización de controles en los que no se observó fluorescencia cuando los

anticuerpos secundarios fueron adicionados en ausencia de los correspondientes anticuerpos primarios. En esta tesis de grado se utilizó el anticuerpo integrina $\alpha 9/\beta 1$ (2Q954) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que reconoce a la integrina $\alpha 9$.

Microscopía de fluorescencia convencional y de campo claro

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse Ti-S) equipado con filtros adecuados para capturar las señales fluorescentes. También se analizaron los preparados con microscopía de campo claro, usando el mismo equipo. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara digital acoplada al microscopio. El análisis de las imágenes se realizó con el software NIS 2.1 e Image J. El parámetro morfológico cuantificado fue la longitud celular, midiéndose el eje mayor de cada célula después de los distintos tratamientos y se establecieron comparaciones con los respectivos controles (Figura 5); se examinaron por lo menos 5 campos por condición de tres experimentos independientes.

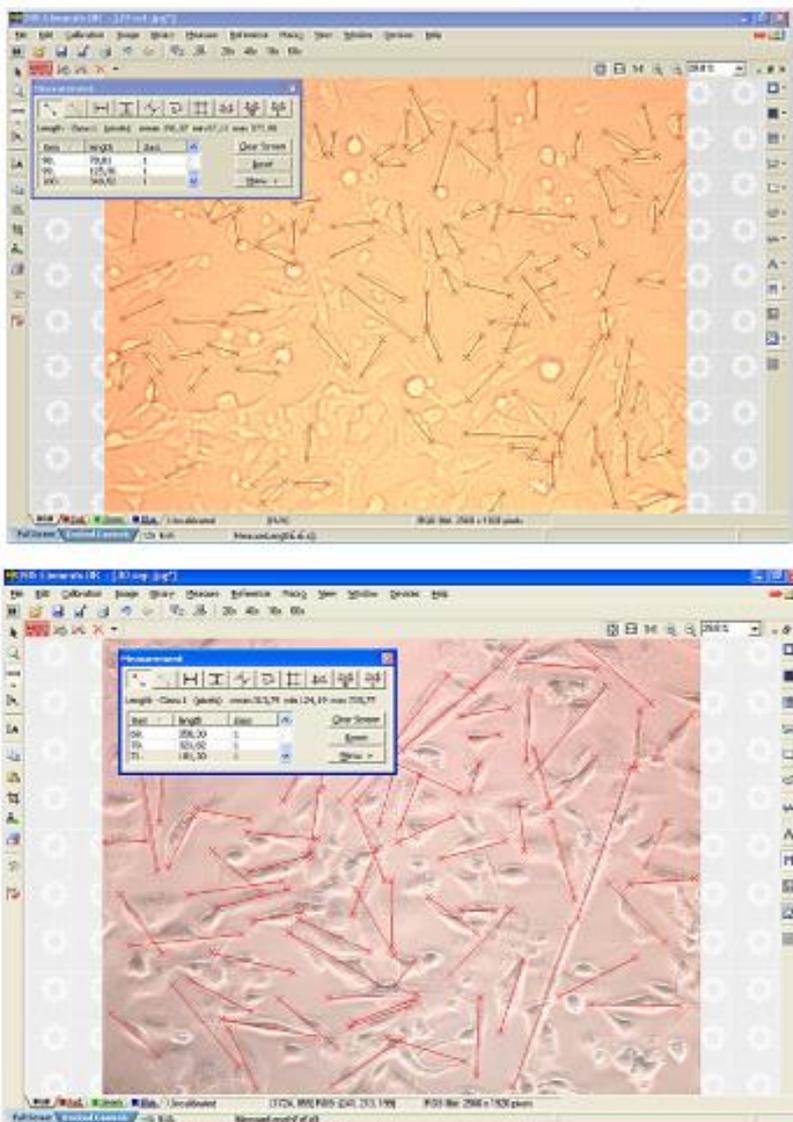


Figura 5. Análisis de las microfotografías con el software NIS 2.1

Se midieron las longitudes de las células control (A) y las tratadas (B), de al menos 5 campos tomados al azar de cada condición. Los datos obtenidos se exportaron a Excel para la presentación de resultados cuantificados.

Análisis de la expresión génica

Se evaluaron los cambios en la expresión de los genes de interés por Real Time-PCR, empleando el reactivo *SYBR Green I* y siguiendo el protocolo del *kit* comercial *KAPA SYBR® FASTqPCR Kit Master Mix (2X) Universal*. Para la cuantificación de la expresión de los genes de interés, se empleó el equipo de Real Time PCR de Applied Biosystems modelo ABI 7500 de nuestro laboratorio.

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), es una variación de la reacción de PCR estándar. La nueva versión de esta técnica permite el análisis de la expresión de los genes de interés, amplificando y cuantificando de manera simultánea ADN o ARNm de una muestra a medida que la reacción avanza, es decir: “en tiempo real” (Higuchi y col. 1992). Esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, como Bromuro de Etidio o el SYBR Green (Figura 6), y el incremento de la fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción. Para determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o de ARN, se utilizan *primers* específicos. Asimismo, al combinar una PCR en tiempo real con una reacción de retrotranscripción (RT-PCR), (RT-qPCR), se puede determinar la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Decimos “relativa” ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación de ARNm de un gen específico, respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (control endógeno).

Brevemente, para la cuantificación en tiempo real, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón (fragmento de ácido nucleico amplificado) producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá (Figura 7). Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales; por lo tanto, en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores. (Figura 7, Pronsato y col., 2017; La Colla y col., 2017).

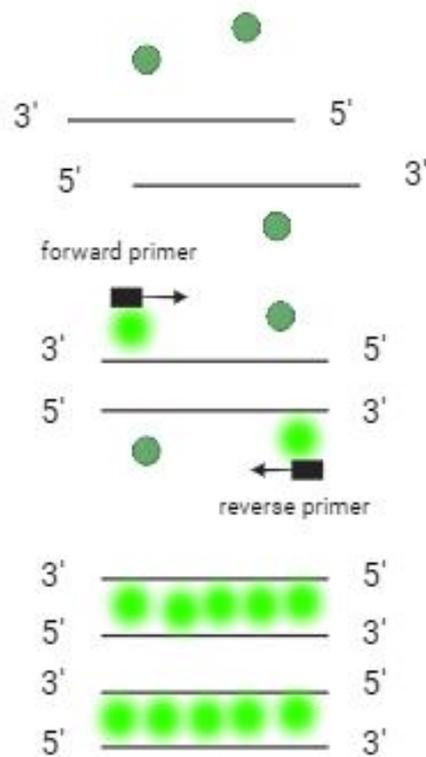


Figura 6. Esquema del sistema de detección SYBR Green

La molécula de SYBR Green se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN. La molécula unida al ácido nucleico, incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. Este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés). El complejo ADN-SYBR Green tiene un pico de absorción en $\lambda = 498 \text{ nm}$ y el de emisión en $\lambda = 522 \text{ nm}$ (correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre).

Ejemplo:



Ciclo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
23	250.000	1.000.000	31.250
24	500.000	2.000.000	62.500
25	1.000.000	4.000.000	125.000
26	2.000.000	8.000.000	250.000
27	4.000.000	16.000.000	500.000
28	8.000.000	32.000.000	1.000.000

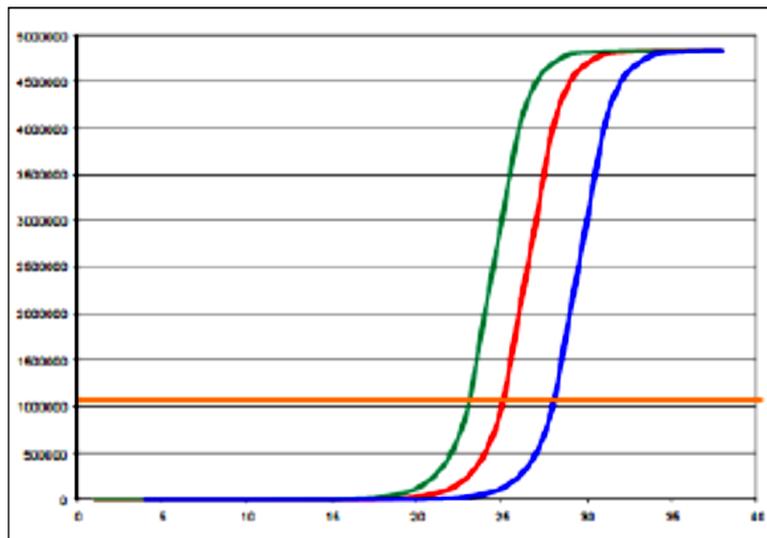


Figura 7. Gráficas típicas de qPCR

Una determinada cantidad de amplicón producido aparecerá en ciclos anteriores si la cantidad de ARN/ADN para el gen de interés es mayor. Ejemplo: muestra 2 (Salas, Sabrina; tesis de grado, 2017).

Para determinar la expresión relativa de los genes de interés, los datos fueron analizados mediante el método de cuantificación relativa por comparación de Ct (*Threshold cycle*, ciclo umbral). El Ct es el ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia detectada alcanza un umbral de amplificación en un pocillo. El umbral de amplificación se calcula a partir de la fluorescencia de fondo (*background*) correspondiente a las líneas de base de todas las curvas del grupo, y representa el punto en el que la señal del reportero es significativamente superior a los niveles de fondo. Es decir, es el primer incremento significativo en la cantidad de producto de PCR, medido por el aumento de fluorescencia. No significa que no exista fluorescencia antes, solo que no alcanza para ser detectada por el termociclador (figura 8 A y B). El valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de molde inicial en la reacción y es una medida relativa de la concentración del *target* en la reacción de PCR.

El nivel de transcripción del gen en estudio se comparó con un gen de referencia constitutivo (control endógeno) en este trabajo se usó el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Luego de promediar los valores de CT para cada gen, se realiza la diferencia entre el gen de interés y el gen endógeno, obteniendo el valor ΔCT para cada tratamiento y los valores se establecieron como $2^{-\Delta CT}$.

A.



B.

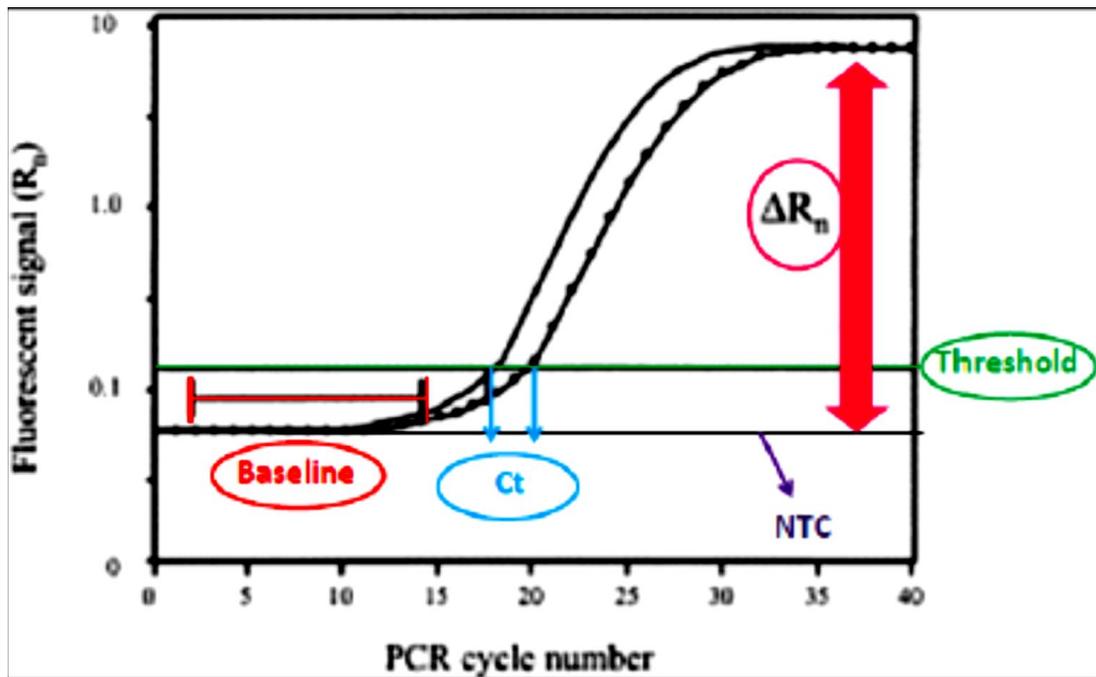


Figura 8. Detalles de la curva de amplificación por qPCR

A. Detalle de la fase exponencial temprana del proceso de amplificación. B. Detalle del threshold y la obtención del valor CT (Salas, Sabrina; tesis de grado, 2017).

Extracción de ARN total: El ARN fue aislado a partir de los cultivos tratados empleando el *kit* comercial *High Pure RNA Isolation kit* de Roche y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Mediante espectrofotometría, se determinó la cantidad y calidad del ARN basándose en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. Las muestras de ARN fueron guardadas a -70 °C hasta su utilización (Pronsato y col., 2017; La Colla y col., 2017).

Cantidad de ARN µg/ml: $40 \times DO_{260nm} \times \text{factor de dilución}$.

Retrotranscripción del ARN a ADNc: Del ARN obtenido se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 2 µg del ARN previamente purificado, utilizando el *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* de Applied Biosystems, provisto de *random primers* como cebadores, y de la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. La retrotranscripción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal de nuestro laboratorio, empleando un programa de 10 min a 25°C (activación de la enzima), 120 min a 37 °C (síntesis del ADNc) y 5 min a 85°C (desnaturalización de la enzima y degradación del ARN). La concentración de ADNc, que debe ser similar en todas las muestras, se determinó por espectrofotometría, empleando un programa para la medición de ADN de hebra simple: *single-stranded DNA*. Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 33 µg/ml de ADNc. El ADNc obtenido, correspondiente a cada condición, se almacenó a -20°C hasta su utilización (Pronsato y col., 2017; La Colla y col., 2017).

Cantidad de ADN hebra simple µg/ml: $33 \times DO_{260nm} \times \text{factor de dilución}$

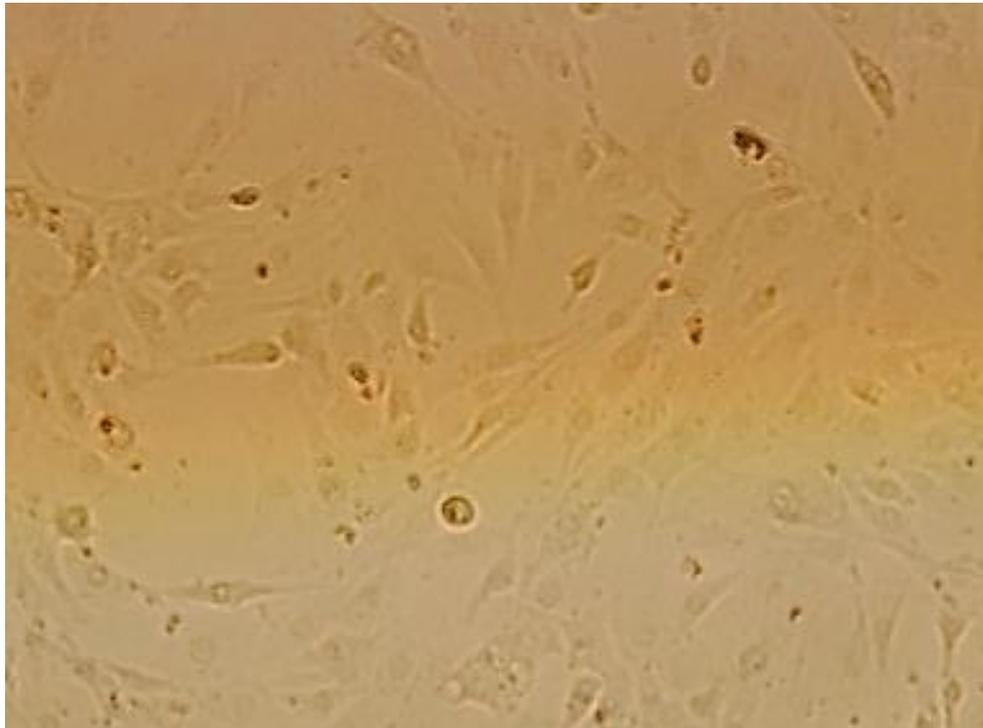
Análisis morfológico por microscopía y descripción diferencial de las células RD y C2C12

Células C2C12

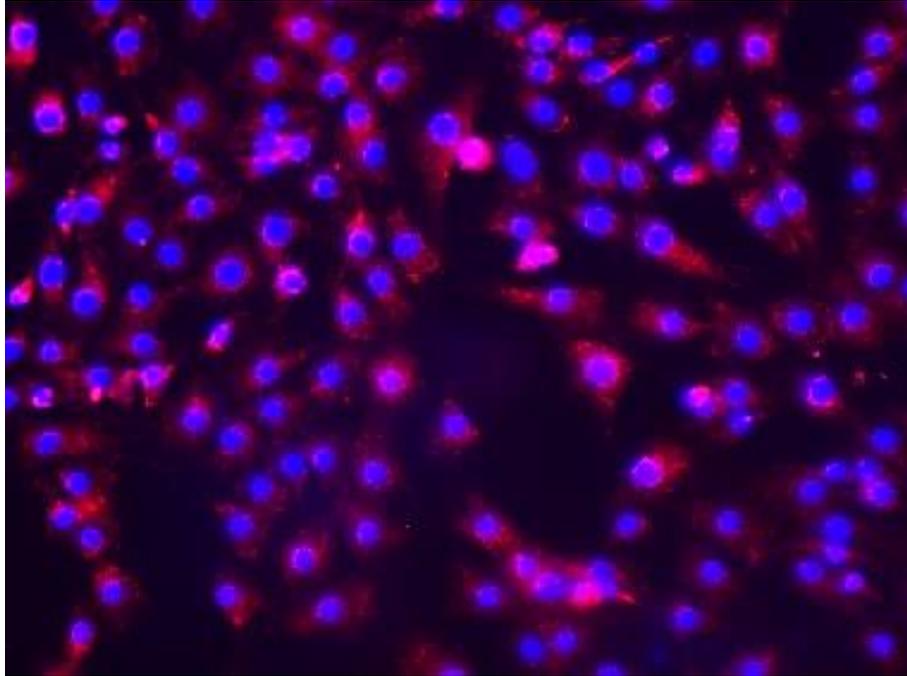
Si bien estas células presentan importante heterogeneidad de forma y tamaño, se observó que en general tienen un característico aspecto estrellado. Presentan abundante citoplasma con un núcleo voluminoso y numerosas mitocondrias dispersas por todo el citosol, como se evidenció utilizando la marcación con *Mitotracker*. Con dicha marcación las mitocondrias fluorescen como gránulos de color rojo/naranja.

Los núcleos son redondos con cromatina laxa. La marcación con DAPI permitió observar los mismos, de color celeste/azulado. Se tomaron fotografías representativas de las distintas observaciones (Figuras 9 A, B y C).

A.



B.



C.

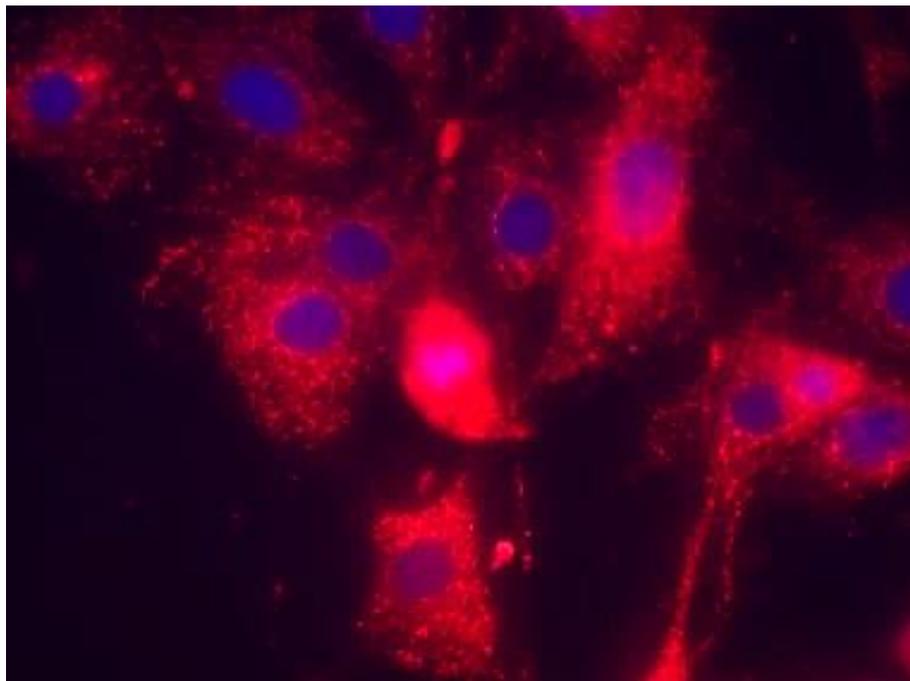


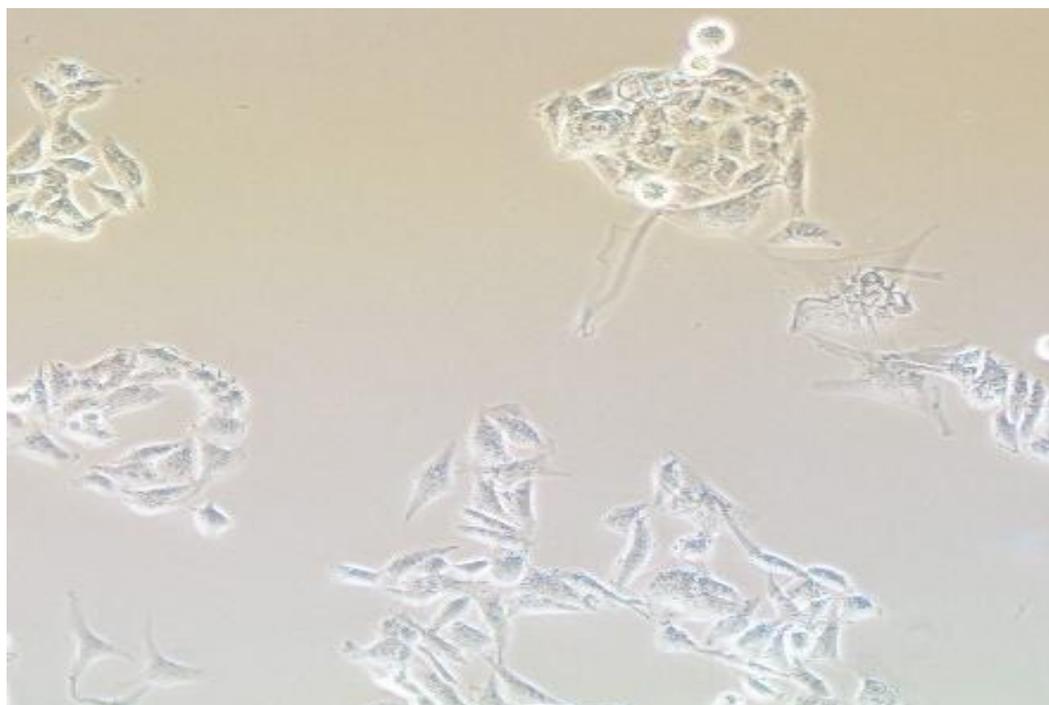
Figura 9. Morfología de las células C2C12

A. Imagen obtenida con microscopía de campo claro (Magnificación 20x). B. Imagen obtenida con microscopía de fluorescencia utilizando marcación con DAPI y Mitotraker (Magnificación 20x) y (Magnificación 63x) (C).

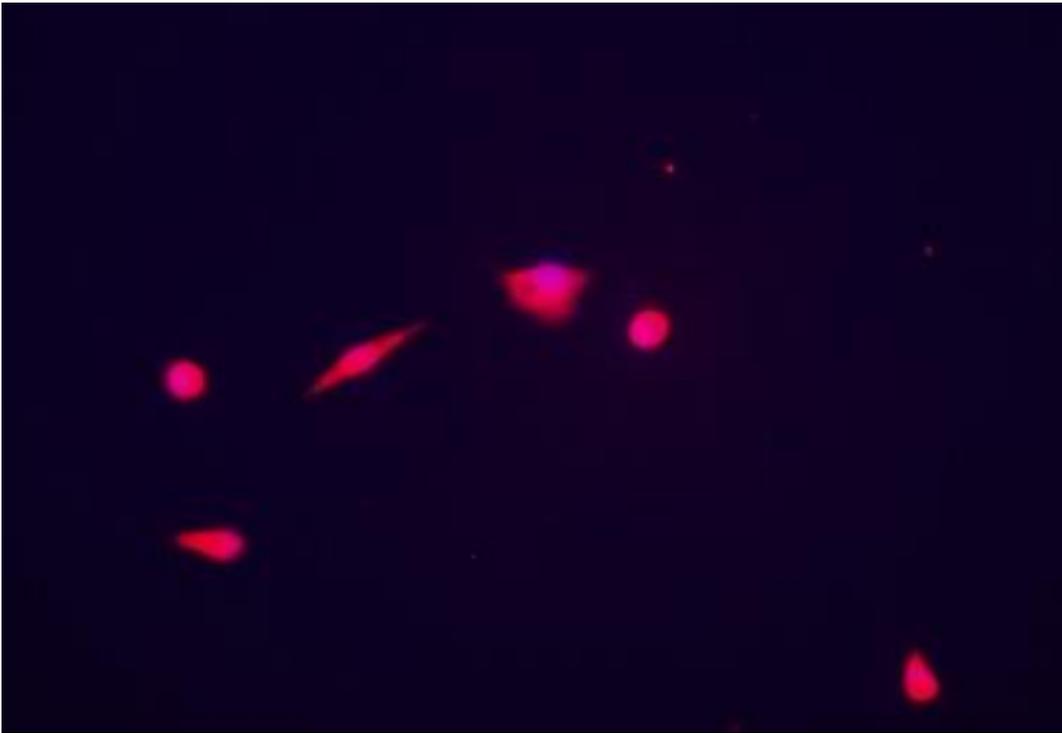
Células RD

Se observó que las células RD presentan un aspecto de “mantarraya”, más homogéneas entre sí con respecto a la forma; de menor tamaño que las células C2C12 y con tendencia a formar tumores en cultivo (crecen en forma agrupada, superponiéndose unas a otras, antes que a expandirse por la superficie de la placa de cultivo). Presentan poco citoplasma y un núcleo grande. Utilizando las tinciones de DAPI y *Mitotracker*, las observaciones sugieren una cromatina menos laxa que en las células C2C12 y, un menor número y tamaño de las mitocondrias. (Figura 10 A, B y C).

A.



B.



C.

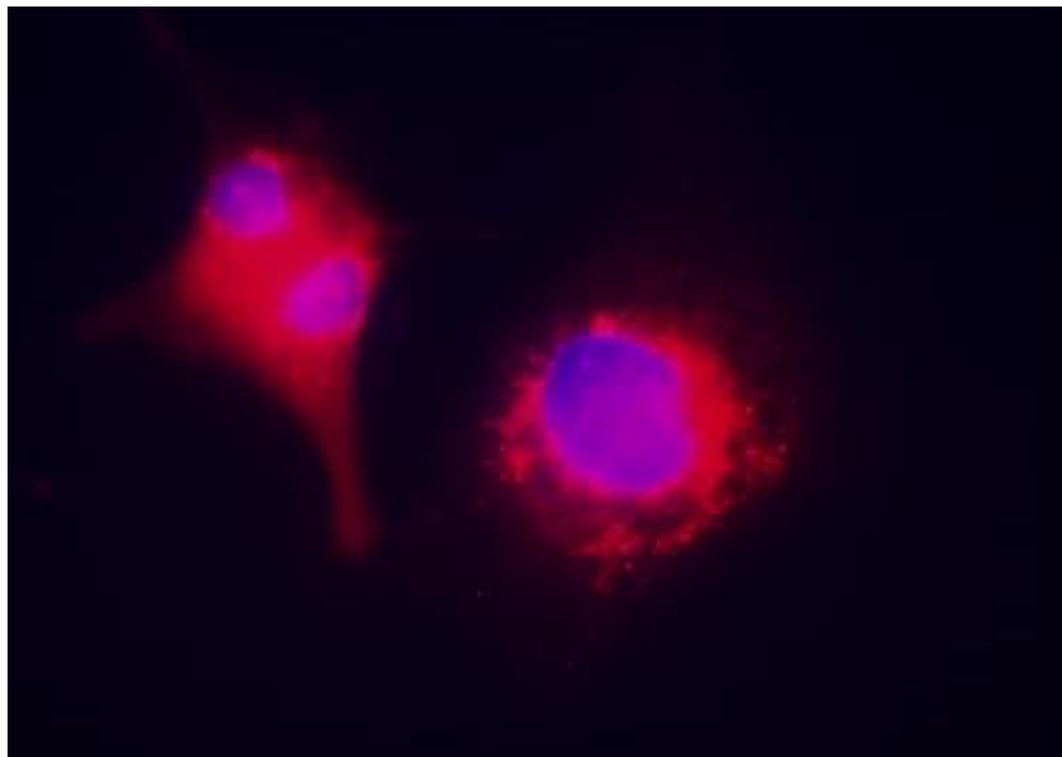


Figura 10. Morfología de las células RD

A. Imagen obtenida con microscopía de campo claro (Magnificación 20x). B. Imagen obtenida con microscopía de fluorescencia utilizando marcación con DAPI y Mitotraker (Magnificación 20x) y (Magnificación 63x) (C).

Investigación de las posibles vías de señalización intracelulares involucradas en el proceso de diferenciación

Los mecanismos de señalización intracelular son variados; no obstante, muy conservados entre especies, desde plantas a vertebrados. La señalización celular permite a las células responder a su entorno y comunicarse con otras células. En general se encargan de convertir la presencia de una hormona, un metabolito, estímulos de stress o la misma luz, en una señal que la célula pueda interpretar. Es por eso, que al proceso de comunicación entre células se lo conoce como «transducción de señales» (Hynes y col., 2013). Esta expresión indica que la información debe ser no sólo detectada, sino además transformada dentro de la célula en una forma química o física adecuada para que se desencadene un efecto biológico.

En las últimas décadas se ha descrito una abundante cantidad de vías de señalización intracelular con innumerables componentes moleculares en cada una de ellas y se han identificado y sintetizado una importante batería de moduladores específicos que actúan sobre los diferentes componentes de cada una de estas vías. En este trabajo, haciendo uso de dichos moduladores se evaluó cuál/es de estos inducía/n características morfológicas de una célula diferenciada en el sistema experimental aquí utilizado y de esta forma asociar una determinada cascada de señalización al proceso de diferenciación. Brevemente, tal como se describió en Materiales y Métodos, se trataron las células con activadores e inhibidores específicos de diferentes cascadas de señalización, observándose cuál de los distintos compuestos eran capaces de inducir diferenciación; y, si los correspondientes inhibidores de la vía que se estimuló eran capaces de bloquear ese efecto. La verificación de este doble criterio, representó un indicador de la participación de un mecanismo de transducción de señales determinado.

Células C2C12

En el primer conjunto de experimentos se utilizó Forskolina y Rp-AMPC, ambos moduladores de la vía AC/AMPC/PKA; y Neomicina y PMA moduladores de PLC/DAG/PKC.

Tal como se detalla en Materiales y Métodos, se cultivaron células C2C12 en *multiwell* de 96 pocillos de fondo transparente que son aptas para microscopia y cuando alcanzaron la confluencia deseada, se iniciaron los tratamientos según el esquema de la Figura 11. De esta forma cada condición se repitió 12 veces (nro. de pocillos por filas) y el experimento se repitió 3 veces partiendo de lotes diferentes de células cada vez. Las concentraciones de cada modulador utilizado surgen de una revisión bibliográfica y curvas dosis respuestas (Tabla 2).

La condición de suero fetal bovino (SFB) al 10%, representa un control para evaluar los cambios que pudieran darse durante el tiempo prolongado de cultivo. Para inducir la diferenciación celular se bajó la concentración de SFB; se utilizó el mismo suero al 1 % (Fujita y col. 2010; Gili y col. 2016), representando esta condición un control positivo de diferenciación. Para determinar qué vía está

involucrada en la diferenciación, se adicionan a los medios (con 10% y con 1% de SFB) de cultivo Forskolina, PMA, Neomicina y Rp-cAMP. Los tratamientos se prolongaron entre 15 y 20 días, renovando el medio y los correspondientes moduladores, cada 2 días. Se realizaron observaciones por microscopía de cada pocillo y se tomaron fotografías representativas al iniciar el experimento y luego cada 2 o 3 días (Figura 12 A).

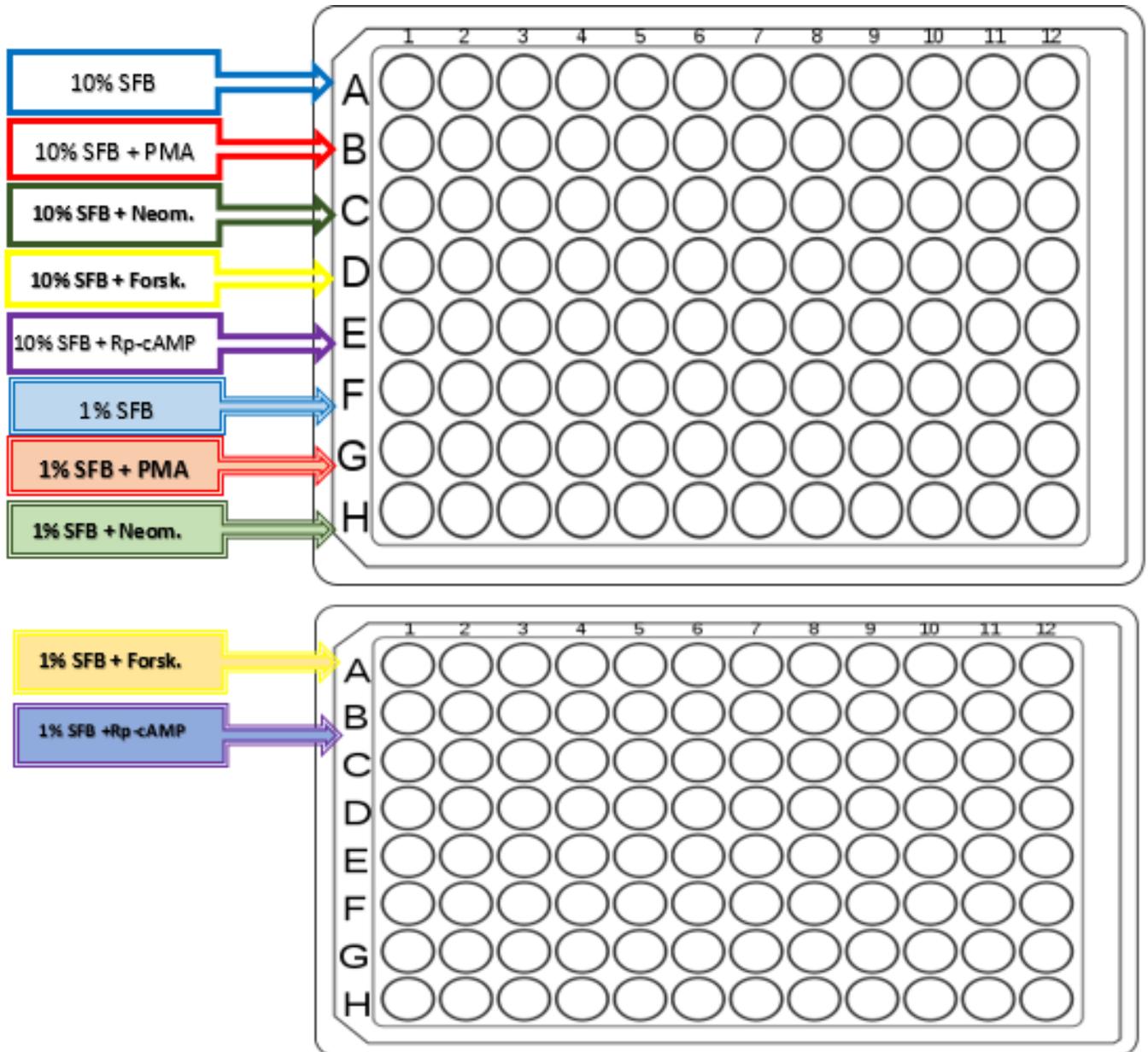


Figura 11. Esquema experimental en multiwell

10% SFB: DMEM con 10% de Suero fetal bovino. **10% SFB+PMA:** DMEM con 10% de Suero fetal bovino y 100 μ M de PMA. **10% SFB+Neom.:** DMEM con 10% de Suero fetal bovino y 3 mM de Neomicina. **10% SFB+Forsk.:** DMEM con 10% de Suero fetal bovino y 20 μ M de Forskolina. **10%**

SFB+Rp-cAMP: DMEM con 10% de Suero fetal bovino y 1mM de Rp-cAMP. **1% SFB:** DMEM con 1% de Suero fetal bovino. **1% SFB+PMA:** DMEM con 1% de Suero fetal bovino y 100 μ M de PMA. **1% SFB+Neom.:** DMEM con 1% de Suero fetal bovino y 3 mM de Neomicina. **1% SFB+Forsk.:** DMEM con 1% de Suero fetal bovino y 20 μ M de Forskolina. **1% SFB+Rp-cAMP:** DMEM con 1% de Suero fetal bovino y 1mM.de Rp-cAMP.

Células RD

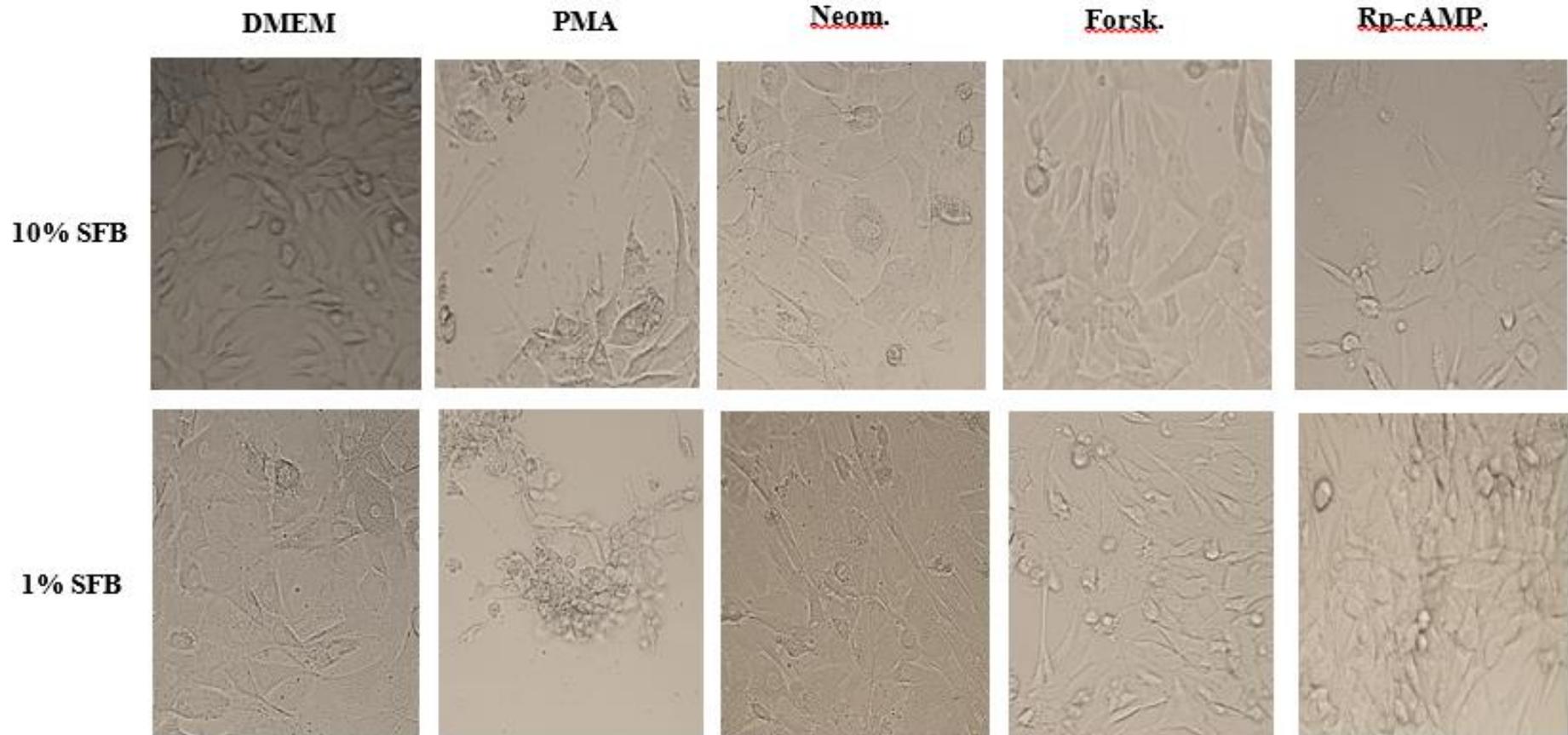
De igual forma que se trabajó con las células C2C12, se procedió con la línea celular RD. Se realizaron las mismas condiciones experimentales (Figura 11), en un *multiwell* de 96 pocillos, pero sembrado con células RD. Se realizaron observaciones por microscopía de cada pocillo y se tomaron fotografías representativas al iniciar el experimento y luego cada 2 o 3 días durante todo el período que duró el experimento (Figura 12 B).

Las observaciones iniciales, que surgieron de estos experimentos indicaron que tanto con las células C2C12 como con las células tumorales RD, cada ensayo se pudo prolongar hasta aproximadamente 20 días, con un crecimiento normal como se ve en la condición DMEM con 10% SFB. Asimismo, en la condición DMEM con 1% SFB se observaron características de una célula muscular diferenciada (pierden la forma típica piramidal (C2C12) o de “mantarraya” (RD), con crecimiento multidireccional; para convertirse en células alargadas, delgadas, con un crecimiento “ordenado” en una misma dirección y con tendencia a fusionarse). Estas características no se observaron en las condiciones con PMA, Forskolina o Rp-cAMP. Los tratamientos con PMA, no favorecen el crecimiento celular y con el transcurso del tiempo los cultivos mueren. La línea celular RD mostró mayor sensibilidad a este compuesto. Se ensayó una dosis menor de PMA en ambos tipos celulares, obteniéndose el mismo efecto (datos no mostrados). Los tratamientos con Forskolina o con Rp-cAMP, si bien no afectaron la viabilidad celular, no indujeron las características morfológicas indicadas como signos de diferenciación. En cambio, el tratamiento de ambas líneas celulares con Neomicina, indujo cambios morfológicos, similares a los observados en la condición DMEM con 1% SFB; se observó que las células se alargaban y fusionaban adquiriendo las características de fibra muscular. La Figura 12 en los paneles A y B, muestra que las características de morfológicas de diferenciación se hacen más evidente con el transcurso del tiempo en la condición de Neomicina, para ambos tipos celulares; siendo más susceptible la línea celular RD.

A-

LÍNEA CELULAR C2C12

DIA 1



DIA 5

DMEM

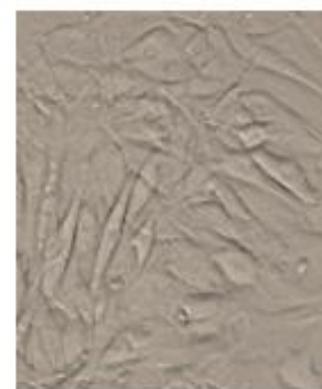
PMA

Neom.

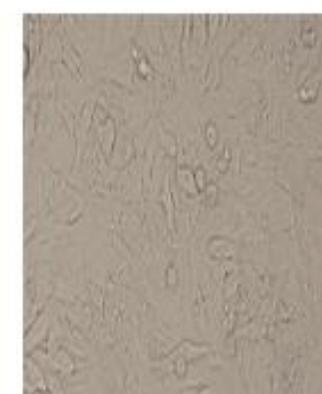
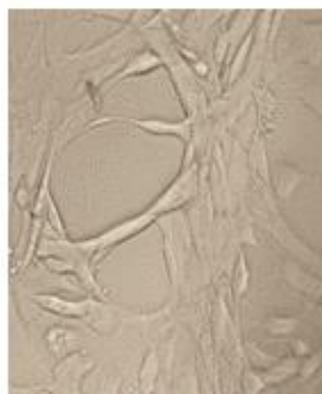
Forsk.

Rp-cAMP.

10% SFB



1% SFB



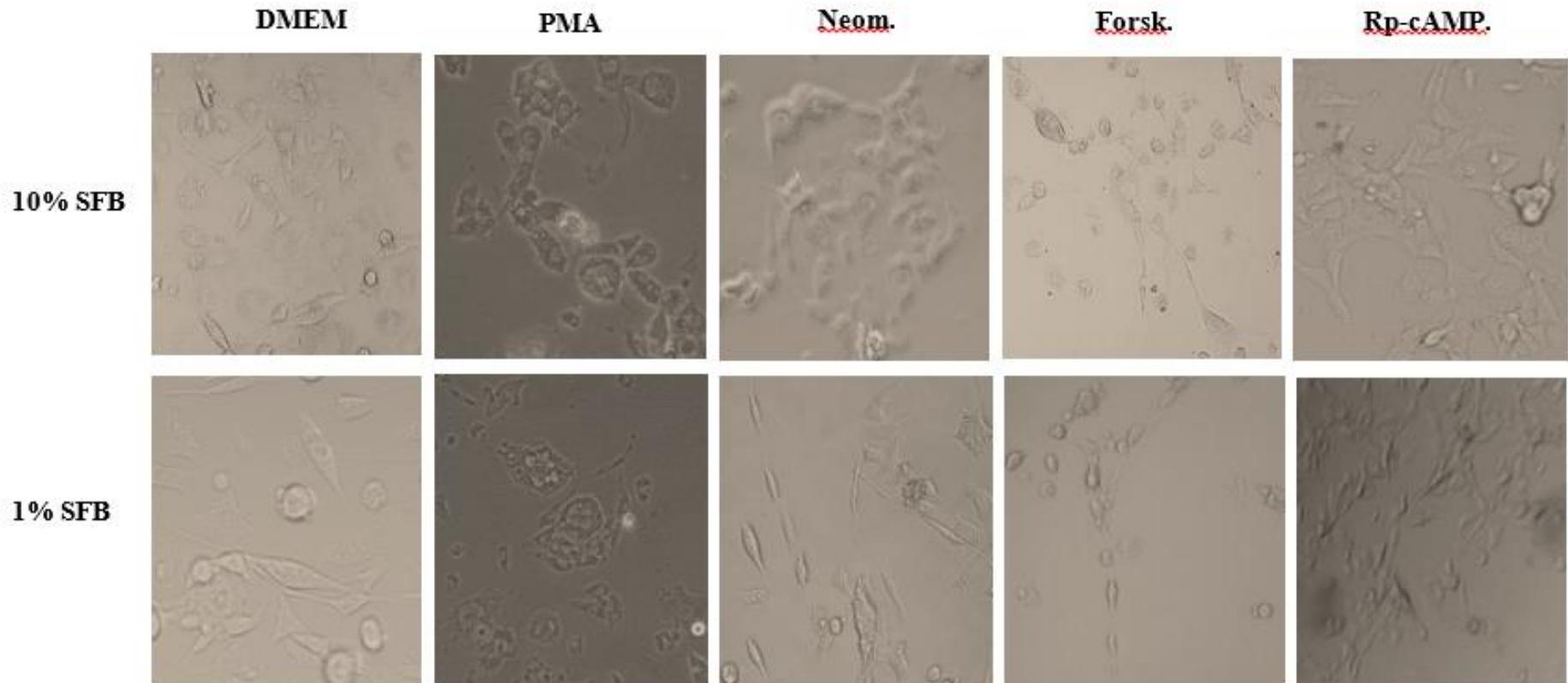
DIA 18

	DMEM	PMA	<u>Neom.</u>	<u>Forsk.</u>	<u>Rp-cAMP.</u>
10% SFB		✗			✗
1% SFB		✗			✗

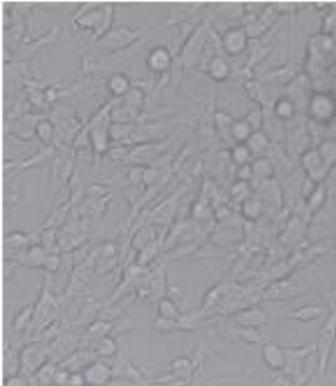
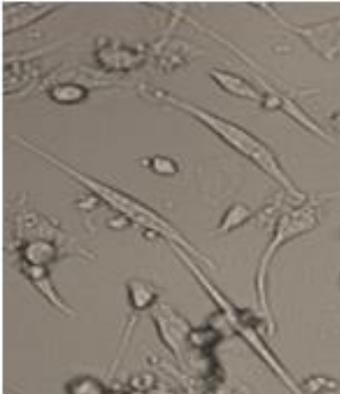
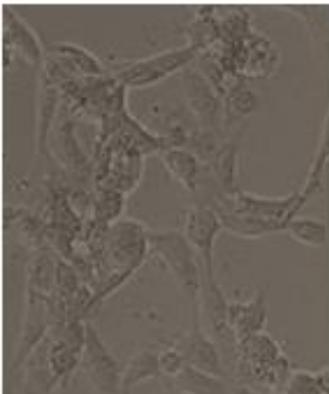
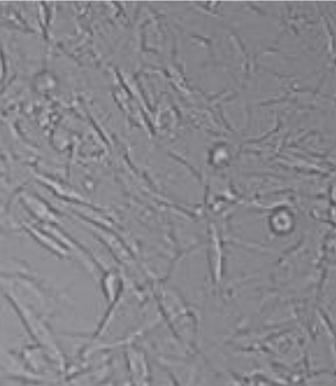
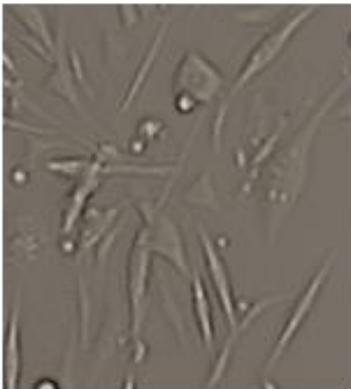
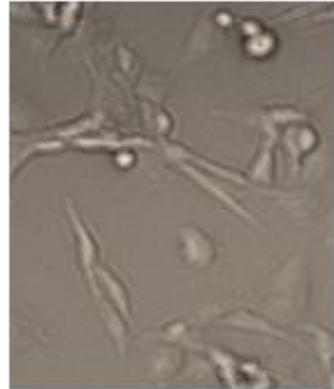
B-

LÍNEA CELULAR RD

DIA 1



DIA 5

	DMEM	PMA	<u>Neom.</u>	<u>Forsk.</u>	<u>Rp-cAMP.</u>
10% SFB		✘			✘
1% SFB		✘			✘

DIA 18

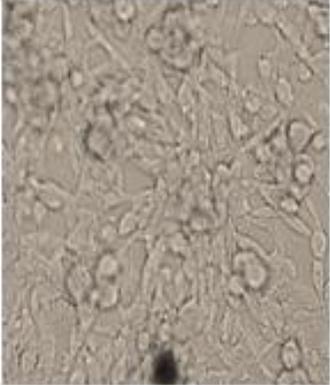
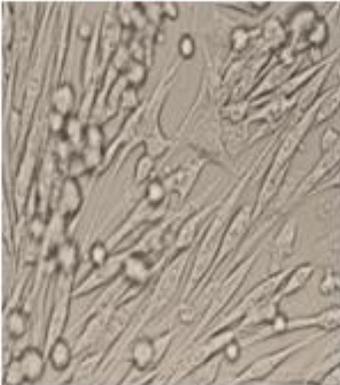
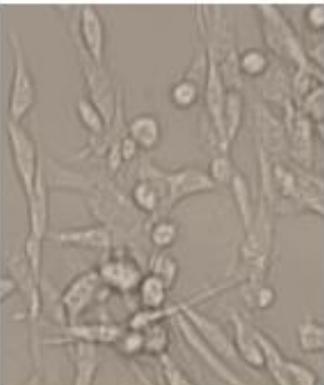
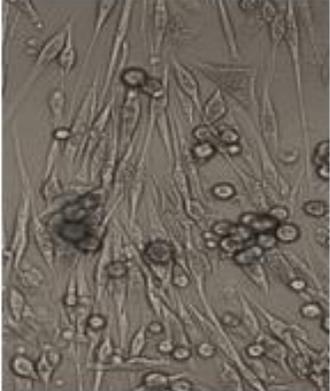
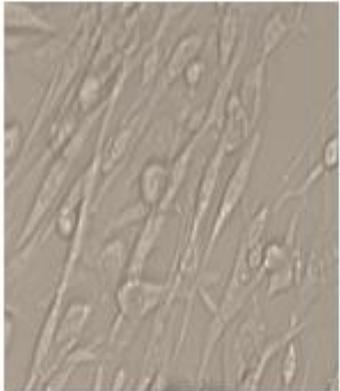
	DMEM	PMA	<u>Neom.</u>	<u>Forsk.</u>	<u>Rp-cAMP.</u>
10% SFB					
1% SFB					

Figura 12. El tratamiento con Neomicina induce cambios morfológicos asociados con diferenciación en las células C2C12 y RD

Se muestran microfotografías de células C2C12 (panel A) y de células RD (panel B), tratadas según el esquema experimental que se describe en la Figura 11. Se muestran imágenes de los días 1, 5 y del último día del experimento. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes (Magnificación 40X).

Determinación de células multinucleadas

Durante la diferenciación celular los mioblastos o células musculares precursoras, se fusionan y forman fibras musculares largas y multinucleadas (Florini, 1991).

En base a los resultados obtenidos de los tratamientos con moduladores, se continuó trabajando con el inhibidor de PLC, Neomicina; por ser el tratamiento que indujo de forma más notoria, características morfológicas de células diferenciadas. Para confirmar estas observaciones, se procedió a determinar si las células que se observaban alargadas, además estaban multinucleadas. Para ello, las células fueron teñidas con el colorante nuclear DAPI (Materiales y Métodos) y se procedió a analizar por microscopía. En la Figura 13 se muestran microfotografías representativas del último día del experimento.

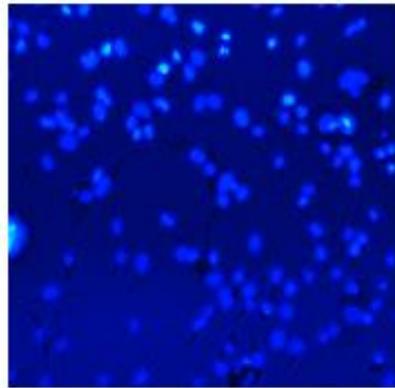
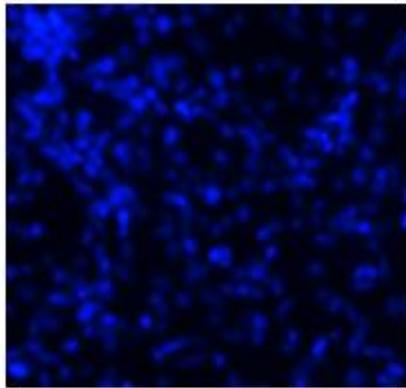
A-

LÍNEA CELULAR C2C12 – DÍA 15

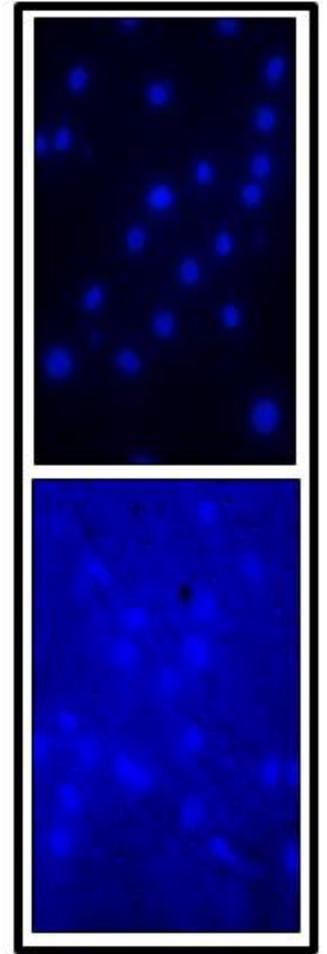
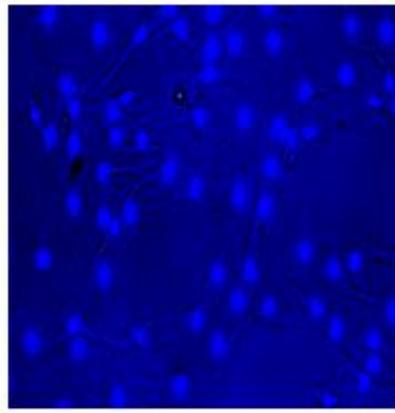
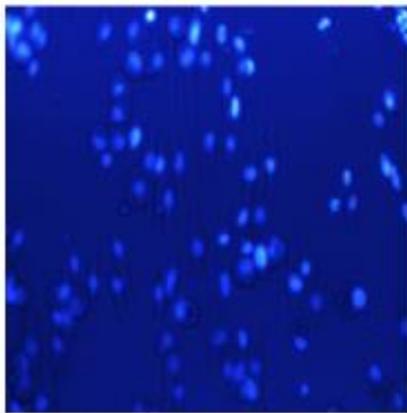
DMEM

Neom.

10% SFB



1% SFB



B-

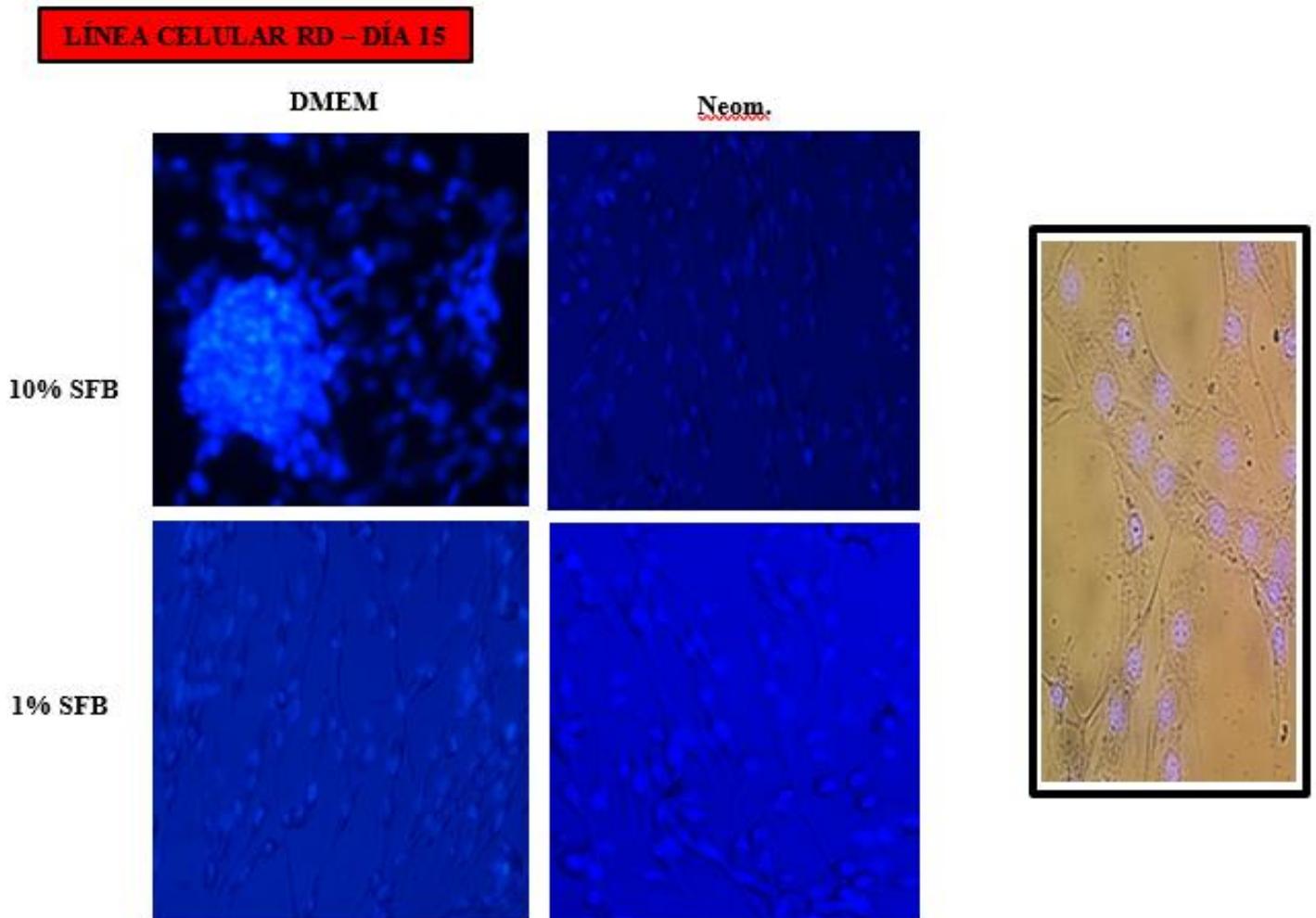


Figura 13. El tratamiento con Neomicina induce fusión celular y formación de fibras alargadas multinucleadas en los cultivos de C2C12 y RD

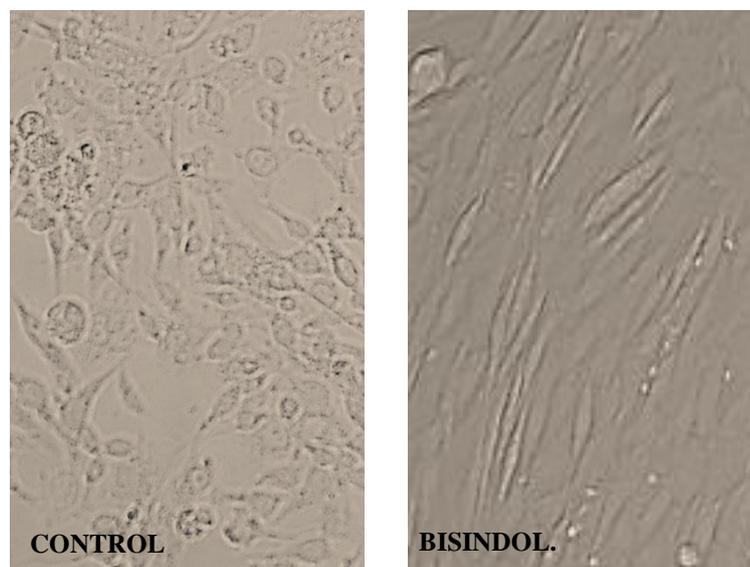
Se muestran micrografías representativas de células C2C12 (panel A) y de células RD (panel B), cultivadas con 10% de SFB y 1% SFB, y tratadas con Neomicina; también se muestran los controles sin tratamientos (Materiales y Métodos). Imagen obtenida con microscopía de fluorescencia utilizando marcación con DAPI (Magnificación 20x). El panel lateral que se observa a la derecha en ambos tipos celulares muestra en detalle las células fusionadas y multinucleadas (Magnificación 63x).

Rol de PKC en la diferenciación de las células tumorales RD

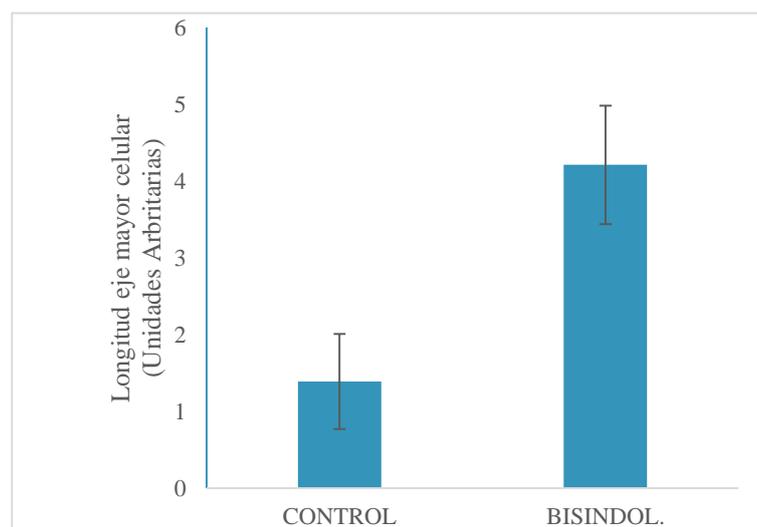
Como fue descripto en Materiales y Métodos, Neomicina es un inhibidor de PLC; y en vista que indujo diferenciación en las dos líneas celulares usadas en este trabajo, se decidió evaluar si PKC como componente de la vía PLC/DAG/PKC, cumple algún rol en dicho proceso. Para ello se realizaron los

mismos ensayos que se describieron anteriormente (Materiales y Métodos), pero en esta ocasión se usó Bisindolmaleimida un inhibidor de PKC y sólo la línea celular RD en medio acondicionado con 10% de SFB. Como se observa en la Figura 14, después de 15 días de tratamiento con el inhibidor de PKC, las células tumorales presentaron significativos signos de diferenciación. Específicamente se observó que las células tratadas presentaron una longitud 3 veces superior que las células control. Asimismo, la marcación con DAPI evidenció que las células estaban fusionadas y por lo tanto multinucleadas (datos no mostrados). Un efecto importante que se observó en las células RD tratadas con el inhibidor de PKC, fue un crecimiento muy ordenado de las células alargadas, siguiendo una misma dirección longitudinal y el grado de fusión es tan alto que la superficie de cultivo está totalmente cubierta a partir de los 10 días de tratamiento (Figura 14 C).

A-



B-



C-

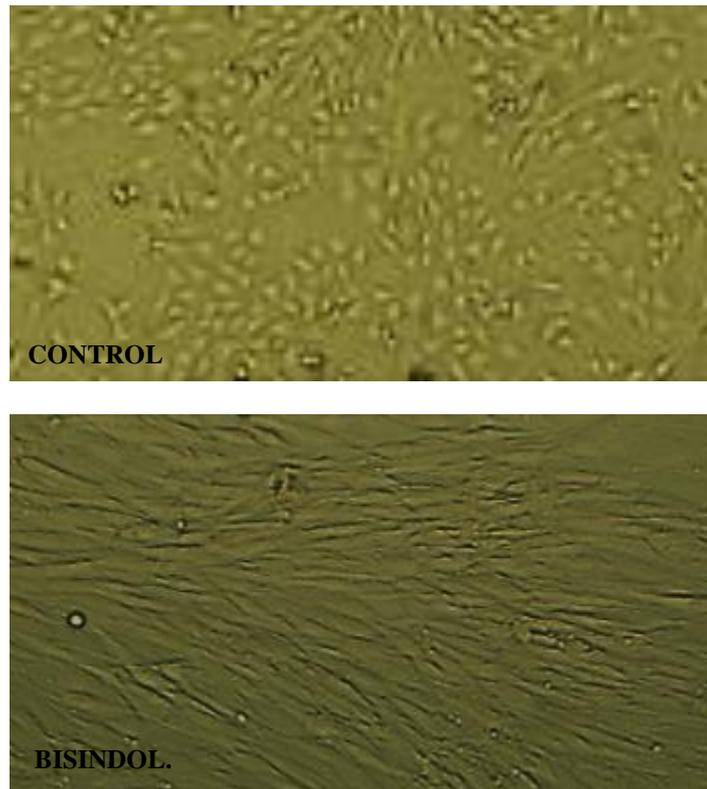


Figura 14. La inhibición de PKC induce la diferenciación de las células RD

A- Micrografías representativas de células RD cultivadas con 10% de SFB, tratadas con Bisindolmaleimida y sin tratar (control) (Materiales y Métodos) (Magnificación 40x). B- Cuantificación de la longitud del eje mayor celular, se midieron 50 células por condición de por lo menos 3 experimentos independientes. C- Crecimiento direccionado de las células tratadas con Bisindolmaleimida (Magnificación 40x).

En vista que los resultados obtenidos sugieren la participación de la PKC y sabiendo que su actividad y funciones pueden verse afectadas por variaciones de los niveles de calcio y por la actividad de fosfatasas, el siguiente conjunto de experimentos consistió en investigar los efectos sobre los parámetros de diferenciación, de los moduladores Thapsigargina, ATP y Caliculina A en combinación con Neomicina en las células RD (Materiales y Métodos). No se observaron cambios significativos en la morfología celular que sugirieran la inducción de diferenciación. Los resultados obtenidos no son concluyentes, por lo que se hace necesario realizar ensayos adicionales con otras metodologías. Una observación relevante que surge de este experimento es que en las condiciones que el modulador utilizado

afectó la viabilidad celular, en presencia de Neomicina el efecto negativo disminuyó. En la Figura 15 se muestran microfotografías representativas del ensayo.

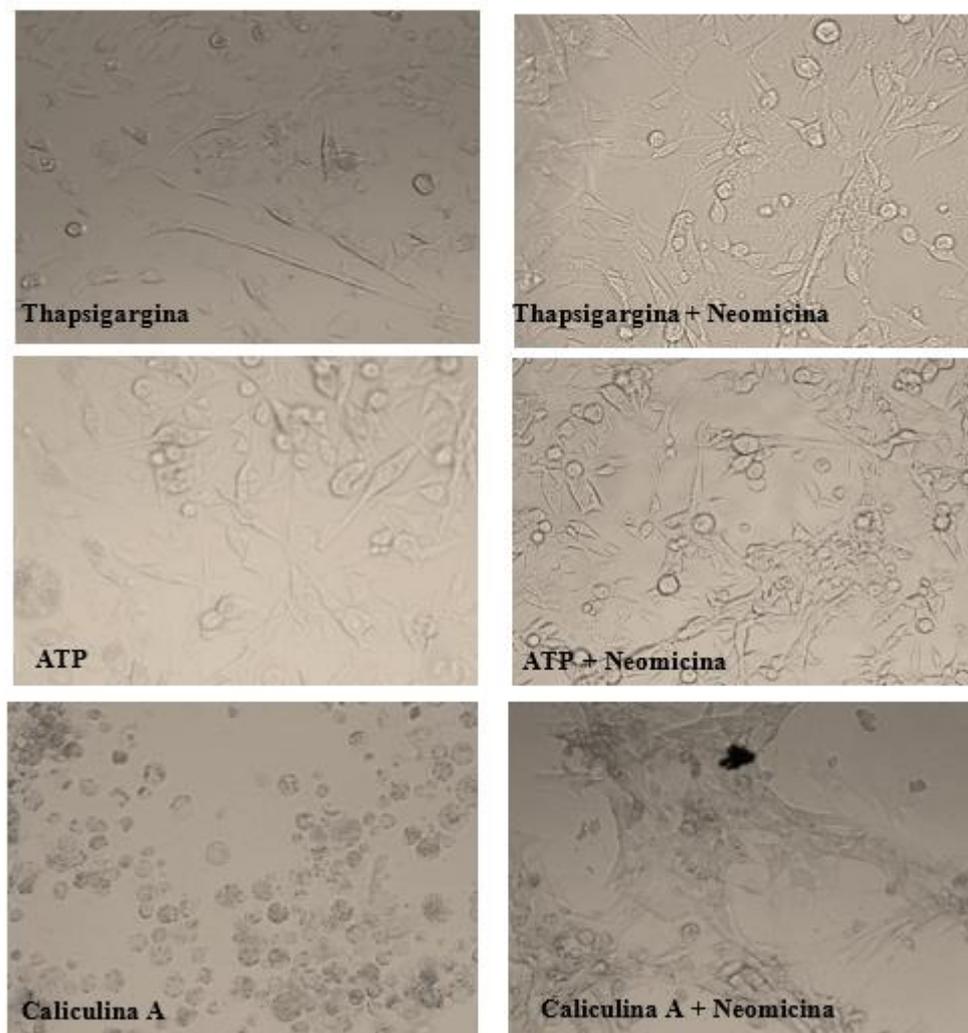


Figura 15. Tratamiento de las células RD con Thapsigargina, ATP y Caliculina A, en combinación con Neomicina

Las células RD cultivadas con DMEM acondicionado con 10% SFB se trataron con 5 μ M Thapsigargina, 15 μ M ATP, y 1 Mm Caliculina A, en ausencia de Neomicina (Panel derecho) y en presencia de Neomicina (Panel izquierdo), según se describe en Materiales y Métodos. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes (Magnificación 40x).

La inhibición de la vía PLC/PKC disminuye la expresión Integrinas

Como se mencionó en la Introducción, las células de RMS expresan altos niveles de Cadherina N e Integrina $\alpha 9$, proteínas relacionadas con la agresividad del tumor.

Mediante ensayos de inmunocitoquímica, se evaluó la expresión de la proteína Integrina $\alpha 9$ en células RD tratadas con moduladores de PLC y de PKC (Materiales y Métodos). Los resultados sugieren que el tratamiento, durante 15 días de las células RD, cultivadas en DMEM 10% SFB, con Neomicina y Bisindolmaleimida, disminuyen los niveles de expresión de la proteína Integrina $\alpha 9$ (Figura 16). Asimismo, se escogió al azar uno de los moduladores con los que no se había obtenido un resultado definitorio con respecto a la inducción de cambios asociados a la diferenciación celular y se procedió a evaluar los niveles de la Integrina post tratamiento con dicho modulador; en este caso se usó ATP y no se observaron cambios en la expresión de la Integrina.

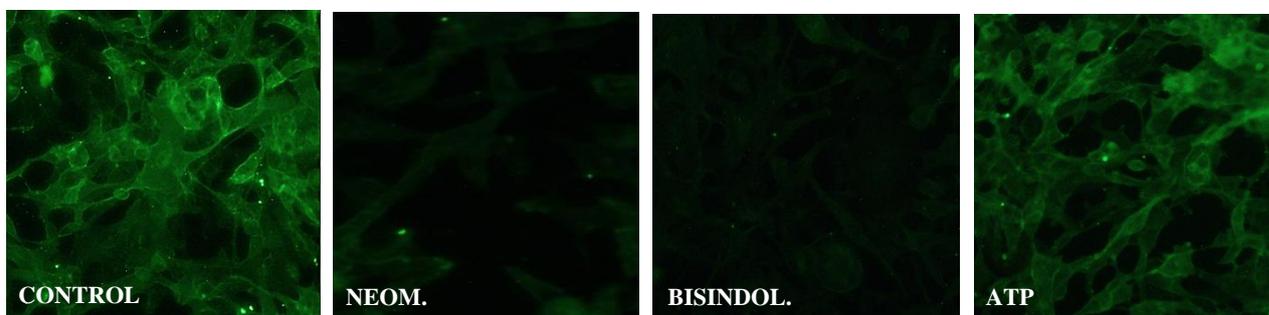


Figura 16. La inhibición de la vía PLC/PKC disminuye la expresión Integrina $\alpha 9$

Las células RD cultivadas con DMEM acondicionado con 10% SFB se trataron durante 15 días con Neomicina, Bisindolmaleimida y ATP (Materiales y Métodos). Las células fueron utilizadas en ensayos de inmunocitoquímica, usando un anticuerpo que reconoce la integrinas $\alpha 9$ (2Q954) seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (fluorescencia verde). Magnificación 20X. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

La vía PLC/PKC está involucrada en la regulación génica de MyoD y MHC I

Durante la miogénesis, las células precursoras mesodérmicas pluripotentes se comprometen con el linaje de mioblastos, proliferan, se diferencian, se fusionan en miotubos multinucleados y maduran para formar la célula muscular. Este proceso de diferenciación está regulado por la inducción o represión de factores de transcripción miogénicos que se encuentran altamente organizados y por lo tanto podemos identificar genes de expresión temprana y genes de expresión tardía. Entre los marcadores tempranos de

diferenciación miogénica se encuentra MyoD y, un marcador de etapas más tardías de la diferenciación es MHC1 (Yu y Guttridge, 2018; Serratrice, 2009).

Basados en los resultados previos, se decidió estudiar si la vía PLC/PKC ejerce efectos sobre la regulación génica. Para ello, al igual que en los experimentos anteriores, las células RD fueron cultivadas en DMEM acondicionado con 10% SFB y tratadas durante 15 días con los moduladores Neomicina, Bisindolmaleimida y Estaurosporina (Materiales y Métodos). Se observó que los niveles de ARNm de ambos marcadores de diferenciación, aumentaron en presencia de los inhibidores de la vía PLC/PKC (Figura 17).

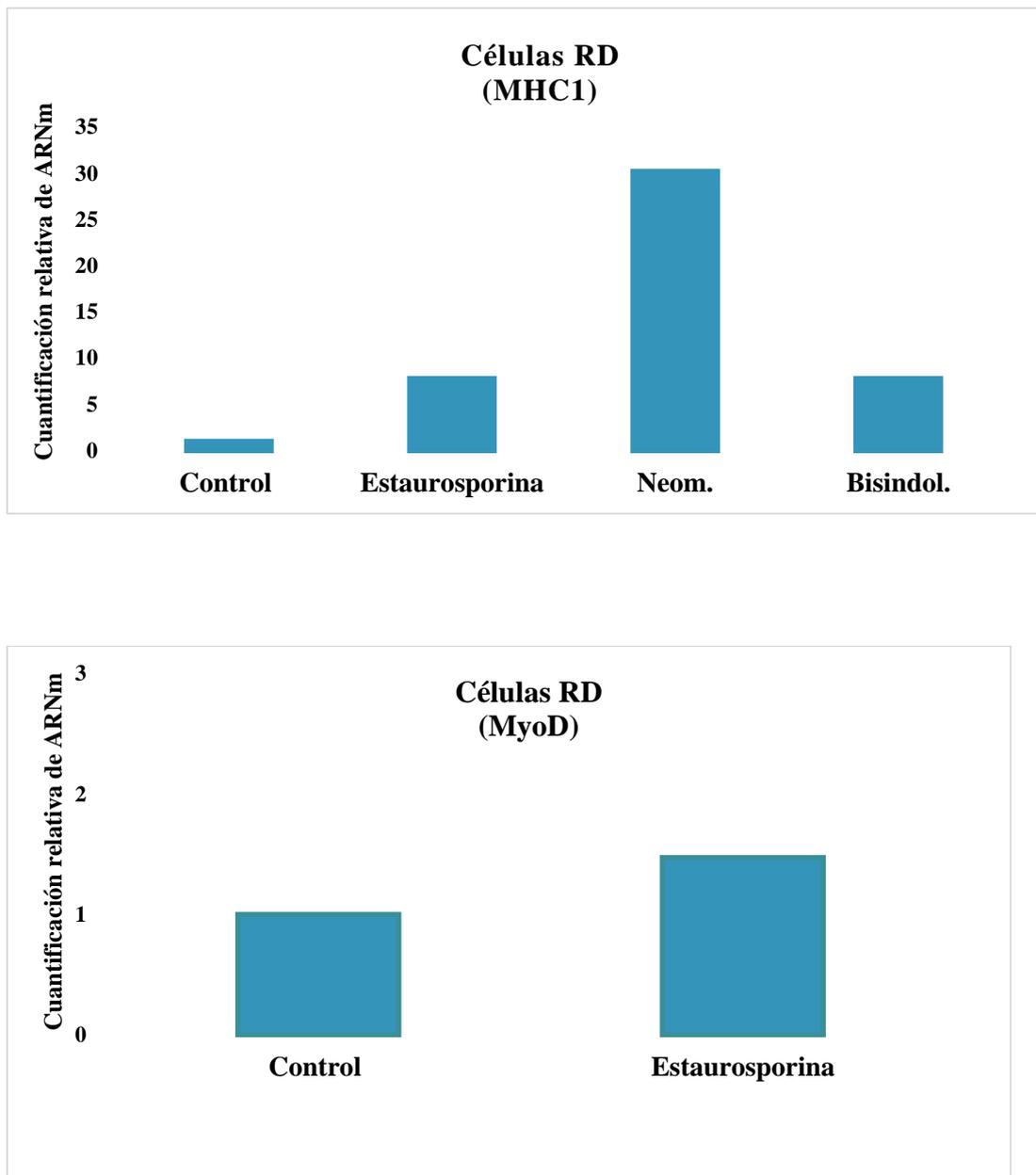


Figura 17. La inhibición de la vía PLC/PKC aumentó la expresión de marcadores de diferenciación miogénica

Las células RD cultivadas con DMEM acondicionado con 10% SFB (Control) y las tratadas con durante 15 días con Neomicina, Bisindolmaleimida y Estauroporina (Materiales y Métodos), se procesaron y las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de qPCR para evaluar los niveles de ARNm de MHCI y MyoD. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo ΔCt fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos representan el promedio de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado.

DISCUSIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, llegando a más de 10 millones de casos por año (National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (online), s.f.). La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, representan el tratamiento estándar contra el cáncer; estas terapias han incrementado notoriamente la supervivencia en el paciente oncológico. Sin embargo, suelen tener un impacto negativo sobre la calidad de vida del paciente (Carneiro y El-Deiry, 2020). Desarrollar terapias que no impacten negativamente en la calidad de vida de los pacientes en y pos tratamiento, es un desafío para la investigación científica. Los avances en genómica y biología molecular han proporcionado una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes del cáncer, lo que ha permitido la identificación de blancos terapéuticos específicos y el desarrollo de terapias dirigidas más efectivas, que no afecten las células sanas y por lo tanto con menos efectos colaterales negativos (revisado en Nobles y Dariel; 2024).

Dado que esta patología puede originarse por múltiples causas, siendo las más comunes alteraciones genéticas, se considera que es una enfermedad irreversible. Si bien esta concepción ya ha perdido vigor y se ha demostrado lo contrario, aún no se conoce el mecanismo molecular involucrado en la reversión de una célula tumoral a una normal (Telerman y Amson, 2009; Kenny y Bissell, 2003). Actualmente, se está afianzando el concepto que uno de los pasos críticos iniciales del desarrollo de un cáncer es la pérdida de diferenciación de las células (Marión y col., 2017). Por lo tanto, inducir la diferenciación de las células cancerosas podría eliminar su capacidad de replicación descontrolada e invasividad, es decir disminuir o eliminar su agresividad.

En el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis de grado se iniciaron estudios para determinar los mecanismos moleculares implicados en el proceso de reversión tumoral. El espíritu del presente trabajo, fue buscar un punto de partida para dicha investigación; intentando determinar en forma general un sistema mensajero (o varios) involucrado/s en el proceso de diferenciación para luego profundizar los estudios.

Utilizando células tumorales RD y estableciendo comparaciones con células de linaje muscular no cancerosas C2C12, se realizaron ensayos con modulares de varias vías de señalización y se investigó cuál/es de ellos inducía características de diferenciación. Así se relacionaría una determinada cascada

de señalización al efecto observado. Concretamente, en una primera instancia, mediante observación microscópica se analizó la morfología de ambas líneas celulares sin ningún tipo de tratamiento. Para luego identificar cambios inducidos por los moduladores. Específicamente, se evaluó cuál/es modulador/es era capaz de inducir las características morfológicas de fibras musculares diferenciadas (células multinucleadas, alargadas y fusionadas, con un crecimiento ordenado donde todas las células siguen una misma dirección longitudinal) y la disminución/desaparición del número de tumores en cultivos de las células RD. En una segunda etapa, con estudios más específicos, se buscó confirmar las vías de señalización implicadas por los moduladores.

Los experimentos realizados en este trabajo de Tesis, sugieren que la Neomicina induce cambios morfológicos en las células RD y C2C12 típicos de diferenciación. A partir de la semana de tratamiento con los distintos moduladores, se observó que la Forskolina y el análogo inactivo de AMPc (Rp-cAMPS) no afectaban el crecimiento de los cultivos celulares, pero las modificaciones morfológicas que inducían no son las características del proceso de diferenciación muscular. Además, los cambios en la morfología celular o en la forma de crecimiento de las células en cultivo, tratadas con estos moduladores, no eran sostenidos en los distintos experimentos; sino más bien respondían a un comportamiento aleatorio. Razón por la cual no se realizaron más ensayos con estos moduladores. Por el contrario, después de una semana de tratamiento con Neomicina, las células C2C12 y RD se observaban alargadas y fusionándose. Mostrando un patrón de crecimiento muy ordenado y siguiendo una misma dirección. Es decir, se observó una morfología similar a la morfología de las células cultivadas con 1% de SFB (control positivo de diferenciación). Asimismo, mediante tinción con DAPI se evidenció que las células se presentaban multinucleadas, producto de la fusión entre ellas. De importancia, los cultivos de células RD tratados con Neomicina presentaron menor tendencia a formar tumores que los controles sin tratar.

El hecho de haber realizado todos los ensayos en presencia de 10% de SFB, nos asegura que los efectos observados se deben al tratamiento específico y no a la disminución del SFB. En los casos que se usaron los moduladores en presencia de 1% de SFB (control positivo de diferenciación), los moduladores no interfirieron con la diferenciación que produce la disminución del suero; son necesarios más estudios para determinar si los moduladores potencian dicho efecto.

La Neomicina es un inhibidor de PLC ampliamente utilizado; se une al PIP₂, inhibiendo la actividad de la enzima (Griffin y col., 1980; Schacht, 1976). Los resultados obtenidos, sugieren que cuando la enzima PLC está inhibida, las células tienden a diferenciarse. La PLC hidroliza al PIP₂ para dar DAG e IP₃, ambos fragmentos pueden actuar como segundos mensajeros. El DAG permanece en la membrana plasmática y activa a la PKC y el IP₃ difunde hacia el citoplasma y se une a canales de calcio, lo que libera Ca²⁺ que posee múltiples *targets* (Figura 4). Por lo tanto, la inhibición de la PLC con Neomicina, en forma indirecta afecta a PKC. Se puede considerar que la inhibición de PKC, también favorecería la diferenciación celular. En concordancia, cuando se utilizó el éster de forbol PMA, análogo

de DAG y potente activador de PKC (efecto contrario a la Neomicina), no se favoreció la diferenciación. De hecho, la activación de PKC con PMA indujo muerte celular en los cultivos de ambas líneas celulares, siendo más susceptibles la línea RD. Si bien la activación de PKC con PMA no favoreció la diferenciación celular, se requieren más estudios para discernir cómo la activación de esta quinasa afecta la viabilidad celular.

Dado que la importancia de este estudio radica en establecer con qué cascada/s de señalización comenzar los futuros estudios que investigarán los mecanismos moleculares que median la reversión de las células tumorales, en los siguientes ensayos que se realizaron para confirmar el rol de la vía PLC/DAG/PKC en el proceso de diferenciación sólo se utilizó la línea celular tumoral RD.

Basados en los resultados obtenidos, se procedió a inhibir específicamente a PKC y observar los efectos. Los cultivos celulares de RD se trataron con Bisindolmaleimida, un inhibidor específico de PKC. Después de 15 a 20 días de tratamiento, las células presentaron las características morfológicas de una célula muscular diferenciada, con un crecimiento ordenado y muy direccionado; y con ausencia de formación de tumores. Estas evidencias sugieren que la vía PLC/PKC juega un rol en el mantenimiento del fenotipo desdiferenciado de las células tumorales de RMS, puesto que la inhibición de esta vía indujo diferenciación.

Los efectos de la PKC podrían ser modulados por variaciones en los niveles de calcio intracelular o por la acción de fosfatasas. De una forma general se investigó si en presencia de moduladores para fosfatasas y para el ion calcio se observaban cambios en la diferenciación inducida por el uso de Neomicina. Los ensayos realizados con de los moduladores Thapsigargina, ATP y Caliculina A en combinación con Neomicina en las células RD, no mostraron cambios significativos en la morfología celular que sugirieran la inducción de diferenciación. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes y se requieren más estudios sobre este aspecto.

Como se describe en la Introducción, una característica de las células tumorales de RMS es la alta expresión de Integrina $\alpha 9$, proteína relacionada con la agresividad del tumor. Mediante ensayos de inmunocitoquímica, observamos que tanto la inhibición de PLC como la de PKC, disminuyen la expresión de Integrina $\alpha 9$.

Finalmente, las observaciones descritas en este trabajo de Tesis adquieren mayor certeza con los ensayos de qPCR, que indican que la vía PLC/PKC está involucrada en la regulación génica de MyoD y MHCI. Durante la miogénesis, el proceso de diferenciación está regulado por la inducción o represión de factores de transcripción. Estos se encuentran altamente organizados y por lo tanto podemos identificar genes de expresión temprana y genes de expresión tardía. Entre los marcadores tempranos de diferenciación miogénica se encuentra MyoD y, un marcador de etapas más tardías de la diferenciación es MHCI. Se observó que cuando la vía PLC/PKC era inhibida con Neomicina, Bisindolmaleimida o

Estauroporina, la expresión de marcadores clásicos de diferenciación muscular aumenta, confirmando que dicha cascada de señalización está implicada en el mantenimiento del fenotipo desdiferenciado.

Este trabajo de Tesis, cumplió con el objetivo de plantear un punto de partida para las futuras investigaciones que esclarecerán los mecanismos moleculares subyacentes a procesos de reversión en células tumorales.

FORMACIÓN ADQUIRIDA DURANTE ESTE TRABAJO DE TESIS

Familiarización con técnicas de cultivo celular

-Preparación del material para cultivo: Preparación de medios de cultivo: medios con y sin suero, métodos de filtrado, manejo del autoclave y preparación del material de cultivo para autoclavar, tiempos de esterilización de cada material, preparación de tripsina de manera estéril por filtración con jeringas, conocimiento de los distintos materiales plásticos para cultivo y cuáles son sus usos (cajas de Petri, flasks, vidrios para inmunocitoquímica, pipetas, tips estériles).

-Cultivo celular: técnica para el descongelado y congelado de las células, reconocimiento de la densidad celular, técnica de repique y cultivo celular en distintos tipos de cajas de Petri.

Entrenamiento en los tratamientos de los cultivos celulares con distintos moduladores

-Concepto de dosis/respuesta, vehículo de las distintas drogas, especificidad de las drogas (IC50).

Manejo de un microscopio óptico de fluorescencia convencional

-Reconocimiento de las distintas partes del MO y los distintos filtros.

-Manejo de los filtros para cada fluoróforo, de la cámara digital y del programa para la adquisición de imágenes.

-Observación de las células normales y diferenciadas durante los tratamientos.

-Tinción de las organelas con distintos fluoróforos y posterior montaje de las muestras para su observación al MO.

-Reconocimiento de las distintas morfologías que adquieren las células según los tratamientos, específicamente los cambios en la arquitectura de los núcleos y las mitocondrias.

Entrenamiento en técnicas básicas de biología molecular

-Preparación del material y esterilización.

-Normas generales de trabajo, cuidados para evitar la contaminación cruzada, separación de material a usarse para ARN, ADNc o qPCR. Manejo de los elementos y el espacio de trabajo.

- Empleo de kits para el aislamiento de ARN total. Reconocimiento de los distintos reactivos, enzimas y su función.

-Cuantificación del ARN: longitud de onda y picos de absorción de los ácidos nucleicos, fórmulas para calcular la concentración de ARN y empleo de cubas de cuarzo.

- Reconocimiento de un espectrofotómetro, su funcionamiento y los programas de cuantificación de ácidos nucleicos.

-Obtención de los valores de DO, el cociente y la cuantificación. Determinación de la integridad y la calidad de los ácidos nucleicos en general.

-Empleo de *kits* para convertir el ARN a ADNc. Reconocimiento de los distintos reactivos, enzimas modificadas genéticamente y su función.

- Manejo básico y programación de un ciclador convencional para las reacciones de transcripción reversa.

-Cuantificación de ADN de hebra simple (ADNc).

-Condiciones generales de almacenamiento de los ácidos nucleicos.

-Reconocimiento del equipo de Real Time PCR, material plástico, reactivos y *kits* (enzimas modificadas genéticamente y soluciones).

Entrenamiento en presentación de datos experimentales y escritura de un trabajo científico

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arcamone, G., Gimenez, C., Pereira, A., Reyes, J., Gómez, M., Mota, D., y Barroeta, C. (2007). Rabdomyosarcoma en niños. *Revista Venezolana de Oncología*, 19(1), 63-70.

Askanazy, M. (1907). Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid. *Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft*, 11, 39-82.

Beavon, I. (2000). The E-cadherin–catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *European journal of cancer*, 36 (13), 1607-1620.

Boland, R., Vasconsuelo, A., Milanesi, L., Ronda, A. y de Boland, A. (2008). 17 β -Estradiol signaling in skeletal muscle cells and its relationship to apoptosis. *Steroids* 73 (9-10), 859-863.

Carneiro, B. y El-Deiry, W. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.

Desgrosellier, J. y Cheresh, D. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cáncer*, 10 (1), 9-22. doi: 10.1038/nrc2748

Florini, J., Ewton, D. y Magri, K. (1991). Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annual review of physiology*, 53(1), 201-216.

Fujita, H., Endo, A., Shimizu, K., y Nagamori, E. (2010). Evaluation of serum-free differentiation conditions for C2C12 myoblast cells assessed as to active tension generation capability. *Biotechnology and bioengineering*, 107(5), 894-901.

Gili, V., Pardo, V, Ronda, A., De Genaro, P., Bachmann, H., Boland, R. y de Boland, A. (2016). In vitro effects of 1,25(OH)₂D₃-glycosides from Solbone (*Solanum glaucophyllum* leaves extract; Herbonis AG) compared to synthetic 1,25(OH)₂D₃ on myogenesis. *Steroids*, 109, 7-15.

Griffin, H.D., Sykes, M., y Hawthorne, J.N. (1980). Effects of neomycin on calcium and polyphosphoinositide metabolism of guinea pig synaptosomes. *J. Neurochem.* 34, 750-752.

Hanahan, D. y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. y Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417

Hynes, N., Ingham, P., Lim, W., Marshall, C., Massague, J. y Pawson, T. (2013). Signalling change: signal transduction through the decades. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(6), 393-398.

Kenny, P. y Bissell, M. (2003). Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *International journal of cancer*, 107(5), 688-695.

La Colla, A., Pronsato, L., Ronda, A., Milanesi, L., Vasconsuelo, A. y Boland, R. (2014). 17β-Estradiol and Testosterone Protect Mitochondria Against Oxidative Stress In Skeletal Muscle Cells. *Actual. Osteol*, 10 (2), 122-135.

La Colla, A. (2015). 17β-estradiol promueve la sobrevivencia del músculo esquelético: mitocondria como blanco estrogénico, acción antipoptótica y vías de señalización intracelular. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional del Sur].

La Colla, A., Boland, R., y Vasconsuelo, A. (2015). 17β -Estradiol abrogates apoptosis inhibiting PKC δ , JNK, and p66Shc activation in C2C12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116 (7), 1454-1465.

La Colla, A., Pronsato, L., Milanesi, L. y Vasconsuelo, A. (2015b). 17β -Estradiol and testosterone in sarcopenia: Role of satellite cells. *Ageing Res Rev.*, 24, 166-177.

La Colla, A., Vasconsuelo, A., Milanesi, L. y Pronsato, L. (2017). 17β -Estradiol Protects Skeletal Myoblasts from Apoptosis Through p53, Bcl-2, and FoxO Families. *J. Cell. Biochem.*, 118 (1), 104-115.

Marión, R. M., López de Silanes, I., Mosteiro, L., Gamache, B., Abad, M., Guerra, C., Megías, D., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2017). Common Telomere Changes during *In Vivo* Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis. *Stem cell reports*, 8 (2), 460–475. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.001>

Masià Fontana, A. (2013). El papel de la vía Notch en Rbdomiosarcoma. [Tesis de doctorado, Universitat de Barcelona].

Mayoral Chávez, M., Zenteno Galindo, E., Espinosa Mancilla, B., Martínez Cairo, S., y Guevara Fonseca, J. (2004). Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(4), 283-292.

Milanesi, L., de Boland, A. y Boland, R. (2008). Expression and localization of estrogen receptor alpha in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104 (4), 1254-1273.

Milanesi, L., Vasconsuelo, A., de Boland, A. y Boland, R. (2009). Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*, 74 (6), 489-497.

Mauro, A., Ciccarelli, C., De Cesaris, P., Scoglio, A., Bouché, M., Molinaro, M., y Zani, B. (2002). PKC α -mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci*, 115 (18), 3587-3599.

Musso, F., Lincor, D., Vasconsuelo, A., Pronsato, L., Faraoni, B. y Milanesi, L. (2019). Adverse Effects in Skeletal Muscle Following the Medicinal Use of *Nicotiana glauca*. *Biol. Pharm. Bull*, 42 (5), 671-679.

National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (online). Disponible en: <http://www.cancer.gov>.

Pelegrín Nobles, L. y González Dariel, M. (2024). Avances en el conocimiento y tratamiento del cáncer pediátrico. OncoSan 2024.

Pronsato, L., Boland, R. y Milanesi, L. (2012). Testosterone exerts antiapoptotic effects against H2O2 in C2C12 skeletal muscle cells through the apoptotic intrinsic pathway. *JOE*, 212 (3), 371.

Pronsato, L., La Colla, A., Ronda, A., Milanesi, L., Boland, R. y Vasconsuelo, A. (2013a). High passage numbers induce resistance to apoptosis in C2C12 muscle cells. *Biocell*, 37 (1), 1-9.

Pronsato, L., Boland, R. y Milanesi, L. (2013b). Non-classical localization of androgen receptor in the C2C12 skeletal muscle cell line. *Arch Biochem Biophys*, 530 (1), 13-22.

Pronsato, L. y Milanesi, L. (2016). Effect of testosterone on the regulation of p53 and p66Shc during oxidative stress damage in C2C12 cells. *Steroids*, 106, 41-54.

Pronsato, L., Milanesi, L., Vasconsuelo, A. y La Colla, A. (2017). Testosterone modulates FoxO3a and p53-related genes to protect C2C12 skeletal muscle cells against apoptosis. *Steroids*, 124, 35-45.

Pronsato, L., Milanesi, L. y Vasconsuelo, A. (2020). Testosterone induces up-regulation of mitochondrial gene expression in murine C2C12 skeletal muscle cells accompanied by an increase of nuclear respiratory factor-1 and its downstream effectors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 500, 1-42.

Roma, J., Masià, A., Reventós, J., Sánchez de Toledo, J. y Gallego, S. (2011). Notch Pathway Inhibition Significantly Reduces Rhabdomyosarcoma Invasiveness and Mobility *In Vitro*. *Clinical Cancer Research*, 17 (3), 505-513.

Rosicler Salas, S. (2017). Niveles de expresión de genes pro y antiapoptóticos en células musculares esqueléticas C2C12 tratadas con extractos lipídicos de *Nicotiana glauca*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Sur].

Rovira, S. y Clemente, E. (2016). Rbdomiosarcoma infantil. *Radiología*, 58 (6), 481-490.

Schacht, J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J. Neurochem.* 27, 1119-1124.

Sun, X., Guo, W., Shen, J., Mankin, H., Hornicek, F. y Duan, Z. (2015). Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*, 2015. 232010.

Vasconsuelo, A., Milanesi, L. y Boland, R. (2008). 17 β -Estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol*, 196 (2), 385-397.

Weinberg, R.A. y Hanahan, D. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.

Yu, P. Y., y Guttridge, D. (2018). Dysregulated Myogenesis in Rhabdomyosarcoma. In *Current Topics in Developmental Biology*. 126, 285–297. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.007>