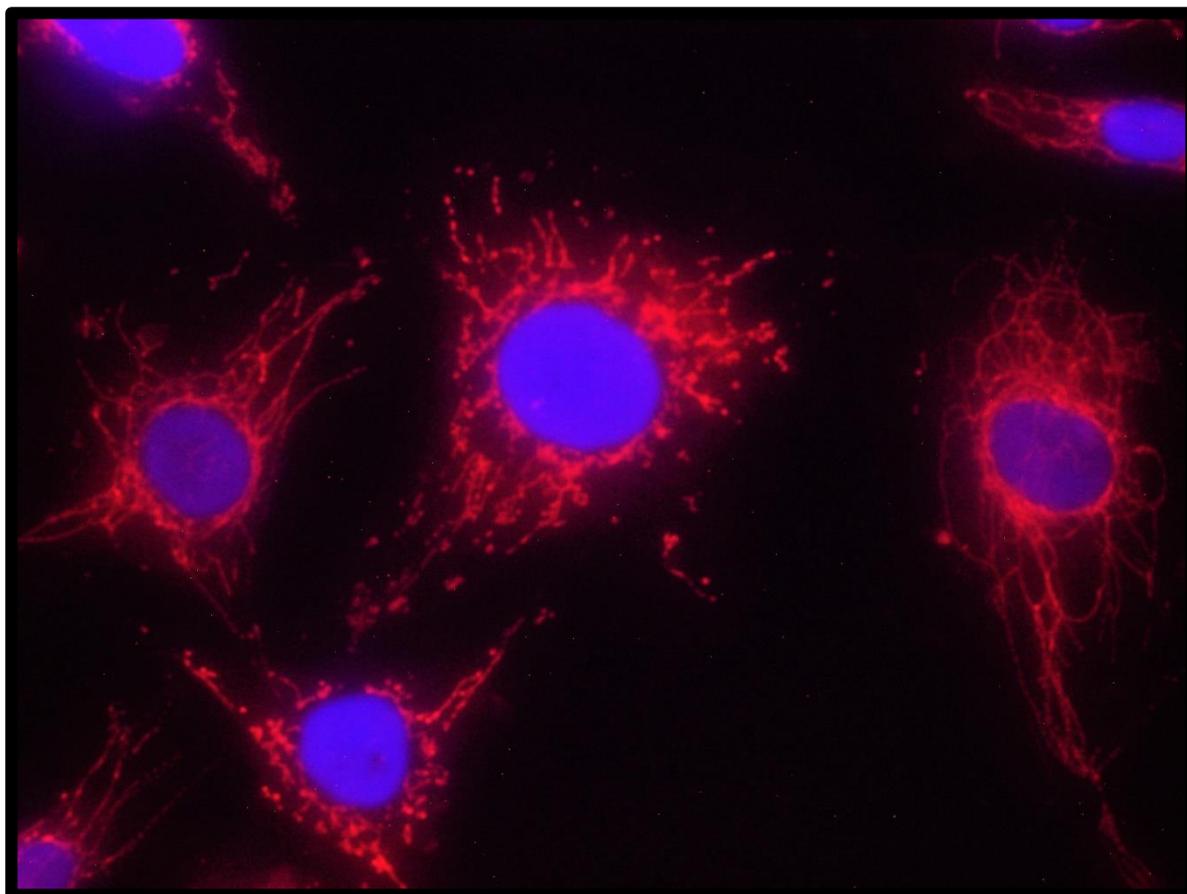




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas



Valeria Toledo

Bahía Blanca

2022

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento:

- *A mi Directora Dra. Lucía Pronsato y Co-Directora Dra. Lorena Milanesi, por acompañarme en la realización de mi tesis de grado con paciencia y dedicación, brindándome las herramientas y el conocimiento necesario para poder realizarla.*
- *A la Dra. Natalia Stefanazzi por desempeñarse como mi Profesora Consejera, en el último tramo de la carrera.*
- *Al grupo del Laboratorio de Química Biológica y Biología del Desarrollo por brindarme un espacio donde prevaleció el compañerismo, el respeto y la buena onda.*
- *A la Universidad Nacional del Sur, por permitirme estudiar una carrera de grado y brindarme los conocimientos y herramientas para la formación profesional.*
- *A mis familiares y amigos, por la paciencia y apoyo incondicional que hizo posible finalizar esta etapa tan importante.*



Los extractos liposolubles obtenidos de *Nicotiana glauca* inducen la muerte celular por apoptosis en las células de rhabdomyosarcoma

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tesista: Valeria Toledo

Directora: Lucía Pronsato

Co-directora: Lorena M. Milanesi

Alumna

Valeria Toledo

Directora

Lucía Pronsato

Co-directora

Lorena M. Milanesi

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

INBIOSUR-UNS-CONICET

Bahía Blanca-2022

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
MODELO EXPERIMENTAL	11
CULTIVOS CELULARES	11
RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EJEMPLARES DE N. <i>GLAUCA</i>	12
AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN LIPOSOLUBLE Y LA SUBFRACCIÓN HEXÁNICA.....	12
TRATAMIENTOS CELULARES.....	13
MARCACIÓN DE ORGANELAS	14
INMUNOCITOQUÍMICA	16
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONVENCIONAL	16
ENSAYO DEL CIERRE DE LA HERIDA.....	17
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	17
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	18
WESTERN BLOT	18
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN.....	31
REFERENCIAS.....	40

Los extractos liposolubles obtenidos de *Nicotiana glauca* inducen la muerte celular por apoptosis en las células de rhabdomyosarcoma

Introducción

La apoptosis es un proceso activo en el músculo esquelético normal durante el ejercicio intenso o en patologías como la distrofia muscular, la denervación muscular y en general, en miopatías y sarcopenias. Estas patologías suelen relacionarse con la acumulación de mitocondrias defectuosas (Wanagat et al., 2001) o con la disminución de la capacidad oxidativa del músculo por disfunción mitocondrial (Conley et al., 2000). El Laboratorio de Química Biológica y Biología del Desarrollo donde se desarrolló esta tesis de grado, se encuentra trabajando hace más de quince años con la línea celular muscular esquelética murina C2C12; estas células se comportan como las células satélites que reparan la fibra muscular esquelética. El grupo de trabajo ha demostrado que el agua oxigenada (H₂O₂) induce la activación de la apoptosis en esta línea celular, observando los cambios morfológicos típicos (**Figura 1**); y han caracterizado parte de la ruta apoptótica que es activada durante la apoptosis (proteínas de las cascadas, factores de transcripción y genes regulados) y la reducción de estos efectos por el tratamiento con 17β-estradiol (E2) o Testosterona (Boland et al., 2008; Pronsato et al., 2012, Pronsato et al., 2013 a y b; La Colla et al., 2014; La Colla et al., 2015 a y b; La Colla, tesis doctoral 2015; Pronsato y Milanesi, 2016; La Colla et al., 2017; Pronsato et al., 2017, Pronsato et al., 2020).

Trabajos del grupo también han demostrado que en las células C2C12 los extractos liposolubles de *Nicotiana glauca* inducen apoptosis, involucrando la activación de caspasas y la regulación de la expresión génica de proteínas pro y anti apoptóticas; no así el extracto acuoso, que no tiene efecto alguno en las células. (Musso et al, 2017; Salas, Sabrina; tesis de grado, 2017; Lincor, Darío, Tesis doctoral en desarrollo).

Mediante *Real time*-PCR el grupo de trabajo donde se desarrolló esta tesis de grado, observó en las células C2C12 que el tratamiento con el extracto liposoluble de *N. glauca* aumenta la expresión de los genes apoptóticos PERP y PUMA y reduce la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico). Resultados preliminares demostraron que el extracto y el subextracto hexánico inducen apoptosis también en la línea RD (**Figura 2**) siendo este efecto de muerte

celular mayor o más agresivo, en esta línea respecto de la línea C2C12 (eliminando, finalmente, todas las células del cultivo luego de 3hs de exposición) (Musso *et al.*, 2019, Musso *et al.*, 2019).

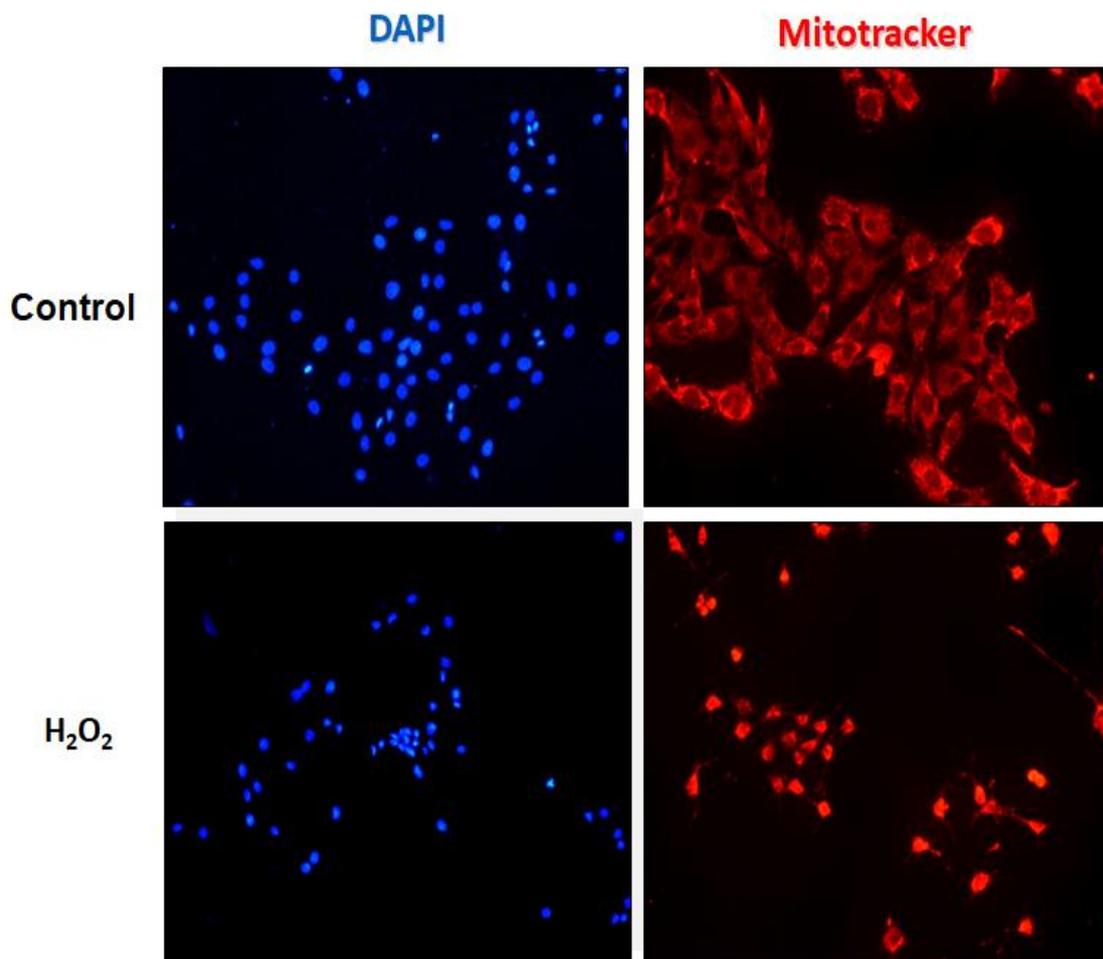


Figura 1: Células C2C12 inducidas a apoptosis con H₂O₂. Se observan los cambios morfológicos típicos que ocurren durante la apoptosis respecto a las células control: núcleos picrotónicos y cambios en la morfología y distribución mitocondrial. **DAPI:** tinción con DAPI: marcación nuclear. **Mitotracker:** tinción con *MTT red*: marcación mitocondrial. Amplificación 40X.

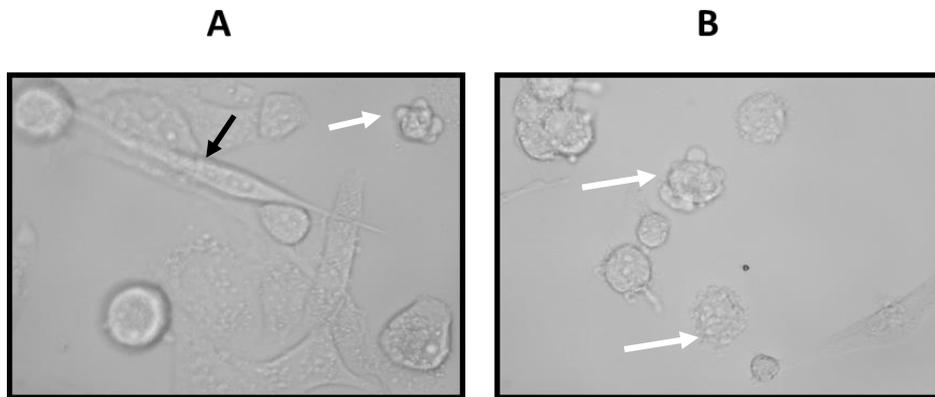


Figura 2: Células RD inducidas a apoptosis con el extracto liposoluble. A: se observan células con morfología normal (flecha negra) y células con morfología apoptótica (flecha blanca) **B:** células RD apoptóticas donde se observan claramente la formación de las vesículas apoptóticas (flechas blancas). Amplificación: 60X.

El cáncer es la segunda causa de muerte infantil y aproximadamente dos tercios de los niños con cáncer son diagnosticados con rabdomiosarcoma (RMS) específicamente el tipo embrionario (RMSe). El RMS es el tumor maligno de los tejidos blandos más frecuente en niños y adolescentes (Young *et al.*, 1986). Los pacientes con enfermedad metastásica primaria o recaída son, en gran medida, resistentes a los tratamientos y tienen una baja oportunidad de curación. Es un tumor de células pequeñas de los tejidos blandos que está formado por células mesenquimales en distintos estadios de diferenciación muscular, con tendencia a diferenciarse a músculo estriado, dado que su origen es una disrupción en la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células precursoras de la miogénesis (Hettmer y Wagers, 2010) (**Figura 3**).

Existen distintos tipos histológicos de RMS:

- El **Rabdomiosarcoma embrionario** (RMSe, RD), que se presenta en el 60% de los diagnósticos de RMS, está formado por células mesenquimales en distintos estadios de diferenciación muscular.
- El **Rabdomosarcoma alveolar** (RMSa) que se presenta en el 20% - 25% de los diagnósticos de RMS, las células tienden a ser más pequeñas y redondeadas que las células del RMSe, semejantes a los alveolos pulmonares. Este tipo es más agresivo y con peor pronóstico que el RMSe.

Otros tipos de RMS con menor porcentaje de incidencia son:

-El **Rabdomiosarcoma pleiomórfico**, que se detecta en individuos mayores de 25 años y corresponde al 8% de los RMS con pronóstico desfavorable semejante al RMSa.

-Los **sarcomas indiferenciados** (11% de los casos de RMS y con pronóstico desfavorable) y los **sarcomas no clasificables** (5-10% de los casos en niños), que no pueden ser tipificados o categorizados de manera definitiva ya que no cumplen con ninguna característica de los anteriores. Suelen tener un mal pronóstico.

En cuanto a las características inmunoquímicas del RMSe (RD), se ha observado que las células presentan:

-Localización nuclear de β -catenina (además de la típica localización citosólica y próxima a membrana).

-Expresan altos niveles de cadherina-N e integrina α -9, ambas reguladas positivamente por la vía Notch, favoreciendo esto la movilidad, invasión, agresión y mantenimiento del estado indiferenciado de las células tumorales (Fontana, Anna Masiá; tesis doctoral; 2013).

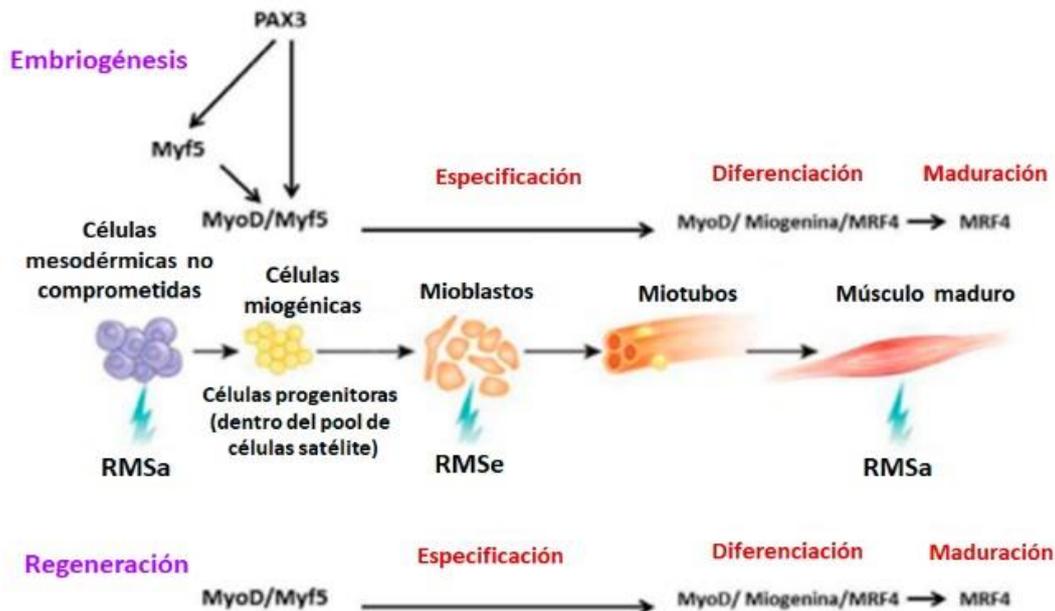


Figura 3: Posibles orígenes embrionarios del rabdomiosarcoma. RMSa: rabdomiosarcoma alveolar: es el tipo más agresivo de RMS, con Células redondeadas, de muy pequeño tamaño, semejantes a los alveolos pulmonares. RMSe: rabdomiosarcoma embrionario: células con distintas morfologías (redondeadas, estrelladas, alargadas, algunas pueden verse multinucleadas), este RMS en general es menos agresivo y con mejor pronóstico que el RMSa.

Se establecieron principios generales que gobiernan la transformación de una célula normal a maligna (células que tienden a proliferar descontroladamente y, en algunos casos, metastatizar; National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information, on line, 2017).

La célula va adquiriendo capacidades biológicas distintivas, conocidas como “sellos”, que le permiten establecer un tumor y diseminarse (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011). Estas capacidades son: 1) activación y mantenimiento de señales proliferativas, 2) evasión de señales supresoras del crecimiento, 3) resistencia a la muerte celular, 4) 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, necesario para soportar la continua proliferación celular y 8) evasión del ataque y destrucción por parte del sistema inmune.

Existen características facilitadoras de la adquisición de los sellos del cáncer, una es la inestabilidad genómica y la mutación de las células neoplásicas, fuente creadora de las variantes genéticas responsables de las distintas capacidades. Otra característica facilitadora es la inflamación, estado que aporta al microambiente tumoral moléculas bioactivas (Hanahan y Weinberg, 2011).

En base a estos resultados se diseñaron los objetivos a seguir, para evaluar qué capacidades de las células RD son afectadas por los extractos obtenidos de *Nicotiana glauca* (viabilidad, replicación, migración, expresión y/o localización subcelular de proteínas clave para los procesos de invasión, metástasis y apoptosis).

Objetivos

Como objetivo general de este plan de tesis se propuso:

Estudiar la acción apoptótica de los extractos obtenidos de *Nicotiana glauca* en la línea celular de rhabdomyosarcoma embrionario humano, RD, identificando los mecanismos celulares y moleculares responsables del efecto.

Los objetivos específicos fueron:

Estudiar el efecto de los extractos (el extracto liposoluble y el subextracto hexánico) sobre las capacidades y propiedades tumorales, específicamente: los mecanismos relacionados con la división celular, migración/invasión y apoptosis:

- Cambios en la morfología/distribución mitocondrial y morfología nuclear.
- Cambios en las capacidades de división celular y migración.
- Localización subcelular de β -catenina,
- Translocación nuclear del fragmento intracelular de Notch 1.
- Activación de caspasas.

Materiales y métodos

Modelo experimental

Células RD (CCL-136™) *American Type Culture Collection (ATCC®)*. Línea celular de rhabdomiosarcoma embrionario primario derivadas del linaje muscular, hiperploides, susceptible a infección viral, de un individuo de siete años de sexo femenino.

Cultivos celulares

Las células RD (**Figura 4**) fueron cultivadas en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco), sin rojo fenol, suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (30 min, 56 °C), 1% de nistatina y 2% de estreptomycin y penicilina. Las células crecieron a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 94,5% aire / 5,5% CO₂. Los cultivos se repicaron cuando superaron el 80% de confluencia o, en el caso que no fuera necesario el repique, se suplementó con medio fresco cada 72hs.

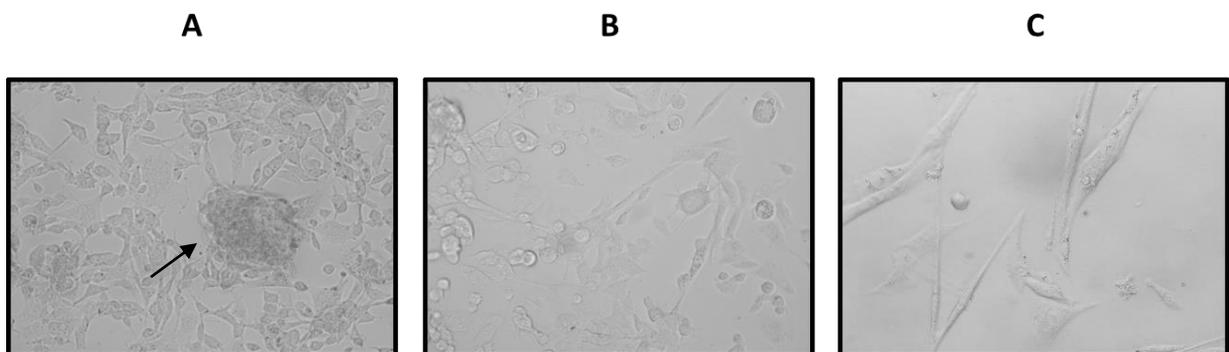


Figura 4: Células RD. A: Magnificación 10X (la flecha indica un tumor en desarrollo). **B:** Magnificación 20X. **C:** Magnificación 40X.

Características generales de la especie usada en los ensayos: *Nicotiana glauca* sp.

Nicotiana glauca (*N. glauca*) Graham (**Figura 5**), (Solanaceae, nv: Palan palán, especie cosmopolita de origen sudamericano) es una planta arbustiva, rústica, con rápido crecimiento y de distribución ubicua que no necesita grandes exigencias en cuanto a requerimientos de

cultivo. Esta planta está ampliamente naturalizada en taludes, terraplenes, márgenes de caminos, terrazas de ríos, con crecimiento, preferentemente, en arenales o sobre suelos rocosos o pedregosos y removidos. Tolerancia los climas áridos y semiáridos, se comporta como pionera en ecosistemas perturbados, y ha sido y es utilizada frecuentemente como modelo experimental generando abundante información bioquímica y molecular. Además de producir una gran cantidad de alcaloides que actúan como repelentes de herbívoros, es productora de bioetanol y de aceite, con propiedades insecticidas y aptos para la producción de biodiesel.

Recolección y mantenimiento de los ejemplares de *N. glauca*

Los ejemplares fueron colectados en la ciudad de Bahía Blanca y mantenidos en el invernáculo del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS).

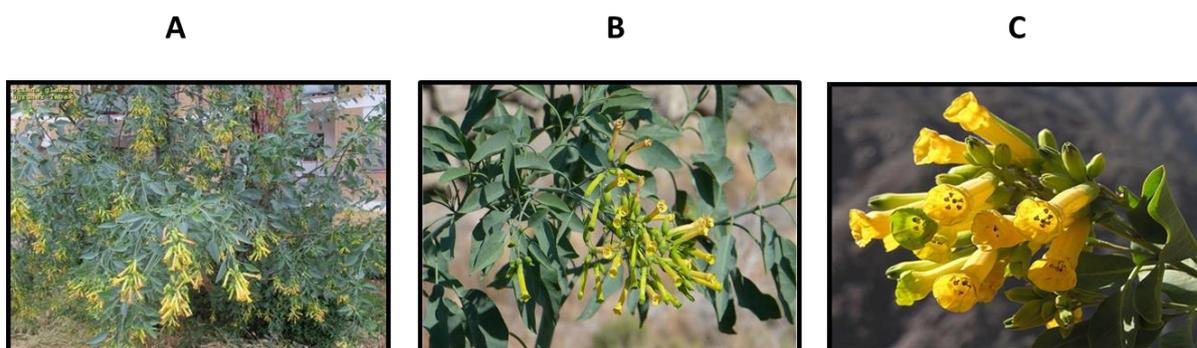


Figura 5: A: *N. glauca*. B: detalle de sus hojas. C: detalle de sus flores.

Aislamiento del extracto liposoluble y el subextracto hexánico

Aislamiento del extracto liposoluble: El extracto liposoluble se aisló siguiendo el método de Bligh & Dyer (1959). Se colectaron las hojas (5 grs / aislamiento), se lavaron con agua bidestilada y luego se congelaron con nitrógeno líquido para lograr triturar el tejido hasta obtener una consistencia harinosa. Posteriormente, se homogenizaron con cloroformo-metanol (1:2 v/v) en una proporción de 3 ml/gr de tejido, durante dos minutos. Se realizaron dos etapas más de homogeneización. La primera durante 30 segundos con cloroformo, y la segunda el mismo tiempo agregando agua bidestilada (1,2 ml/gr de tejido en cada caso). El homogenado final se centrifugó durante 20 min, a 10.000 rpm (4.300 x g) en centrífuga Sorvall

refrigerada (rotor SM-24) a 8 °C. Se colectó la fase inferior liposoluble y se evaporaron bajo una corriente constante de N₂ a 35 °C quedando finalmente un polvo seco que se pesa, se fracciona y se guarda a -70 °C hasta su uso. Para los ensayos posteriores estos extractos se resuspendieron en isopropanol. **Preparación del extracto:** el extracto, 0,1 mg de polvo seco, se resuspendió en 500 µl de isopropanol (stock). Preparación de la dilución: 1 µl del stock se resuspendió en 1000 µl de DMEM sin suero (1:1000) y de esta primera dilución se preparó la dilución final: 1:1000 en medio DMEM sin suero (Milanesi *et al.*, 2001; Milanesi y Boland, 2004; Milanesi y Boland, 2006, Musso *et al.*, 2019).

Obtención del subextracto hexánico: El extracto liposoluble obtenido de la planta fue particionado sucesivamente con los siguientes solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo y etil acetato. Las soluciones extraídas, que fueron 3 y a las que llamamos subextractos: hexánico, clorofórmico y etil acetato, estos se evaporaron bajo presión reducida y se liofilizaron; luego se resuspendieron en isopropanol y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

De estos subextractos se seleccionó aquel con mayor capacidad de inducir la apoptosis (determinado en los cultivos celulares mediante la técnica de *Túnel* y en base, también, a los cambios inducidos en la morfología celular, visualizados mediante la tinción con DAPI, Mitotracker y faloidina). El subextracto hexánico fue el seleccionado debido a su mayor capacidad apoptótica (Musso *et al.*, 2019).

Tratamientos celulares

Las células fueron incubadas en medio DMEM sin suero fetal bovino durante 20 minutos. La ausencia de suero permite sincronizar las células en un estado basal (Pronsato *et al.*, 2012). Luego de esta preincubación de 20 minutos, se procedió al agregado de los extractos (el extracto liposoluble o el subextracto hexánico; respetando el porcentaje final de isopropanol en el medio de cultivo, igual o menor a 0,0001%, preparados como se describió previamente). En paralelo las células fueron tratadas con DMEM sin suero y el vehículo de los extractos (isopropanol 0,0001 %, condición nombrada como control), o expuestas a 1 mM de H₂O₂ disuelta en DMEM sin suero (este tratamiento se usa como control de la inducción de la apoptosis). Los tratamientos se realizaron durante 1 a 2 horas en la cámara de cultivo (a 37 °C

bajo atmósfera húmeda de 94,5% aire / 5,5% CO₂). Para los distintos ensayos las células se cultivaron en cajas de Petri para cultivo en monocapa, estériles.

Marcación de organelas

Las células se cultivaron en cajas de Petri de 35 mm de diámetro, con cubreobjetos en la base, para que crezcan sobre éstos. Cuando alcanzaron 70% de confluencia, aproximadamente, se realizaron los distintos tratamientos. Luego, las células fueron marcadas con *Mitotracker Red* (marcador de mitocondrias funcionales) y posteriormente fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C durante 20 minutos. Luego de 3 lavados con buffer PBS 1X (200 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 80 mM Na₂HPO₄, pH: 7,4) para eliminar los restos de metanol, se procedió a la tinción de los núcleos con DAPI. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (*NIKON Eclipse Ti-S*) equipado con filtros adecuados.

- **Tinción mitocondrial con *Mitotracker red*:**

El *Mitotracker (MTT)* es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de la mitocondria. Cuando la sonda ingresa a la célula, se encuentra en su forma reducida y no

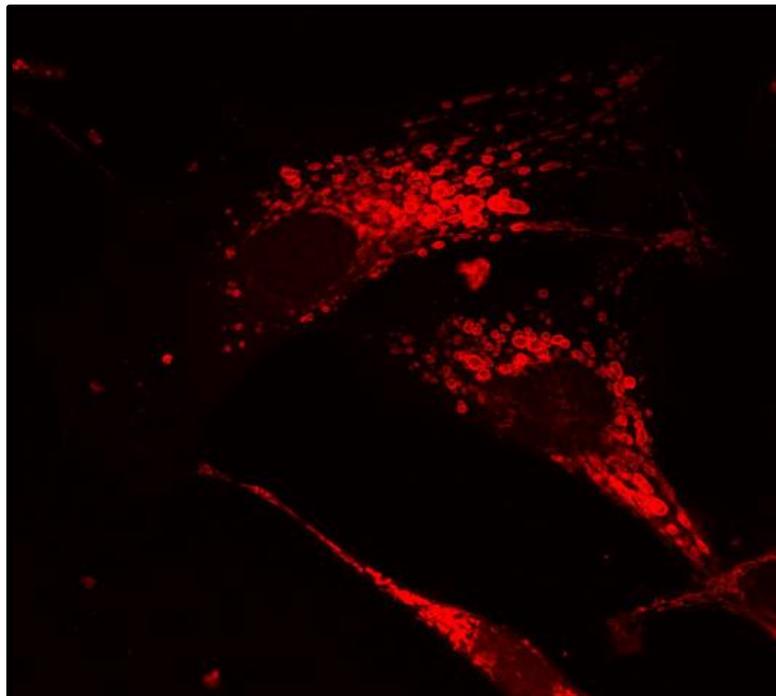


Figura 6: Imagen de Microscopía confocal de células C2C12 teñidas con MTT red. Magnificación 60X.

fluorescente. Dentro de una célula que respira activamente, es oxidado en la mitocondria y pasa a la forma fluorescente, reaccionando con los grupos tioles de las proteínas mitocondriales, formando entonces, una unión covalente, específica e irreversible. De esta manera las mitocondrias funcionales quedan marcadas, mientras que el resto de las estructuras celulares no (**Figura 6**).

Las células cultivadas sobre cubreobjetos hasta un 60-70% de confluencia, fueron incubadas en medio DMEM sin suero con *MTT Red* en una concentración final de 1 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ (1:10000, preparado en medio DMEM sin suero) durante 30 minutos a 37 °C [el stock de *MTT Red* (1 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) se encuentra disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y almacenado a -20 °C]. Luego las células fueron lavadas con PBS durante 15 minutos y fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C durante 20 minutos, siempre resguardándolas de la luz.

- **Tinción nuclear con DAPI**

El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN (**Figura 7**).

Cuando el DAPI se une al ADN bicatenario, su máximo de absorción es a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461 nm (azul). Por lo tanto, en la microscopía de fluorescencia este colorante es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian. El DAPI también puede unirse al ARN. Sin embargo,

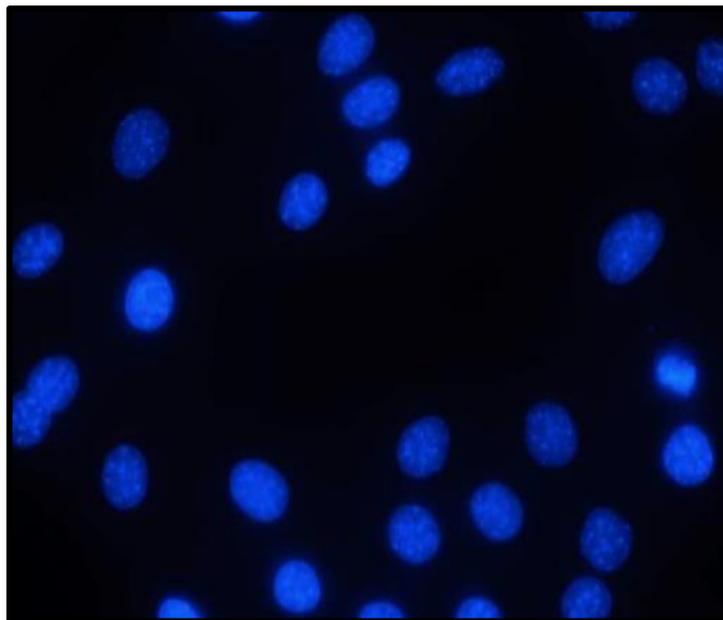


Figura 7: Imagen de Microscopía confocal de células C2C12 teñidas con DAPI. Magnificación 60X.

aunque su pico de emisión es bastante amplio, no es tan fluorescente. Su emisión se desplaza alrededor de 500 nm cuando se une al ARN y es por esta razón que los nucléolos, ricos en ARN ribosómico, logran distinguirse.

El colorante DAPI puede pasar a través de la membrana celular y por eso se utiliza para teñir células vivas, sin embargo, lo hace de una manera poco eficiente y debido a esto, la eficacia de la señal fluorescente es menor. Por esta razón los mejores resultados se obtienen tiñendo las células luego de ser fijadas y permeabilizadas.

Luego de la realización de los tratamientos correspondientes, las células cultivadas sobre cubreobjetos y ya teñidas con MTT *Red*, fueron fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS. A continuación, las células se incubaron con una dilución 1:500 en PBS, de una solución stock de DAPI, (5 mg/ml de PBS), durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación suave. Luego de 3 lavados con PBS durante 15 minutos, los cubreobjetos se montaron con glicerol 95% disuelto en PBS, pH: 7,4, y las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia convencional.

Inmunocitoquímica

Las células se sembraron sobre cubreobjetos contenidos en placas de 35 mm y se hicieron crecer hasta un 70% de confluencia. Luego de los tratamientos, se lavaron con PBS 1X y se fijaron y permeabilizaron con metanol frío a -20 °C durante 20 minutos. Los sitios no-específicos de ligado a proteínas se bloquearon con 5% de albúmina bovina en PBS 1X (30 min). Luego se incubaron durante toda la noche en presencia o ausencia (control negativo) del anticuerpo primario, se realizaron varios lavados y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo correspondiente. Finalmente se preparan para su visualización (Milanesi *et al.*, 2008; 2009; Pronsato *et al.*, 2013 a y b).

Microscopía de fluorescencia convencional

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (*NIKON Eclipse E 600*) equipado con filtros estándar adecuados para capturar las señales fluorescentes. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara digital acoplada al microscopio.

Ensayo del cierre de la herida

En este ensayo se evaluó cómo los tratamientos afectan las capacidades de viabilidad, crecimiento y división celular, (Petit *et al.*, 2000 modificado por nuestro grupo; Pronsato, tesis doctoral 2014). Brevemente: se siembran las células en placas de 35 mm de diámetro y se cultivan hasta alcanzar un 100% de confluencia. Se realizan los tratamientos y finalizado el tiempo se realiza una herida en forma de cruz con un *tip* estéril, dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Posteriormente se cambia el medio por medio nuevo y se observa la zona central de la herida en un microscopio. El cierre de la herida se monitorea durante 24 hs o hasta que cierre completamente, tomando imágenes cada 20 min mediante la cámara digital acoplada al microscopio óptico (*Nikon Eclipse Ti-S*).

Fraccionamiento subcelular

Luego de realizar los tratamientos correspondientes, se descartó el medio de cultivo y las células fueron recolectadas y homogeneizadas a 4 °C en buffer TES (50 mM Tris/HCl pH=7,4, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 µg/ml leupeptina, 20 µg/ml aprotinina, y 20 µg/ml de inhibidor de tripsina). El aislamiento de las fracciones subcelulares por centrifugación diferencial se realizó en una centrífuga refrigerada Sorvall (rotor SM-24) para la obtención de las fracciones nuclear, mitocondrial y el sobrenadante post mitocondrial. Inicialmente, el homogenado total fue centrifugado a 500 rpm (100 x *g*) durante 5 minutos para sedimentar y eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido, se centrifugó a 1.800 rpm (300 x *g*) durante 20 minutos para obtener el sedimento correspondiente a la fracción enriquecida en núcleos. El sobrenadante postnuclear fue centrifugado 30 minutos a 10.000 rpm (8.000 x *g*) para la obtención del sedimento enriquecido en mitocondrias y un sobrenadante postmitocondrial. Cada fracción subcelular fue lavada, resuspendiendo los sedimentos en buffer TES y volviéndose a centrifugar a las velocidades especificadas anteriormente. Los precipitados fueron resuspendidos en buffer lisis y conservados a -20 °C hasta su utilización. Paralelamente, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones subcelulares recuperadas para la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (1976). El anticuerpo anti-Lamin B se utilizó para la inmunodetección del marcador nuclear Lamin B en las diferentes fracciones.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se tomaron alícuotas de 5 µl de los homogenados en donde se cuantificó el contenido proteico por el método de Bradford (Bradford 1976). Posteriormente, los lisados celulares fueron desnaturalizados en buffer muestra 6X (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 500 mM DTT, 2 µg/ml azul de bromofenol) a 100 °C durante 5 minutos para su siembra en geles de SDS-PAGE (análisis por la técnica de *Western blot*).

Western blot

Se realizó la técnica de *Western blot* para analizar los niveles de expresión y localización subcelular de las proteínas: β -Catenina, Notch 1, Caspasa 3 y 14-3-3.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas obtenidas anteriormente y desnaturalizadas, se separaron por electroforesis en geles de 1,5 mm de espesor, al 10% de poliacrilamida/bisacrilamida, de acuerdo al protocolo en placa descrito por Laemmli (Wagner y Laemmli 1979) y según procedimientos convencionales realizados de rutina en nuestro laboratorio (Milanesi *et al.* 2004, 2008, 2009; Vasconsuelo *et al.* 2008, 2011; Pronsato *et al.* 2010, 2012, 2013 a y b). Se sembraron 20-30 µg proteína/calle y en paralelo se sembraron marcadores proteicos coloreados de peso molecular conocido (220-10 kDa), para poder determinar el tamaño (en kDa) de las bandas de interés de las muestras sembradas. Los geles se corrieron a voltaje constante de 100 V en buffer de corrida (Tris-Base 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, 0,1% SDS).

Transferencia

Las proteínas se electrotransfirieron desde los geles a membranas sintéticas de polifluoruro de vinilideno o PVDF ("*Inmobilon-P*", Millipore Corporation, MA, USA), previamente activadas en metanol puro durante 30 segundos. La transferencia se realizó durante 2 horas a amperaje constante de 100 mA por gel, de acuerdo al método de Towbin *et al.* (1979), empleando un sistema semi-seco (*Hoefler MiniVE Blotter*, Amersham Pharmacia Biotech, CA, USA) y manteniendo los geles y las membranas embebidas en buffer de transferencia (25 mM Tris-Base pH 8,3, 192 mM Glicina, 20% metanol).

Bloqueo

A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer PBS-T (200 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 80 mM Na₂HPO₄, 0,1% Tween 20) conteniendo 5% de leche descremada en polvo para bloquear los sitios de ligado inespecíficos.

Revelado con anticuerpos

Las membranas con las proteínas transferidas fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con las diluciones apropiadas de cada anticuerpo primario (en PBS-T con albúmina bovina sérica (BSA) al 1%). Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 20 minutos cada vez, con PBS-T. Luego, fueron incubadas con la dilución apropiada del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) en PBS-T 0,1% BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente en PBS-T, como se mencionó anteriormente, procediéndose luego al revelado de las bandas inmunorreactivas por el método de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del *kit* comercial ECL (*NENTM Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA*). La detección de los inmunocomplejos se llevó a cabo exponiendo las membranas a placas radiográficas *Kodak BioMax Light film* durante intervalos de tiempo variables. Las imágenes de quimioluminiscencia fueron digitalizadas usando el scanner *Genius ColorPage-Vivid+* a una resolución de 300 dpi.

Resultados

El tratamiento de las células RD con el extracto liposoluble de *N. glauca* induce apoptosis, observándose cambios en la morfología nuclear y mitocondrial.

Mediante microscopía de fluorescencia convencional se evaluó la morfología nuclear y la distribución y morfología mitocondrial, empleando los marcadores DAPI Y *MTT red* respectivamente (**Figura 8**), a fin de visualizar el efecto del tratamiento con el extracto sobre la morfología de estas organelas. En la figura 8 pueden observarse los núcleos intactos/normales de las células musculares en las condiciones control, tratadas solo con el vehículo (isopropanol) durante 2 horas. El tratamiento de las células RD con el extracto lipídico reprodujo las alteraciones morfológicas típicas que ocurren en los núcleos y en las mitocondrias de las células apoptóticas, como son la condensación nuclear y la pérdida de la distribución clásica en forma de “tela de araña” de las mitocondrias, con su consecuente relocalización subcelular.

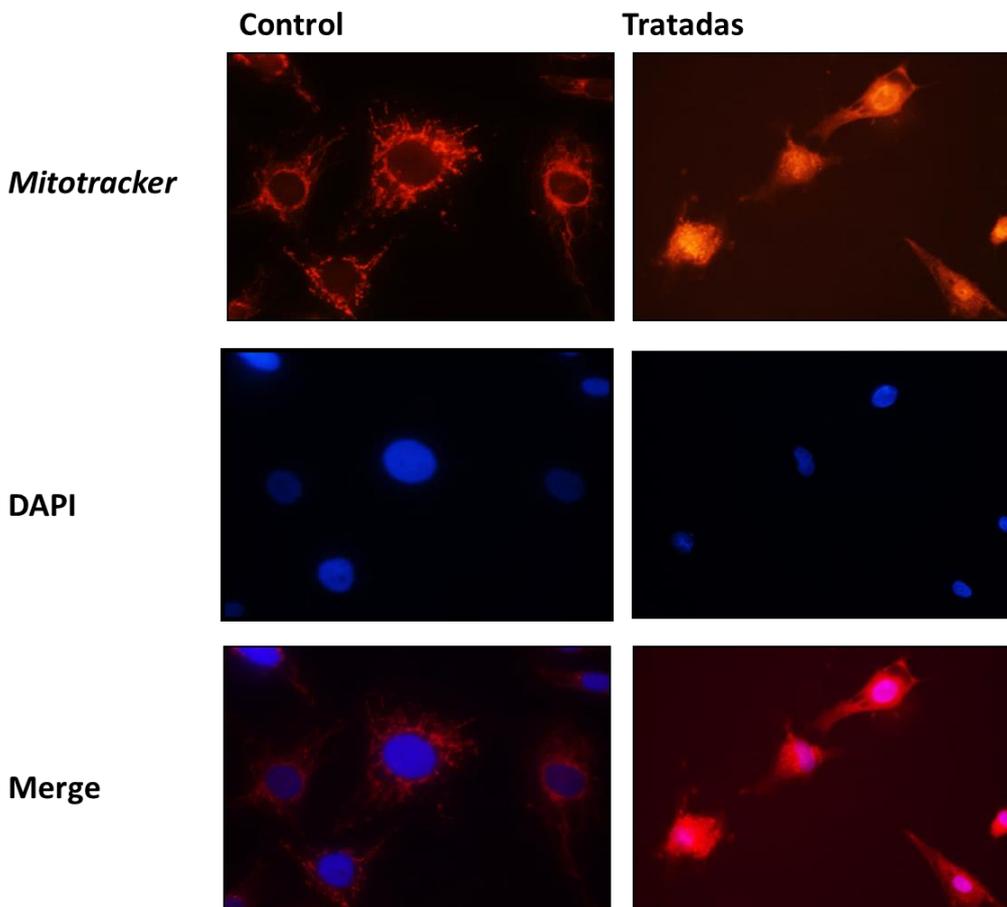


Figura 8: El extracto liposoluble de *N. glauca* induce apoptosis en las células RD. Los cultivos celulares fueron tratados con el extracto liposoluble de *N. glauca* durante 2 hs (Tratadas) o bien mantenidas en DMEM sin suero por 2 hs (Control). Luego las células fueron teñidas con *MTT Red* (rojo) y posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI (azul), como se describió en *Métodos*. Amplificación 60X.

El tratamiento de las células RD con los extractos de *N. glauca* afecta el ciclo celular, reduciendo la tasa de división celular y posiblemente también la migración celular.

Investigamos cómo los tratamientos afectan las capacidades de viabilidad, crecimiento y división celular, con el ensayo de la herida (Petit *et al.*, 2000), modificado por nuestro grupo (Pronsato, tesis doctoral 2014), (**Figura 9**). Una vez que las células alcanzaron 100% de confluencia, se realizaron los distintos tratamientos durante 1 hora. Luego se realizó una herida en forma de cruz y se observó la zona central de la herida en el microscopio óptico, monitoreando su cierre cada 20 min. La Figura 9 muestra las imágenes obtenidas a la hora cero (0hs: luego de realizar la herida y reemplazar el medio por medio de cultivo nuevo con suero) y a las 24hs (momento en el que se finalizó el ensayo).

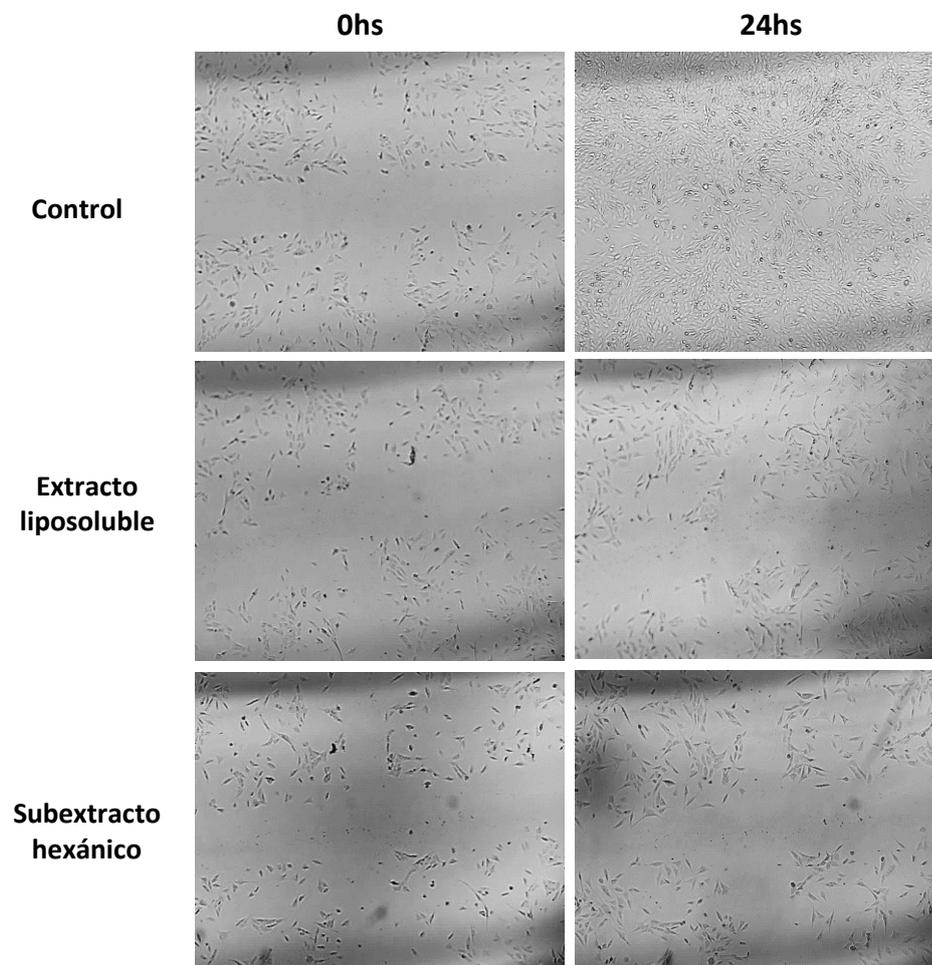


Figura 9: Los extractos de *N. glauca* afectan el ciclo celular, reduciendo la tasa de división y posiblemente también la migración celular. Las células fueron incubadas en cajas de 6 cm estériles hasta el 100% de confluencia. Luego de los tratamientos, se realizó una herida en forma de cruz y se reemplazó el medio por medio de cultivo nuevo con suero (0hs). El cierre de la herida se monitoreó durante 24hs. 0hs: inicio del monitoreo. 24hs: finalización del ensayo. Amplificación 4X.

Claramente se observó que los tratamientos, tanto con el extracto liposoluble como con el subextracto hexánico, afectaron significativamente la capacidad de división y probablemente de migración celular, respecto al control (éste último mostró un cierre completo a las 24hs de iniciado el ensayo).

El tratamiento de las células RD con los extractos de *N. glauca* induce cambios en la localización subcelular de la proteína β -catenina.

Las cateninas son proteínas citoplasmáticas necesarias para el establecimiento de las adhesiones entre células y son un punto importante para la regulación de los complejos de adhesión. Participan en la interacción del dominio intracelular de las cadherinas con los componentes del citoesqueleto. Además de esta importante función en la participación de uniones adherentes (**figura 10**), la β -catenina es un componente fundamental en la transducción de señales intracelulares.

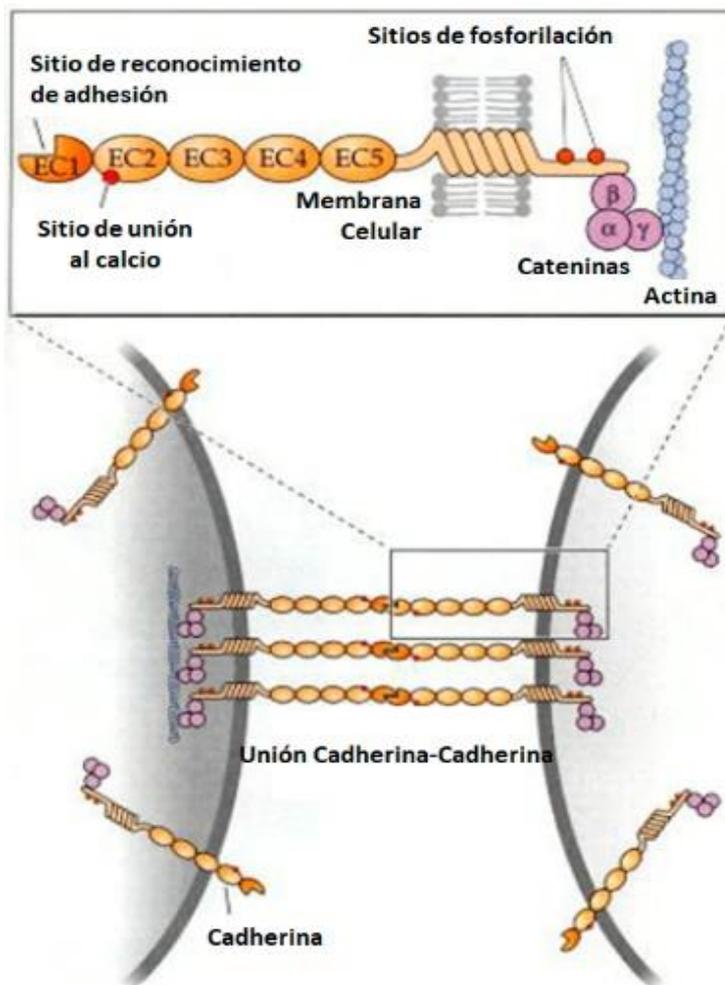


Figura 10: Esquema de las uniones adherentes o interacciones yuxtácrinas entre la cadherinas y su interacción con las cateninas del lado intracelular. A su vez las cateninas son el nexo entre las cadherinas y el citoesqueleto. Adaptado de Gilbert, *et al*, séptima edición, 2003.

La vía de señalización Wnt- β -catenina juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular; en consecuencia, está involucrada en numerosas anomalías del desarrollo embrionario, del crecimiento y la homeostasis. La actividad de la vía de señalización Wnt- β -catenina depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. En condiciones normales esta proteína se mantiene en bajas concentraciones gracias a un proceso de degradación dependiente de la vía ubiquitina-proteosoma (**Figura 11**). La llegada del ligando Wnt activa la vía e inhibe la fosforilación de β -catenina y por ende su degradación permitiendo la entrada al núcleo y su unión al factor de transcripción LEF/TCF regulando de esta manera la expresión de genes bajo su dominio (**Figura 11**).

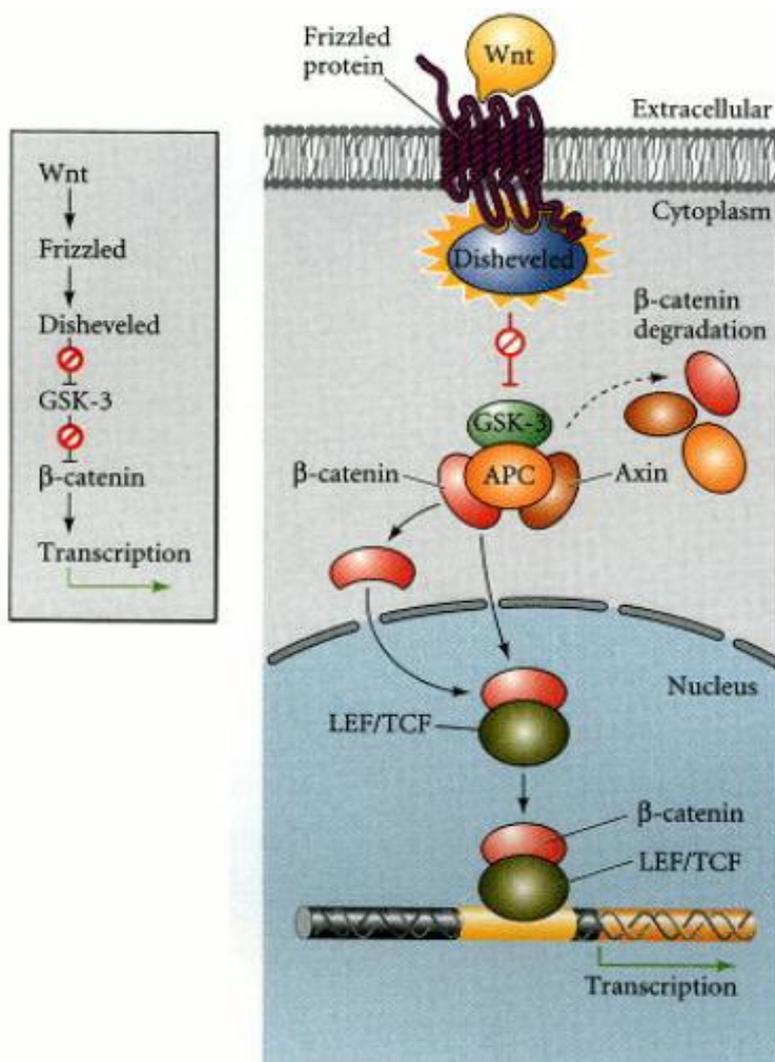


Figura 11: Representación de la vía Wnt y de la ruta de degradación de la proteína β -catenina citosólica. En ausencia de ligando ocurre la formación del complejo APC que permite el secuestro y la fosforilación por parte de GSK-3 β de la proteína β -catenina para su degradación por ubiquitinización. La llegada del ligando Wnt activa la vía e inhibe la fosforilación de β -catenina y por ende su degradación. El incremento de β -catenina citoplasmática permite su entrada al núcleo en donde se asocia al factor de transcripción LEF/TCF permitiendo su activación y la posterior regulación de la

expresión de un grupo de genes, cuyos productos proteicos participan en varios procesos como la división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis. Adaptado de Gilbert, *et al*, séptima edición, 2003.

Estas vías juegan un papel preponderante durante la vida adulta, manteniendo la homeostasis de distintos tejidos. La regulación anormal de la vía Wnt da lugar a la proliferación neoplásica en estos.

Se evaluó entonces, mediante ensayos de inmunocitoquímica, la localización de la β -catenina en las células RD mediante la utilización de un anticuerpo específico contra la proteína, y se comparó su localización en las células RD (tumorales) respecto de la línea no tumoral C2C12. Como se puede observar (**Figura 12**), las células no tumorales presentan una localización citoplasmática y próxima a membrana de β -catenina (**A**) en contraposición con la localización nuclear observada en las células RD (**B**).

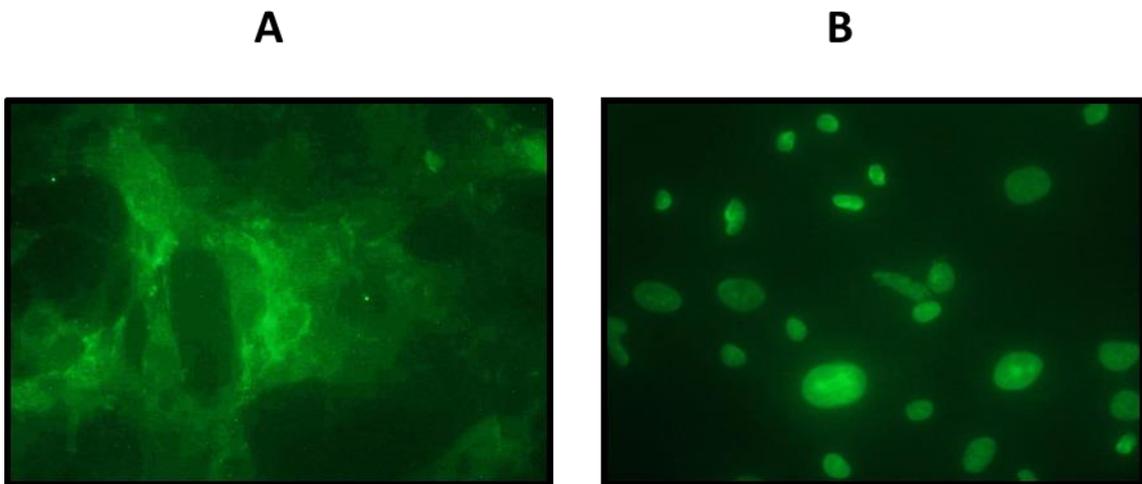


Figura 12: La β -catenina se localiza en el núcleo de las células tumorales RD. Ensayos de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario específico contra la β -catenina y luego un secundario conjugado a un fluoróforo (Alexa 488). **A.** Células C2C12: β -catenina con localización citoplasmática y próxima a membrana. **B.** Células RD: β -catenina con localización nuclear. Amplificación 60 X.

Por ensayos de *Western blot* se pudo observar cómo se ve afectada la localización de la β -catenina por los tratamientos con el extracto liposoluble, el subextracto hexánico y el H_2O_2 . A pesar de que no se vió un cambio en la localización nuclear, si se observó un aumento de la localización de esta proteína en la fracción post mitocondrial (**Figura 13 A**). La detección de la proteína Lamin B se utilizó como un control de la contaminación nuclear en la fracción post mitocondrial (**Figura 13 A**).

Por inmuncitoquímica y utilizando un anticuerpo específico contra β -catenina se pudo observar el cambio en la localización subcelular de la proteína debido a los distintos

tratamientos. Las células RD control mostraron una localización nuclear de la β -catenina mientras que en los tratamientos con los extractos se observó un aumento en la localización citosólica, especialmente próxima a la membrana plasmática (**Figura 13 B**).

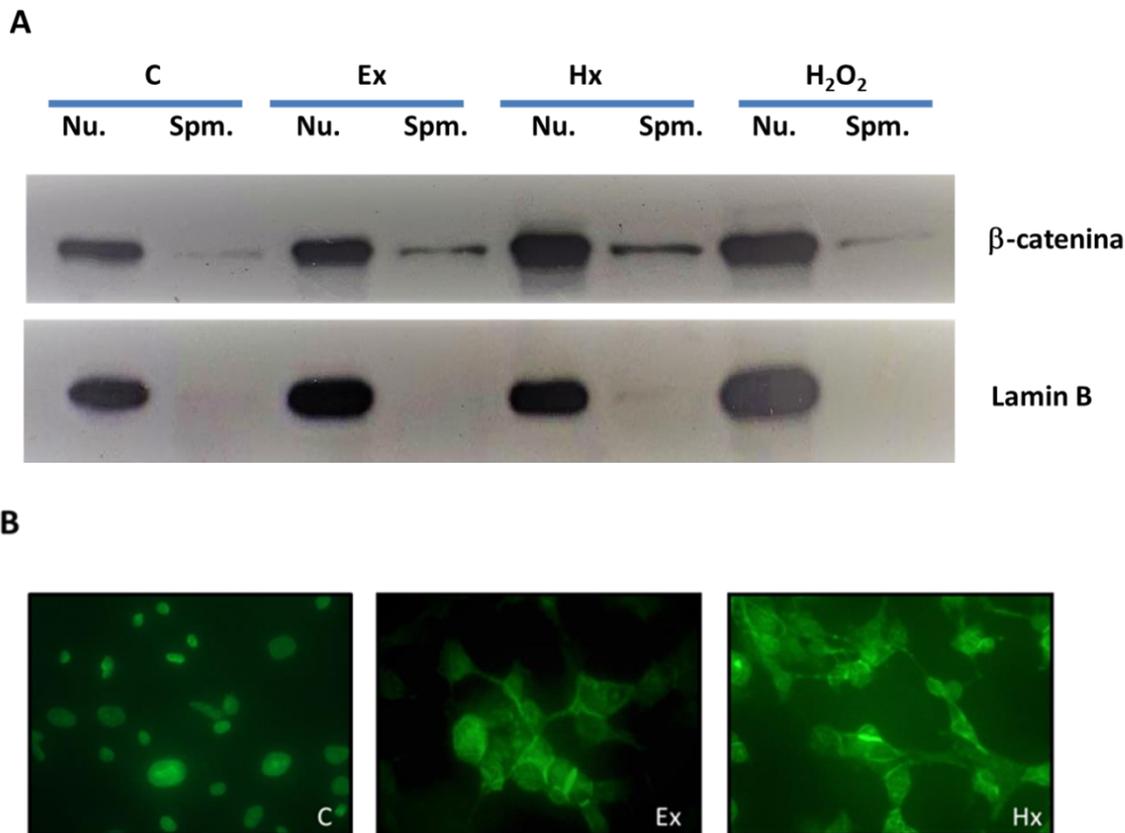


Figura 13: Los extractos de *N. glauca* inducen cambios en la localización subcelular de la proteína β -catenina en las células RD. A. Las fracciones subcelulares obtenidas luego de los distintos tratamientos fueron aisladas y cuantificadas. 20 μ g de proteína de cada fracción fueron analizadas por ensayos de *Western blot*. Las membranas fueron incubadas empleando un anticuerpo específico contra β -catenina y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, como se detalla en *Métodos*. Se evaluó la fracción nuclear (Nu) y la fracción post mitocondrial (Spm) en las condiciones control (C), extracto liposoluble (Ex), subextracto hexánico (Hx) y H₂O₂. **B.** Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas durante 1 hora con el vehículo de los extractos (C), con el extracto liposoluble (Ex) o con el subextracto hexánico (Hx). Las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo primario específico para detectar β -catenina y un secundario marcado con un fluoróforo. Se observó la localización nuclear en el control (C). En las células tratadas con los extractos (Ex y Hx) la β -catenina se detectó en núcleo y citosol con localización principalmente, próxima a la membrana plasmática. Amplificación 60X.

El tratamiento de las células RD con los extractos de *N. glauca* reduce el clivaje y la translocación al núcleo de la región intracelular de la proteína Notch 1.

Los genes Notch codifican para cuatro receptores transmembrana (Notch 1-4) de aproximadamente 300 KDa, cuya estructura está altamente conservada. Son proteínas transmembrana con una región extracelular, una región transmembrana y una intracelular, involucradas en la transducción de señales específicas, en respuesta a la unión a sus ligandos (Figura 14).

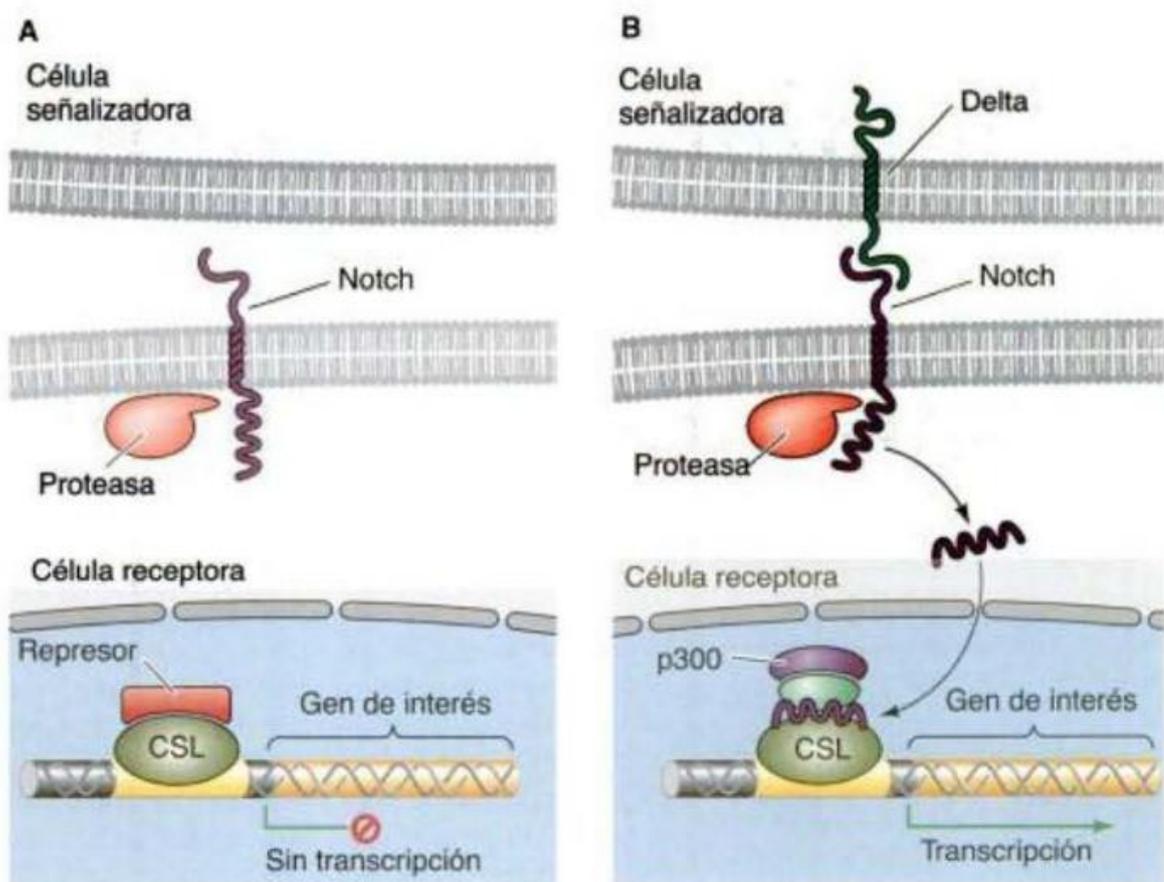


Figura 14: Procesamiento del fragmento intracelular de Notch, translocación al núcleo y regulación de la expresión génica. A. En ausencia del ligando de Notch, el factor CSL se encuentra unido a represores de la transcripción. **B.** Activación de Notch. La unión yuxtácrina Delta-Notch causa un cambio conformacional en Notch activando una proteasa que cliva liberando el fragmento intracelular que puede translocar al núcleo para unirse a CSL generando un cambio conformacional en éste que permite la liberación de los represores y la unión de los activadores de la transcripción, incluyendo a la histona p300. Adaptado de Gilbert, *et al*, séptima edición, 2003.

La interacción con sus ligandos produce cortes proteolíticos tanto en la región extracelular como en la transmembrana. Esta última libera el fragmento intracelular, el cual se transloca al núcleo y se une a un factor de transcripción (CSL) regulando la expresión de los genes que se encuentran bajo su dominio. La interrelación de la vía Notch con otras vías de señalización, por ejemplo, la vía Wnt- β -catenina, se ha visto implicada en varios procesos celulares, tales como la proliferación y oncogénesis. Tiene un rol importante en la regulación embrionaria y post-natal de la miogénesis esquelética y se ha demostrado su implicancia en la expansión e inhibición de la diferenciación de las células precursoras miogénicas. La activación de la vía Notch se correlaciona con el fenotipo invasivo de las líneas celulares de rhabdomyosarcoma (Fontana, Anna Masiá, 2013).

Evaluamos entonces, la localización del fragmento clivado de Notch 1 en condiciones basales y luego de los tratamientos, mediante ensayos de inmunocitoquímica y empleando un anticuerpo específico contra el fragmento intracelular de Notch 1. Se observó que, en condiciones basales, la región intracelular de Notch 1 se encontraba localizada en el núcleo (**Figura 15 A**), como era de esperarse para esta línea celular tumoral y como se describió en la *Introducción*. El tratamiento con el extracto liposoluble (**Figura 15B**) disminuyó la localización nuclear del fragmento y el tratamiento con el subextracto hexánico (**Figura 15C**) mostró una localización principalmente próxima a la membrana plasmática.

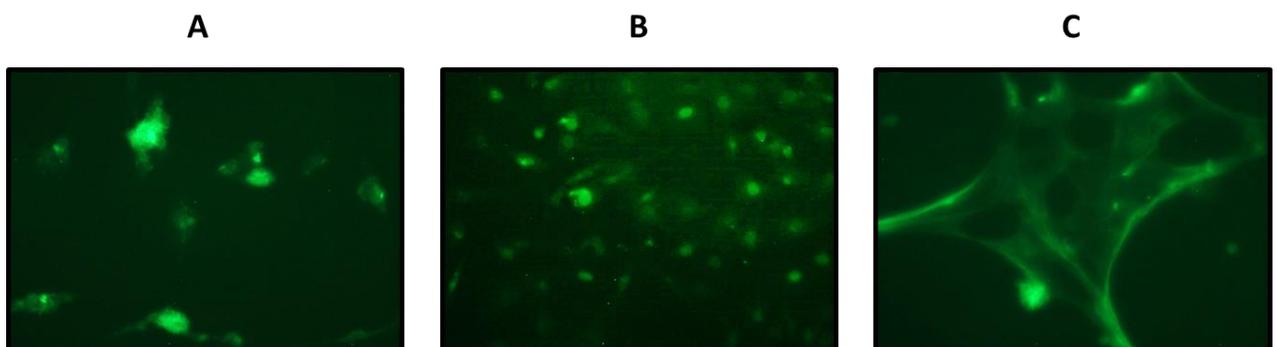


Figura 15: El tratamiento de las células RD con los extractos de *N. glauca* reduce el clivaje y la localización nuclear del fragmento intracelular de Notch 1. Las células sembradas sobre cubreobjetos, se trataron y posteriormente se fijaron y permeabilizaron con metanol. Para los ensayos de inmunocitoquímica se empleó un anticuerpo primario dirigido específicamente contra la región intracelular de Notch 1 y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488, como se describe en *Métodos*. Amplificación 20 X.

El extracto liposoluble de *N. glauca* aumenta la activación y la localización nuclear de la proteína Caspasa 3, pero no provoca cambios en los niveles de expresión proteica de la chaperona 14-3-3.

Las caspasas son proteínas claves en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos (**Figura 16**). Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser escindidos para su activación. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras.

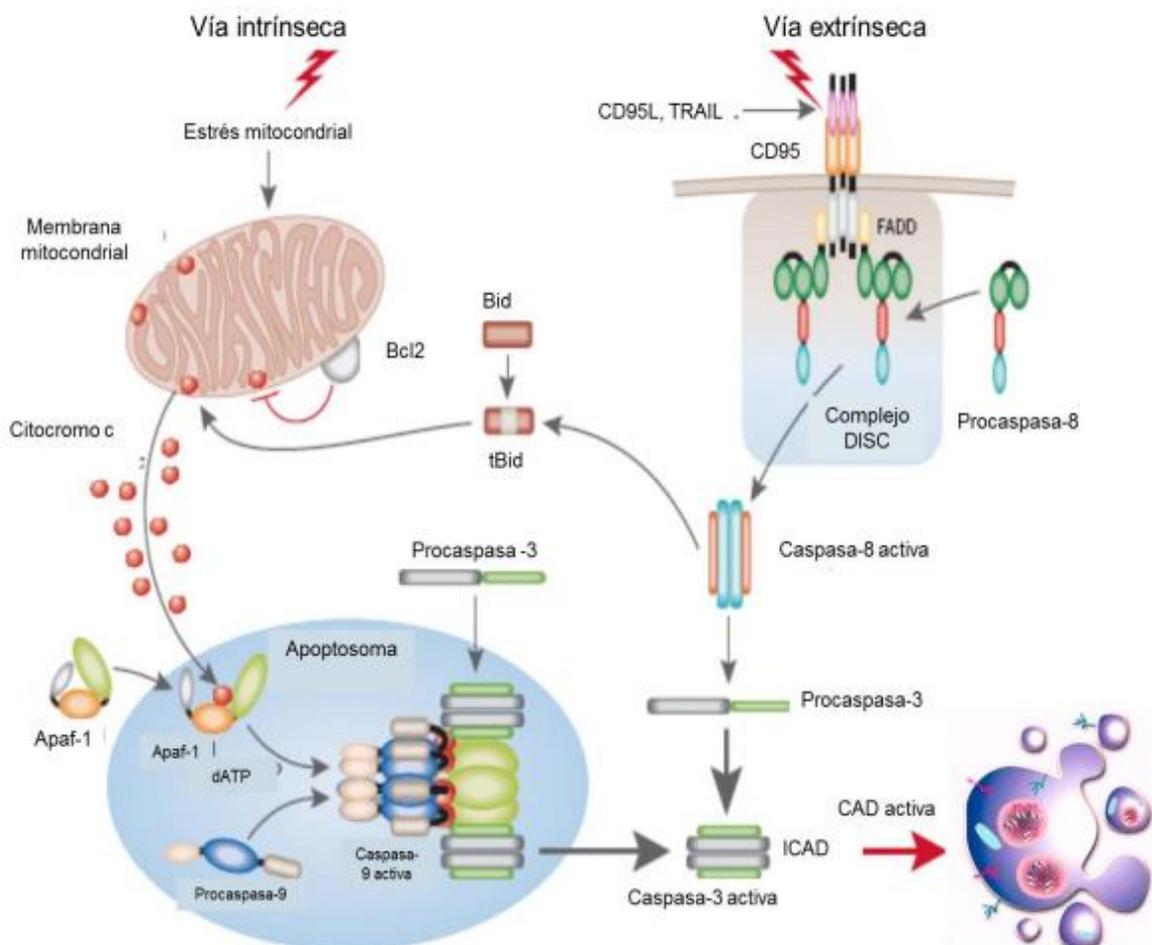


Figura 16: Esquema de las vías extrínsecas e intrínsecas de la apoptosis y el rol de las caspasas durante estos eventos.

Las primeras son activadas por autoproteólisis cuando son traslocadas a compartimentos específicos o mediante activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las iniciadoras. Las proteasas ejecutoras, dentro de las que se encuentra la Caspasa 3, son las encargadas de los cortes finales de los sustratos que provocan las alteraciones típicas de la apoptosis y la fragmentación del ADN.

Por ensayos de *Western blot* y empleando un anticuerpo específico contra la forma clivada de la Caspasa 3 (forma activa), pudimos observar que, en las células tratadas con el extracto, ocurre un aumento en la detección del fragmento clivado en la fracción post mitocondrial y su translocación al núcleo de una manera dependiente del tiempo de tratamiento (**Figura 17**).

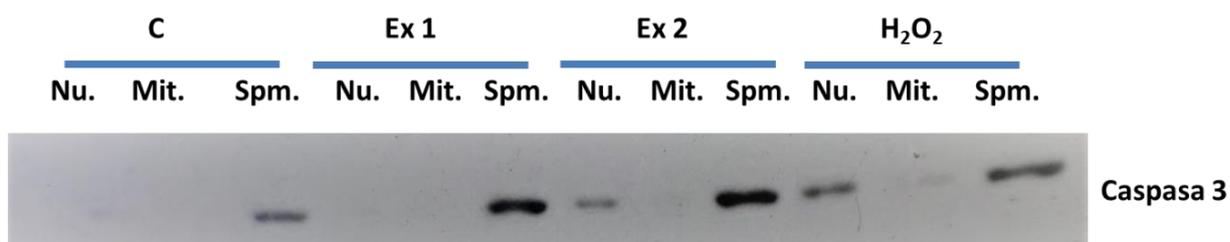


Figura 17: El extracto liposoluble de *N. glauca* aumenta la forma clivada (activa) de Caspasa 3 y su localización nuclear. Las fracciones subcelulares obtenidas luego de los distintos tratamientos fueron aisladas y cuantificadas. 20 µg de proteína de cada fracción fueron analizadas por ensayos de *Western blot*. Las membranas fueron incubadas empleando un anticuerpo específico contra la forma activa de Caspasa 3. Se analizó la fracción nuclear (Nu), mitocondrial (Mit) y el sobrenadante post mitocondrial (Spm) obtenidos de células tratadas con el extracto liposoluble por 1 hora (Ex 1), 2 horas (Ex 2), H₂O₂ 2 horas (control para la apoptosis), o bien mantenidas en DMEM sin suero, control (C).

Las proteínas 14-3-3 pertenecen a una familia altamente conservada, que se compone al menos de siete isoformas. Actúan como moléculas chaperonas que pueden moverse libremente del citoplasma al núcleo y viceversa. Hasta el momento, la función más común de las proteínas 14-3-3 es el secuestro de proteínas en el citoplasma, lo que lleva a la inhibición de su función. Otras funciones implican la regulación del crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular.

La asociación de 14-3-3 con sus proteínas modifica la progresión del ciclo celular, ya sea por afectar la localización o por modificar su actividad enzimática. También regula la apoptosis

a través de interacciones con dos proteínas proapoptóticas, desempeñando un papel activo en el retraso y la supresión de la apoptosis, y dando tiempo para la reparación del ADN después del daño celular (Mhaweck P.; 2005).

Por ensayos de *Western blot* y empleando un anticuerpo específico contra la proteína 14-3-3, pudimos observar que no ocurrieron cambios en los niveles de expresión de esta proteína en las muestras tratadas respecto al control (**Figura 18**). Solo se pudo visualizar un leve aumento en la localización mitocondrial para las células tratadas durante una hora con el extracto liposoluble.

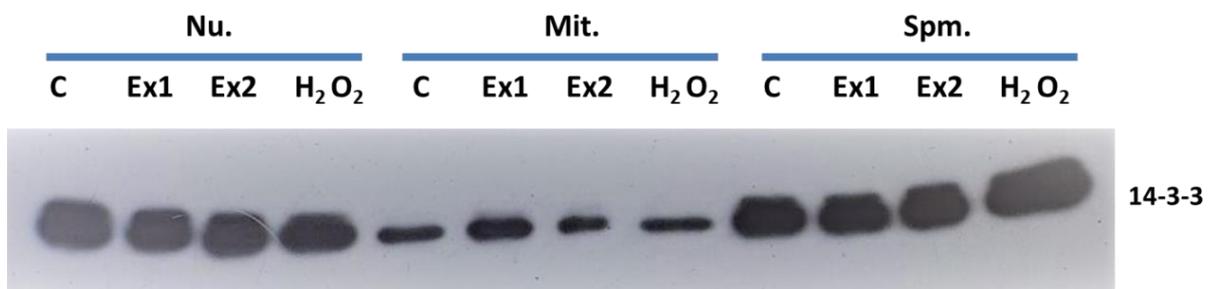


Figura 18: El extracto liposoluble de *N. glauca* no generó cambios en los niveles de expresión de la chaperona 14-3-3. Las fracciones subcelulares obtenidas luego de los distintos tratamientos, fueron aisladas y cuantificadas. 20 µg de proteína de cada fracción fueron analizadas por ensayos de *Western blot*. Las membranas fueron incubadas empleando un anticuerpo específico contra la proteína 14-3-3. Se analizó la fracción nuclear (Nu), mitocondrial (Mit) el sobrenadante post mitocondrial (Spm) de las células tratadas con el extracto liposoluble durante 1 hora (Ex 1), 2 horas (Ex 2), H₂O₂ 2 horas (control para la apoptosis) o bien mantenidas en DMEM sin suero, control (C).

Discusión

Una de las características más notorias, en cuanto a los cambios en la morfología de una célula durante la apoptosis, es la condensación nuclear, y una de las mejores formas de observarla es mediante la tinción del ADN con un colorante como puede ser el DAPI. El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Cuando el DAPI se une al ADN bicatenario, su máximo de absorción es a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461 (azul). Por lo tanto, en la microscopía de fluorescencia, este colorante es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian. En estado basal, es decir cuando las células no fueron inducidas a apoptosis, los núcleos celulares teñidos con DAPI se observan bien redondeados, mientras que, durante la apoptosis, los núcleos se vuelven picnóticos y el ADN contenido se fragmenta, pudiéndose observar núcleos compactados y/o con pérdida de material nuclear, perdiendo la forma clásica redondeada y bien definida. Este cambio morfológico típico de la apoptosis, pudo observarse claramente en las células RD tratadas con el extracto liposoluble de *N. glauca*.

Mediante microscopía de fluorescencia también se evaluó la morfología y distribución mitocondrial como otro indicador de apoptosis. Para la marcación de las mitocondrias se utilizó el colorante fluorescente *MTT red* como se describe en *Métodos*. Como logra observarse claramente en la Figura 8, el tratamiento de las células RD con el extracto liposoluble desencadenó un cambio notorio en la distribución mitocondrial, perdiéndose la clásica disposición de “tela de araña” homogénea en el citoplasma de las mitocondrias, para ubicarse alrededor del núcleo. Esta alteración es otro cambio clásico que ocurre durante el evento apoptótico. Esto indicó nuevamente que el tratamiento con el extracto liposoluble de *N. glauca* induce apoptosis en las células RD.

En paralelo evaluamos si el tratamiento tanto con el extracto liposoluble como con el subextracto hexánico afectaba las capacidades de proliferación y migración celular de las células RD. Para esto realizamos el ensayo de la herida en donde se permite a las células crecer en medio completo hasta alcanzar un 100% de confluencia. Luego de realizar el tratamiento y una herida en forma de cruz, como se describe en *Métodos*, las células fueron monitoreadas durante 24 hs, observándose que, al exponerlas al tratamiento con los extractos, no lograron

cubrir la zona despejada respecto al control, que sí lo hizo. Esto indicó que la proliferación y probablemente la migración de las células RD, se vio afectada por el tratamiento tanto con el extracto liposoluble como con el subextracto hexánico.

Luego investigamos por ensayos de *Western blot* e inmunocitoquímica, los niveles de expresión y localización subcelular de distintas proteínas que determinan la capacidad de migración e invasión, específicas para este tipo de tumor (rabdomiosarcoma), así como también, la expresión, activación y localización subcelular de una de las proteínas relacionadas con la fase final de la cascada apoptótica (caspasa 3). Para estos ensayos se emplearon anticuerpos primarios específicos para la detección de la proteína β -catenina, el fragmento clivado del receptor Notch 1, el fragmento clivado de caspasa 3 y la proteína 14-3-3. Como se describió previamente en la *Introducción y Resultados*, estas proteínas fueron seleccionadas para su estudio debido al rol fundamental que cumplen en la progresión del RMS (β -catenina y Notch 1) y en la apoptosis (caspasa 3 y 14-3-3).

Cuando se evaluaron las proteínas β -catenina y Notch 1, se observaron cambios en las localizaciones subcelulares de estas luego de los tratamientos y en comparación con los controles. Este cambio fue muy notorio para el fragmento intracelular de Notch 1, el cual perdió en gran medida su localización nuclear, principalmente luego del tratamiento con el subextracto hexánico, manteniendo la marcación en membrana (forma inactiva del receptor). Respecto a la β -catenina, se detectó un aumento de la señal citosólica tras el tratamiento con los distintos extractos. La detección citosólica, específicamente próxima a membrana, logró apreciarse en el ensayo de inmunocitoquímica. Tanto el fragmento intracelular de Notch 1 como la β -catenina se asocian a proteínas que actúan como factores de transcripción. La asociación del fragmento intracelular de Notch 1 y de la β -catenina a sus respectivos factores de transcripción, induce en estos un cambio en la conformación y por ende su activación, regulando de esta manera la expresión de los genes que se encuentran bajo su dominio. Específicamente, el fragmento clivado de Notch 1 regula la expresión de cadherina-N e integrina α -9, necesarias para el evento de migración e invasión celular. La expresión de integrina en la membrana plasmática permitiría interacciones yuxtácrinas con la fibronectina de la matriz extracelular (**Figura 19**), permitiendo la migración hasta alcanzar un capilar sanguíneo, donde la cadherina-N interaccionaría con las cadherinas-N del endotelio vascular, y de esta manera, las células de RMS lograrían ingresar al torrente sanguíneo y salir de este

durante el evento de invasión y metástasis (**Figura 20**). La integrina α -9 juega un papel fundamental, de este modo, en el mantenimiento del fenotipo maligno y del estado inmaduro del linaje muscular (Fontana Anna Masiá, 2013).

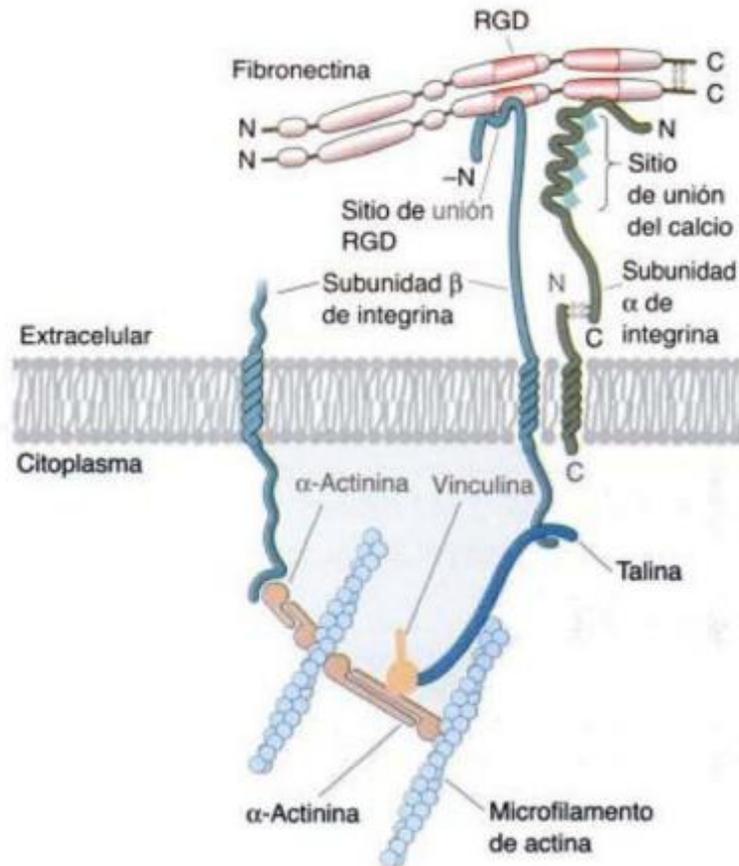


Figura 19: Esquema general de la estructura de una integrina. Las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas formadas por una subunidad α y una subunidad β . Interaccionan con glicoproteínas de la matriz extracelular como la fibronectina. Adaptado de Gilbert, *et al*, séptima edición, 2003.

Proceso de metástasis

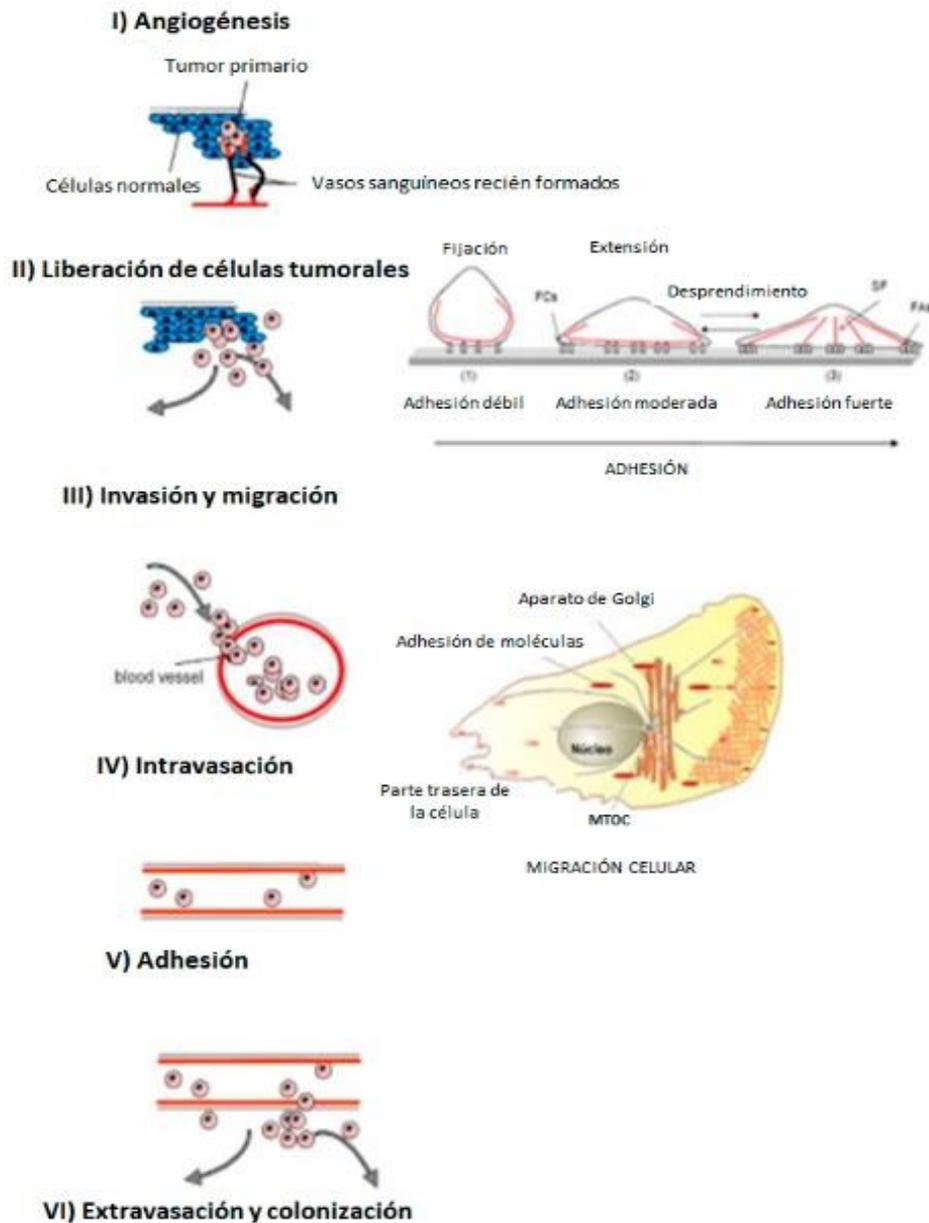


Figura 20: Proceso de metástasis: adhesión, migración e invasión celular. La cascada metastásica: (I) angiogénesis, (II) liberación de las células tumorales del tumor primario; (III) migración e invasión; (IV) intravasación; (V) adhesión de las células migratorias; (VI) invasión hacia el órgano diana y desarrollo del tumor secundario. Se muestra también el proceso de adhesión celular y los distintos grados de adhesión de las células en el tumor y una célula migratoria en detalle donde se observa el cambio en su polarización y en la distribución de las organelas, como el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC); para iniciar el evento de migración. Adaptado de Fontana Anna Masiá, 2013.

Para el RMS, como ya se mencionó, se ha demostrado la existencia de un mecanismo general capaz de activar los procesos de adhesión, migración e invasión celular. Estos procesos, que le dan las propiedades de oncogenicidad a estas células, están mediados por la vía Notch a través de la regulación positiva de la expresión de moléculas tales como la cadherina-N y la integrina α -9. La cadherina-N es una molécula de unión, calcio dependiente, implicada sobre todo en los procesos de adhesión y migración celular, observada principalmente durante el desarrollo embrionario, en estadios celulares indiferenciados o en proceso de diferenciación. Como se describió previamente, se ha propuesto que la oncogenicidad de la vía Notch se debe en parte al incremento de la expresión de estas proteínas (Fontana Anna Masiá, 2013).

Los cambios en la morfología celular producto de la activación de la apoptosis, que generan la desorganización del citoesqueleto, cambios en la distribución mitocondrial y la fragmentación nuclear, hacen que las distintas proteínas pierdan su localización celular predominante o clásica que permiten desarrollar las capacidades tumorigénicas. La localización nuclear del fragmento clivado de Notch 1 regula positivamente la expresión de la cadherina-N y la integrina α -9, proteínas fundamentales para la migración, intravasación y metástasis de las células de RMS. La localización nuclear de la β -catenina (favorecida por la activación de la vía Notch), regula positivamente la expresión de genes relacionados con la migración e invasión. Por lo tanto, la disminución o pérdida de las localizaciones nucleares de estas proteínas, afectarían las propiedades de la línea RD.

Los cambios en la maquinaria celular y las estructuras subcelulares que ocurre durante la apoptosis, se ven también reflejados en los cambios que experimentan aquellas proteínas que se encontrarían activas/inactivas en una situación no apoptótica. Estos cambios incluyen no solo cambios en su estado de activación que afectarían su estado conformacional (fosforilación o desfosforilación, interacción con otras moléculas y/o proteínas, etc.); sino también cambios en su localización subcelular y, por lo tanto, en las propiedades que presentaban las células antes del estado apoptótico. Esto se observó claramente para el caso de las proteínas estudiadas en este trabajo de tesis. La pérdida o la disminución de la localización nuclear tanto de Notch 1 como de β -catenina, modificarían notoriamente las propiedades oncogénicas de estas células, como consecuencia de una disminución de la expresión de los genes implicados en estos eventos y regulados por estos factores.

La Caspasa 3 es una de las principales caspasas responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas. Entre sus sustratos se encuentra un factor responsable de la fragmentación del ADN. Además, las caspasas eliminan la polimerasa, molécula implicada en la maquinaria celular que repara el daño en el ADN. Por otro lado, activan la vía que conduce a la condensación de la cromatina y participan en la destrucción de la lámina nuclear y de las proteínas del citoesqueleto. (García, M y Vecino, E, 2003). Mediante ensayos de *Western blot* se pudo observar un aumento del fragmento clivado de Caspasa-3 en las células tratadas con el extracto, sugiriendo la inducción de la apoptosis de las células RD por el extracto liposoluble de *N. glauca*.

Esta capacidad apoptótica demostrada para los extractos no es específica para las células RD, sino que, como se mencionó en la *Introducción*, afectaría las capacidades proliferativas de otras líneas, como es el caso de la línea celular no tumoral C2C12, induciendo también en estas, apoptosis. Por este motivo el objetivo final y a futuro del grupo de investigación es purificar y caracterizar las moléculas presentes en los extractos y analizar cuál de ellas no sólo logra disminuir o eliminar las capacidades de proliferación, migración e invasión de las células, sino también encontrar aquella molécula que logre inducir la diferenciación celular.

Durante este trabajo de tesis logré:

- Aprender las normas generales del trabajo en el laboratorio y cuidados para evitar la contaminación. Manejo y conocimiento de los materiales y sus usos en el cultivo celular.

Entrenamiento en el cultivo celular:

- Manejo del autoclave y tiempo de esterilización de los materiales.
- Preparación de los medios de cultivo con y sin suero.
- Técnica para el congelado y descongelado de las células, y cultivo celular en las cajas de Petri.

Manejo del microscopio de fluorescencia:

- Reconocimiento de las distintas partes del microscopio de fluorescencia. Utilización de los distintos filtros, de la cámara digital y del programa para capturar y editar las imágenes.

Manejo de centrífuga:

- Aislamiento de fracciones subcelulares.

Manejo del espectrofotómetro:

- Calibración del espectrofotómetro.
- Preparación de las muestras.
- Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford.

Entrenamiento en técnicas básicas de biología celular y química biológica:

- Dilución de los extractos liposolubles para la realización de los distintos tratamientos.
- Utilización de anticuerpos y manejo de los tiempos de incubación.
- Entrenamiento en las técnicas de marcación de organelas y técnicas inmunocitoquímicas: preparación de las células para su visualización por microscopía convencional con luz blanca y con fluorescencia, empleo de marcadores de organelas fluorescentes y anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluoróforos.

- Preparación de las muestras para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia.
- Ensayo del cierre de la herida para evaluar la supervivencia, proliferación y migración celular.
- Entrenamiento en la técnica de *Western blot*: preparación de geles de poliacrilamida. Siembra de las muestras proteicas y marcadores coloreados de peso molecular conocido. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF, incubación con anticuerpos primarios y secundarios conjugados a peroxidasa. Revelado por quimioluminiscencia.
- Digitalización y edición de los resultados obtenidos en los distintos experimentos.

Referencias:

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

Boland R, Vasconsuelo A, Milanesi L, Ronda AC, de Boland AR. (2008) *Steroids* 73: 859–863.

Bradford (1976). *M Anal Biochem*, 72: 248-254.

Conley K., Jubrias S., Esselman P. J. *Physiol.* (2000) 526: 203-210.

Fontana, Anna Masiá. Tesis Doctoral. (2013).

Garcia, M; Vecino, E. v. 78, n. 7, p. 351-364 (2003).

Gilbert, Scot. *Biología del Desarrollo* (2003). Panamericana, séptima edición.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). *Cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). *Cell*, 144(5), 646-674.

Hettmer S, Wagers AJ. *Muscling. Nat. Med.* (2010) 16:171-3.

La Colla, Anabela, (2015). Tesis Doctoral. UNS.

La Colla, A; Pronsato, L.; Ronda, C; Milanesi, L; Vasconsuelo* A; , Boland, R. (2014).

Actualizaciones en osteología.; 122-135.

La Colla, A; Vasconsuelo, A; Milanesi, L; Pronsato, L. (2017). *J CellBiochem*118:104–115.

Lincor, Darío. Tesis Doctoral-UNS, (2016-2020). Mhaweck, P. 14-3-3 proteins an update. *Cell Res* 15, 228–236 (2005)

Milanesi L and Boland R. *Plant Science.* (2004) 166, 397-404. ISSN: 0168-9452.

Milanesi L (2004). Tesis Doctoral. UNS.

Milanesi L, Russo de Boland A and Boland R. (2008). *J. Cell Biochem* 104: 1254-1273.

Milanesi L, Vasconsuelo A, de Boland AR, Boland R. (2009). *Steroids* 74: 489-497.

Milanesi L., Monje, P; Boland, R. (2001) *BBRC.* 289:1175-9.

Milanesi, L. and Boland R. (2006). *Physiologia Plantarum.* 128, 341-350. ISSN 0031-9317.

Morton C. V. (1976). Rev. Nac. Científica. Córdoba, Argentina.

Musso F, Lincor D, Vasconsuelo A , Faraoni MB, Milanesi L. (2017). Proceeding (1-13).

Musso, F, Lincor D, Vasconsuelo A, Faraoni M, Milanesi L. (2019) The American Journal of Chinese Medicine. National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line). Disponible en: <http://www.cancer.gov>.

Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Vallés AM. (2000). The Journal of cell biology, 148:957-970.

Pronsato L and Milanesi L. (2016). Steroids 106 41–54.

Pronsato L, Boland R, Milanesi L. (2012) *J. Endocrinol.* 212: 371–381.

Pronsato L, Boland R, Milanesi L. (2013b) Archives of Biochemistry and Biophysics ISSN: 0003-9861. 530, 13–22.

Pronsato L, Milanesi L, Vasconsuelo A. (2020). Mol Cel Endocrinol. 500: 110631.

Pronsato L, Milanesi L, Vasconsuelo, La Colla, Steroids, (2017). Steroids 124: 35–45.

Pronsato L, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. Actualizaciones en Osteología (2010). ISSN: 1669-8975 (print); ISSN: 1669-8983 (online). 6(2), 65-80.

Pronsato L, Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. (2014).

Pronsato L, La Colla, A; Ronda, C; Milanesi, L; Boland R; y Vasconsuelo, A. (2013a). BIOCELL. ISSN 1667-5746. 37(1): 1-9.

Salas, Sabrina. Tesis de grado. Universidad Nacional del Sur. (2017).

Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 4350-4354.

Vasconsuelo A, Milanesi LM y Boland R (2008) *J. Endocrinol.* 196: 385–397.

Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda A, Boland R, Milanesi L (2011) Steroids. 76, 1223–1231.

Wagner J, Laemmli U. (1979). Virology 92: 219-229.

Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P. and Aiken, J. M. (2001). FASEB J. 15:322–332.

Young JL, Ries LG, Silverberg, E Horm JW, Miller RW. (1986) Cancer 58:598-602.