



Tesis para obtener el Título de Doctor

Efecto inhibitorio de Deshidroleucodina en la migración e invasión de las células tumorales en cultivo

Presentada a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de
la Universidad de Buenos Aires

Bioq. Celina Amaya

Tesis dirigida por Luis Alberto López, PhD
Consejero de estudios: Carlos Davio, PhD

Abril 2014

Laboratorio de Citoesqueleto y Ciclo Celular – IHEM-CONICET

Agradecimientos

¡Ya está! Después de estos años en el laboratorio llego a la meta y puedo dar las gracias a las personas que me han acompañado en este camino. Espero no dejarme a nadie en el tintero, y en caso de olvido pido perdón por anticipado.

En primer lugar, doy gracias a mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de trabajar, desarrollar mi vocación investigadora, y hacer la tesis en su laboratorio. Por sus críticas, su preocupación, apoyo, reuniones, congresos y artículos. Gracias por confiar en mí y fomentar el espíritu científico.

Quiero agradecer y reconocer la ayuda económica de la Agencia, Conicet y Luis López, al financiar el desarrollo de esta tesis.

Mil gracias a la gente con la que he compartido estos años. A todo “mi” laboratorio al cual debería dedicar no un párrafo, sino cuatro hojas enteras. A mis amigas Anto, Lai, Vale y Vicky, además de excelentes revisoras y críticas de mis experimentos e ideas, han sido compañeras de grandes momentos tanto dentro, como fuera del laboratorio. Especialmente gracias a mi queridísima amiga Bea, la que me incentivó a comenzar esta carrera y la que me ha acompañado en todo momento: cursos, congresos, charlas de pasillo, hacer notas, presentar trabajos, escribir la tesis, leer la tesis, ir a la peluquería, comprar ropa, viajes de trabajo, viajes de placer y no hacer nada también.

Igualmente, gracias a toda la gente del IHEM. El compartir pasillo, almuerzos, risas,... marcaron una época de mi vida. También gracias a las personas que han sido de gran ayuda con su trabajo: a Norberto, Jorge, Elisa, Mabel y Tirso, por el apoyo técnico con su servicio en la microscopía óptica, de fluorescencia y electrónica de barrido, y cultivo celular. Además, han resultado ser personas encantadoras. Gracias por hacerme vivir una experiencia enriquecedora e inolvidable.

Gracias a los integrantes de los laboratorios de la Dra. Patricia Valles y el Dr. Walter Berón, los consejos, suministro de material y buena onda, han sido fundamental para el desarrollo de mi trabajo. Al Dr. Carlos Davio por su valioso aporte de criterio para culminar con la tesis. Especialmente gracias al Dr. Andrew Quest y Jorge Díaz, que me abrieron las puertas de su laboratorio, colocaron a mi disposición todo el material y equipo que necesité

para realizar las técnicas, y mientras hacia los experimentos, me hicieron pasar un muy grato momento.

Por supuesto a mis amigos “externos” a todo este mundo. Gracias por el interés y por preguntar, aunque luego tengan que poner cara de póker al escuchar mis planes y proyectos. ¡Y gracias por todo lo que no ha sido ciencia! Viajes, asados, fiestas, cumpleaños, vacaciones, etc.

Gracias a la familia de Miguel, por su interés y apoyo. Y sobre todo gracias a la mía. Sin ustedes no sería nada. A mis hermanos Jose, Caro y Nico, porque los quiero y son muy importantes para mí. A mi papá por todo el esfuerzo dedicado a mí. A mi abuela Gochy por su cariño. A mi mamá por su ayuda, amor, comprensión... gracias por cuidarme.

Y finalmente gracias a ustedes, Miguel y Agustina. Por todos los buenos y malos ratos de mi trabajo que han tenido que aguantar. Por servirme de apoyo y ánimo. Por intentar comprender (o simplemente escuchar) cuando llegaba a casa cansada, quemada o disgustada. Principalmente gracias por sustentar este importante paso en mi carrera y festejar cada logro alcanzado. Gracias por estar a mi lado y compartir todo.

Gracias a todos.

Parte de los resultados presentados en esta tesis se encuentran en el siguiente trabajo:

THE SESQUITERPENE LACTONE DEHYDROLEUCODINE ALTERS THE ACTIN CYTOSKELETON AND INHIBITS THE MIGRATION OF TUMOR CELLS IN CULTURE. Amaya Celina, Costantino Valeria, Diaz Jorge, Quest Andrew, Lopez Luis. (En redacción)

Trabajos en colaboración han dado lugar a la siguiente publicación:

THE SESQUITERPENE LACTONE DEHYDROLEUCODINE TRIGGERS SENESCENCE AND APOPTOSIS IN ASSOCIATION WITH ACCUMULATION OF DNA DAMAGE MARKERS. Costantino Valeria, Mansilla Sabrina, Speroni Juliana, Amaya Celina, Cuello-Carrión Darío, Ciocca Daniel, Priestap Horacio, Barbieri Manuel, Gottifredi Vanesa, Lopez Luis. PlosOne 2013

Tabla De Contenidos

Abreviaciones	8
Términos en inglés	11
Resumen	12
INTRODUCCIÓN	14
Migración celular	16
Citoesqueleto de actina	17
Polarización de la célula	24
Protrusión de la membrana	25
Adhesión de la célula	28
Translocación del cuerpo y retracción de la parte posterior celular.....	29
Regulación e integración.....	31
Patologías relacionadas con la migración celular.....	33
Cáncer y metástasis	35
Invasión local.....	37
Intravasación.....	39
Circulación sanguínea o linfática.....	39
Arresto en órganos distantes y extravasación	40
Sobrevida en un microambiente foráneo	40
Colonización metastásica	40
Tratamiento del cáncer	42
Tratamientos convencionales	42
Tratamientos con productos naturales.....	45
Lactonas sesquiterpénicas	46
Actividad biológica	46
Selectividad tumoral	48
Inhibición de la bomba SERCA.....	49
Generación de radicales libres a través del hierro	50
Regulación del NFkB y la p53	50
Modulación epigenética.....	51
Inhibición de la angiogénesis y migración celular	51
Deshidroleucodina	53
Estructura química	53
Antecedentes	54
HIPÓTESIS	56
OBJETIVOS	58
Objetivo general	59
Objetivos específicos.....	59

RESULTADOS.....	60
SECCIÓN 1: Efecto de DhL en la viabilidad de las células tumorales arrestadas con hidroxiurea	61
Arresto del ciclo celular.....	62
Viabilidad de las células arrestadas con HU	66
Viabilidad de las células arrestadas con HU y tratadas con DhL	67
Senescencia.....	68
Apoptosis	69
SECCIÓN 2: Efecto de DhL en la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular y en la formación de las adhesiones focales.....	73
Adhesión de las células tumorales a fibronectina.....	75
Expansión de las células tumorales sobre fibronectina	76
Concentración de vinculina	78
Número y tamaño de las adhesiones focales.....	82
SECCIÓN 3: Efecto de DhL en la capacidad invasiva de las células tumorales	84
Invasión celular	85
Actividad de las MMPs	88
Activación de las MAPKs	89
SECCIÓN 4: Efecto de DhL en la motilidad y morfología celular, y en las proteínas que conforman el citoesqueleto.....	94
Migración de las células tumorales	95
Velocidad de migración y direccionalidad.....	100
Morfología.....	103
Distribución de los microtúbulos	106
Polimerización de actina	107
Organización del citoesqueleto de actina	110
Actividad del frente de avance.....	113
Distribución de Rac1	117
Activación de Rac1	117
DISCUSIÓN.....	123
Efecto de DhL en la viabilidad de las células arrestadas con HU	126
Efecto de DhL en la adhesión celular	128
Efecto de DhL en la invasión celular	129
Efecto de DhL en la migración celular	131
Discusión general del mecanismo de acción de DhL	136
PERSPECTIVAS FUTURAS	142
MATERIALES Y MÉTODOS.....	144
Líneas celulares	145
Cultivos celulares	146
Subcultivos celulares.....	146
Criopreservación y descongelación de células.....	146

Deshidroleucodina	147
Tratamientos celulares.....	147
Ensayo de Proliferación.....	147
Viabilidad celular	148
Senescencia	148
Apoptosis	149
Ensayo de adhesión y expansión celular	149
Inmunofluorescencia.....	150
Western Blot	151
Zimografía	152
Migración e invasión en cámaras <i>transwell</i>	152
Ensayo de la herida	153
Video-microscopía en células vivas	153
Morfología celular	153
Fraccionamiento del citoesqueleto de actina	154
<i>Pull down</i> para Rac1	155
Microscopía electrónica de barrido	156
Citometría de flujo	156
Análisis Estadístico	156
REFERENCIAS	157

Abreviaciones

Abl	Proteína no receptor tirosina quinasa
Actina-F	Actina en forma de filamentos
Actina-G	Actina globular monomérica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina di-fosfato
AF	Adhesión focal
ARN	Ácido ribonucleico
Arp2/3	Proteína relacionada con actina 2 y 3
ATP	Adenosina tri-fosfato
B16-F0	Línea celular de melanoma de ratón
B16-F10	Línea celular de melanoma de ratón con diez procesos de selección por el método Fidler
BRCA1	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1
BRCA2	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 2
C-terminal	Carboxilo terminal
Ca ²⁺	Calcio iónico
Caderina-E	Caderina epitelial
CapZ	Proteína de encapsulamiento de actina Z
CDR	<i>Ruffles</i> dorsales circulares
Células/c	Células por campo
Células/p	Células por pocillo
CitB	Citocalasina B
Cy3	Colorante cianina 3
DhL	Deshidroleucodina
DMEM-F12	Medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , con mezcla de nutrientes F-12

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNDP	Desoxi-nucleótido-difosfato
DNMT1	ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK $\frac{1}{2}$	Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
FDA	Administración de drogas y alimentos
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FN	Fibronectina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP
GDP	Guanosina di-fosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GTP	Guanosina tri-fosfato
HDAC1	Histona deacetilasa 1
HR-HPV18	Virus papiloma humano de alto riesgo tipo 18
HeLa	Línea celular de carcinoma cervical humano
HIF	Factor inducible por hipoxia
HIN-1	<i>High in normal 1.</i>
HPC1	Gen de cáncer de próstata hereditario 1
HRP	Peroxidasa de rábano
Hsp27	Proteína de golpe de calor pequeña 27
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa humana
HU	Hidroxiurea
I κ B	Inhibidor kappa B
IKK	I kappa B quinasa
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal

kDa	Kilodalton
LS	Lactona sesquiterpénica
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma humano receptor estrógeno positiva
MDA-231	Línea celular de adenocarcinoma humano receptor estrógeno negativa
mDia	Proteína diáfano homóloga 1, 2 y 3
MDM2	Proteína doble minuto murina 2
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasa de la matriz extracelular
MMP-2	Metaloproteasa de la matriz extracelular clase 2
MMP-9	Metaloproteasa de la matriz extracelular clase 9
MT1-MMP	Metaloproteasa de la matriz extracelular, de membrana, tipo 1
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
N-terminal	Amino terminal
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
P38	Proteína 38
p53	Proteína 53
p65	Proteína 65
PAR3/6	Proteínas de partición defectuosa 3 y 6
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
Pi	Fósforo inorgánico
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidil-inositol-difosfato

PIP3	Fosfatidil-inositol-trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
Pro-MMP	Zimógeno de matriz-metalo-proteasa
PTEN	Fosfatasa homóloga a tensina
ROCK	Rho quinasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RTK	Receptor tirosina quinasa
SA-βgal	Beta-galactosidasa Asociada a Senescencia
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SERCA	Bomba de calcio relacionada con el retículo endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
Src	Tirosina quinasa proto-oncogén
TEM	Transición epitelio mesenquimal
Tiam1	Proteína 1 inductora de invasión y metastasis de linfoma de células T
u.a.	Unidades arbitrarias
VASP	Fosfoproteína vasodilatadora
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WASP	Proteína síndrome Wiskott-Aldrich
WAVE	Proteína homóloga verprolina

Términos en inglés

<i>Blebs</i>	Burbuja en la membrana plasmática
<i>Cell tracking</i>	Rastreo celular
<i>Ruffles</i>	Pliegue de la membrana plasmática
<i>Transwell</i>	Cámara de cultivo permeable
<i>Western blot</i>	Transferencia de proteínas a membrana y detección mediante anticuerpos

Resumen

La metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer y se produce como consecuencia de la migración de las células desde el tumor primario hacia otras partes del cuerpo. Luego de la resección quirúrgica, la quimioterapia que se suele utilizar para evitar que se produzcan las metástasis, involucra a drogas muy tóxicas que afectan a las células de división rápida, tanto normales como tumorales. Por eso, actualmente se buscan tratamientos específicos para las células tumorales, que además de destruir a estas, restrinjan su migración hacia otros tejidos. El uso de hierbas medicinales se encuentra extendido por todo el mundo y muchas de estas han llamado la atención de los investigadores por sus propiedades antitumorales. Las lactonas sesquiterpénicas (LSs) son metabolitos secundarios activos, derivados de una gran variedad de plantas, principalmente de la familia *Arteraceae*. Presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y anticancerígena, lo cual las hace muy interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos. Incluso algunas LSs ya se encuentran en ensayos clínicos para varios tipos de tumores. Deshidroleucodina (DhL) es una LS aislada de las hojas de la planta *Artemisia douglasiana Besser*, que crece en la zona nor-oeste de Argentina. Numerosas publicaciones, alientan la investigación de este compuesto para su empleo en el tratamiento de enfermedades humanas. En cuanto a sus propiedades antitumorales, nuestro laboratorio ha demostrado que DhL inhibe la proliferación de varias líneas de células tumorales en cultivo. Específicamente, este compuesto produce la acumulación celular de marcadores de daño del ADN, e induce senescencia o apoptosis, según la concentración utilizada. Además, DhL inhibe el crecimiento de tumores generados en ratones.

Con el fin de demostrar que DhL posee potencial para el desarrollo de fármacos antitumorales, en esta tesis demostramos las propiedades antimetastásicas de este compuesto. Como modelo de estudio, utilizamos células tumorales en cultivo, arrestadas en la fase G1/S del ciclo celular mediante la utilización de hidroxurea. Nuestro principal objetivo fue estudiar el efecto de DhL en la viabilidad celular, la adhesión a la matriz extracelular, la invasión tisular y la migración. Así, en primer lugar analizamos el efecto de DhL en la viabilidad de las células arrestadas con hidroxurea. Los ensayos demostraron que 20 μ M DhL por 24 horas, no afecta la viabilidad, ni induce apoptosis o senescencia en

las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231, arrestadas con hidroxiurea. Además, observamos que el tratamiento con DhL no modifica el arresto de las células HeLa, inducido con HU. En segundo lugar, evaluamos el efecto de DhL en la adhesión de las células tumorales a una matriz de fibronectina. Así, comprobamos que el tratamiento con DhL inhibe la adhesión y expansión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 sobre fibronectina. Además, observamos una disminución de la concentración de vinculina y del número y tamaño de las adhesiones focales. Posteriormente, analizamos el efecto de DhL en la invasión de las células tumorales. Como resultado, observamos que DhL inhibe la invasión del matrigel en las líneas celulares HeLa, B16-F0, B16-F10, MDA-MB-231 y MCF-7, disminuye la actividad de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) en las células HeLa y B16-F0, y reduce la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y p38 en las células HeLa. Por último, estudiamos el efecto de DhL en la migración de las células tumorales. Mediante el ensayo de la herida y de migración transwell, descubrimos que DhL inhibe la migración de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10. Además, el tratamiento con DhL alteró la distribución de los microtúbulos, la polimerización de actina, la protrusión de la membrana y la activación de Rac1. En conjunto, estos resultados nos demuestran que DhL sin afectar la viabilidad de las células, es capaz de alterar varios pasos de la cascada metastásica como son: la adhesión a la matriz extracelular, la degradación del colágeno, la invasión de los tejidos y la migración celular.

ERK es una proteína que se encuentra sobreexpresada en una gran cantidad de procesos tumorales y participa en los procesos de adhesión, invasión y migración celular, a través de su estímulo sobre la formación de las adhesiones focales, la producción de MMPs y la protrusión de la membrana. En base a los antecedentes presentes en el tema y a los resultados desarrollados en esta tesis, concluimos que DhL a través de la inhibición de la señalización de ERK, afecta la adhesión, invasión y migración de las células tumorales en cultivo. Consideramos que nuestro trabajo aporta información valiosa sobre las propiedades antimetastásicas de DhL y esperamos que promueva la futura investigación sobre este compuesto natural para el desarrollo de terapias para el cáncer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma. La metástasis es el proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. En general, el cáncer tiende a llevar a la muerte a la persona afectada, si no se trata adecuadamente. Dado que la migración e invasión de las células tumorales es la clave del proceso metastásico, el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas para controlar estas actividades podría ser el éxito para evitar o tratar esta enfermedad.

Nuestro trabajo intenta aportar evidencia acerca del efecto inhibitorio de Deshidroleucodina en las propiedades metastásicas de las células tumorales. Para eso, a modo de introducción, exponemos en primer lugar el proceso de migración celular, el cual presenta características comunes entre las células tumorales y normales. Luego, realizamos una revisión sobre lo que es el cáncer, como se desarrollan las metástasis y los tratamientos que actualmente se utilizan. Posteriormente, nos enfocamos en las propiedades de una llamativa clase de compuestos naturales, las lactonas sesquiterpénicas, y dentro de estas, ubicamos nuestra atención en la Deshidroleucodina y sus antecedentes.

Estos temas brindan los conceptos necesarios para luego comprender y discutir los resultados de esta tesis.

Migración celular

La migración celular es un amplio término que utilizamos para referirnos al proceso que involucra el traslado de las células de un lugar a otro. Esto puede ocurrir en ambientes artificiales, como vidrio o plástico (comúnmente utilizados en el laboratorio para ensayos *in vitro*), o en ambientes naturales, dentro de complejos organismos multicelulares. Las células migran en respuesta a múltiples situaciones que encuentran durante su vida. Algunos ejemplos incluyen: la embriogénesis, el cierre de heridas o la respuesta inmune. En patologías, la producción anormal de señales migratorias puede estimular el movimiento de las células a lugares inadecuados, lo cual podría tener efectos catastróficos sobre la homeostasis tisular y la salud global del individuo. Algunos ejemplos de migración patológica incluyen los síndromes autoinmunes o el proceso de metástasis, en el cual las células tumorales abandonan el tumor primario y migran hacia tejidos distantes donde generan tumores secundarios [1], [2].

Tanto si las células se encuentran en un organismo vivo o en un sistema de cultivo *in vitro*, pueden presentarse en estado de suspensión, o adheridas a otras células o a la matriz extracelular (MEC). En el caso de una célula en estado de suspensión, cuando esta toma contacto con moléculas adhesivas localizadas en la superficie de otras células, o la MEC, se induce el proceso de adhesión celular. Una vez que la célula se encuentra adherida a un sustrato, el estímulo migratorio puede desencadenar vías de señalización que provocan el movimiento celular, a través de complejos mecanismos que incluyen la reorganización del citoesqueleto y la dinámica de las adhesiones al sustrato.

Existen diferentes modos de migración celular que dependen del tipo de célula y del contexto en el cual estén migrando. En los ensayos *in vitro*, las células suelen estar adheridas a superficies planas, por lo que el movimiento celular se produce de manera bidimensional. En cambio, en los organismos vivos es más frecuente encontrar a las células con una motilidad tridimensional. A pesar de las diferencias, el proceso de migración y su regulación son esencialmente los mismos [3].

Por un lado, las células se pueden mover como entidades individuales, y las características de su movilidad dependerán de varios factores, principalmente, la fuerza de adhesión y el tipo de sustrato, las señales migratorias externas, la flexibilidad mecánica, las

dimensiones y la organización del citoesqueleto celular. Así, las propiedades intrínsecas de la célula interaccionan con el ambiente para producir un modo o fenotipo migratorio. Por ejemplo, las células de movimiento ágil, rápido y cambiante, como las células inmunes, no poseen un citoesqueleto altamente organizado, tienden a adherirse débilmente al sustrato y su movimiento es frecuentemente llamado “ameboide”. El fenotipo ameboide también se observa en algunas células tumorales, en las cuales se producen extensiones de la membrana en forma de burbujas o “*blebs*”, y poseen un citoesqueleto de actina poco organizado. En cambio, los fibroblastos y precursores epiteliales (entre estos las células tumorales de origen epitelial) se hallan en otro extremo. Estas células tienen un citoesqueleto altamente organizado y adhesiones muy elaboradas, y su movimiento es generalmente lento. Cabe señalar que algunas células pueden cambiar entre estos modos de movimiento dependiendo del ambiente en el que se sitúen. Por otro lado, se encuentran las células que se mueven en grupos, formando cadenas, tubos o capas de células, a lo que se denomina migración colectiva [4], [5].

En este trabajo estudiamos la migración celular en un modelo de células epiteliales, por lo que a continuación, revisaremos como se organiza y regula el citoesqueleto de actina, dado que su distribución y función es fundamental para el movimiento de este tipo de células.

Citoesqueleto de actina

La actina es una proteína globular de 40 kDa, muy abundante en la célula y de estructura muy conservada. La formación de los filamentos de actina se produce a partir de subunidades de actina monomérica (actina-G), que polimerizan en un proceso catalizado por la hidrólisis de adenosina-tri-fosfato (ATP). En los filamentos de actina (actina-F), la parte estable esta formada por actina unida a adenosina-di-fosfato y fosfato (actina-ADP·Pi) y la liberación del fosfato, desestabiliza la estructura, lo que favorece la despolimerización del filamento [6]. Los filamentos de actina se encuentran intrínsecamente polarizados, en una estructura con los monómeros orientados hacia un mismo lado. Esto da lugar a un extremo positivo de rápido crecimiento, donde se incorporan nuevos monómeros de actina

y un extremo negativo, que representa el origen del filamento creciente el cual exhibe moléculas de actina-ADP [7].

El alargamiento de los filamentos de actina, que conduce a la formación de estructuras celulares como los filopodios y los lamelipodios, es impulsado activamente por la polimerización y despolimerización de actina y regulado por múltiples proteínas.

Proteínas que se unen a la actina-G: Dos moléculas regulan la disponibilidad de monómeros de actina para la polimerización de los filamentos, profilina y timosina $\beta 4$. Ambas moléculas se unen específicamente a actina-G, pero profilina también puede enlazar proteínas nucleadoras y estimuladoras de la polimerización de actina (por ejemplo, forminas) y funcionar como un intercambiador de monómeros de actina. Por el contrario, como timosina $\beta 4$ no se une a cualquier nucleador, se cree que secuestra actina-G y mantiene un depósito adecuado de monómeros, a disposición de profilina para promover el crecimiento de los filamentos de actina [8] (**Figura 1**).

Proteínas que mantienen la fuente de actina-G: La actina monomérica deriva principalmente de dos fuentes. Una es la síntesis de *novo*. En particular, la síntesis de actina se concentra en los sitios de formación de las protrusiones, según se ha revelado por la presencia de ARN mensajero de β -actina en estas estructuras [9]. La otra fuente la representa el reciclaje de los monómeros de actina, impulsado por la despolimerización de estructuras filamentosas preformadas. La despolimerización es un proceso espontáneo que se produce en los extremos negativos debido al envejecimiento del filamento (donde se encuentra actina unida a ADP), y también, debido a la ruptura del filamento catalizado por el factor de despolimerización ADP "cofilina". Como consecuencia de su función de seccionamiento, cofilina lleva a cabo un doble propósito: crear nuevos extremos libres de los cuales puede reiniciarse la polimerización, y también derribar y despolimerizar antiguas redes para el reciclaje de los monómeros de actina [10] (**Figura 1**).

Proteínas que controlan la polimerización de actina en el extremo positivo: La polimerización en el extremo positivo de los filamentos de actina se produce con mucho más eficiencia que en el extremo negativo. Este proceso está regulado por varias proteínas, que pueden dividirse en dos grupos antagónicos: promotores de la polimerización y proteínas de encapsulamiento.

Los promotores de la polimerización incluyen proteínas nucleadoras directas, por ejemplo, forminas. Estas, son múltiples proteínas que se unen al extremo positivo del filamento de actina y regulan su estabilidad. Funcionan como dispositivos de polimerización porque inician el ensamble de *novο* de filamentos al reclutar los monómeros de actina y usarlos para la nucleación. Si bien existen muchas forminas, las mejores caracterizadas son las proteínas homólogas diáfano 1, 2 y 3 (mDia1, mDia2 y mDia3). Su actividad está regulada por las Rho GTPasas (por ejemplo, RhoA regula mDia1 y Cdc42 regula mDia2). Otras proteínas, como la fosfoproteína vasodilatadora (VASP), también promueven la polimerización de actina, pero no nuclean filamentos de *novο*.

Las proteínas de encapsulamiento por otra parte, limitan el alargamiento de los filamentos de actina. Como ejemplos tenemos a la proteína encapsuladora de filamentos de actina (CapZ) y gelsolina, que en presencia de calcio se unen con alta afinidad a los extremos positivos de los filamentos y evitan la incorporación de monómeros [8] (**Figura 1**).

Proteínas que regulan la nucleación de actina en el extremo negativo: En el lamelipodio, proteínas nucleadoras de actina se unen al extremo negativo de los filamentos y proporcionan un andamio que promueve su polimerización. Esta función se realiza principalmente por el complejo de proteínas relacionadas con la actina 2 y 3 (Arp2/3), un heteroheptámero que se une a los lados de un filamento de actina preformado y promueve la polimerización de este, formando un ángulo de 70° con el filamento preexistente. Esta polimerización con geometría ramificada da lugar a la red dendrítica de actina. El complejo Arp2/3 es activado cerca de la membrana celular mediante fosforilación, mediado por la proteína síndrome Wiskott-Aldrich (WASP) y la proteína homóloga verprolina (WAVE), y a su vez, WASP es regulado por Cdc42 y WAVE por Rac1 [11] (**Figura 1**).

Proteínas de asociación entre filamentos de actina: Ciertas proteínas se unen lateralmente a los filamentos para formar haces paralelos con la misma polaridad (por ejemplo, fascina en los filopodios). En otros casos las proteínas se unen a los filamentos de actina para formar haces antiparalelos, como se observa en las fibras de estrés. Otras proteínas favorecen el entrecruzamiento de los filamentos para formar redes que impiden el libre tránsito de las organelas.

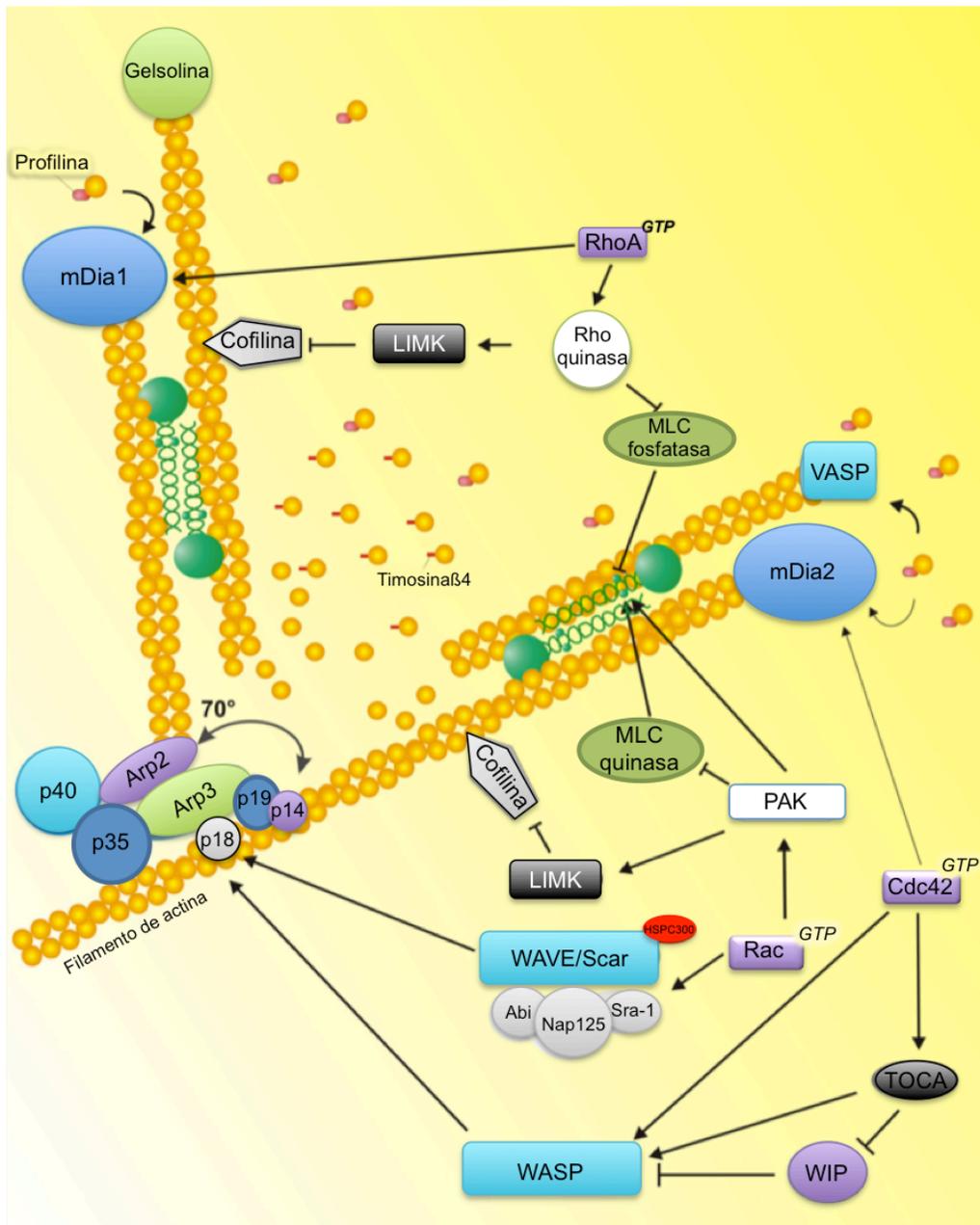


Figura 1. Esquema de los principales mecanismos y moléculas implicadas en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. El complejo Arp2/3 induce la ramificación mediante la adhesión a los lados de un filamento de actina pre-existente y por la promoción de la polimerización de *novo*. Las forminas como mDia1 y mDia2 inducen la polimerización de actina mediante su adhesión al extremo positivo del filamento. Las forminas compiten con las proteínas de encapsulamiento como gelsolina y capZ. Cofilina corta los filamentos de actina y promueve la formación de nuevos extremos positivos. También genera monómeros de actina para ser incorporados a los filamentos a través de profilina/formina (reciclaje). Otra proteína pequeña, timosinaβ4, secuestra los monómeros de actina y mantiene la fuente de monómeros disponibles. Además, se muestran otras proteínas de señalización que controlan estas moléculas. Ellas incluyen: Rho quinasa (ROCK), que se encuentra bajo el control de RhoA y activa a cofilina, WAVE y WASP que activan a Arp2/3, están bajo el control de Rac y Cdc42, respectivamente, finalmente, las forminas son también activadas por pequeñas Rho GTPasas (mDia1 por RhoA y mDia2 por Cdc42) [12].

Proteínas de anclaje a la membrana: Algunas proteínas, tal como la proteína motora miosina I, favorecen la asociación en forma lateral de los filamentos de actina a la membrana. Otras proteínas, en cambio, conectan perpendicularmente los filamentos a la membrana.

Estructuras formadas por los filamentos de actina

Los filamentos de actina adoptan diferentes morfologías según el número de filamentos y el tipo y número de proteínas de unión a actina que se asocian con ellos. Las proteínas de unión a actina, como miosinas, α -actininas, filaminas y otras, tienen actividad de entrecruzamiento y pueden organizar los filamentos de actina en paquetes o una estructura ramificada. Si dos filamentos muestran sus extremos positivos en la misma dirección, el paquete resultante es paralelo. Si los extremos positivos de los filamentos apuntan en direcciones opuestas, el paquete es anti-paralelo. La organización consecuente de los filamentos de actina en paquetes o una red ramificada puede dar lugar a diferentes estructuras celulares.

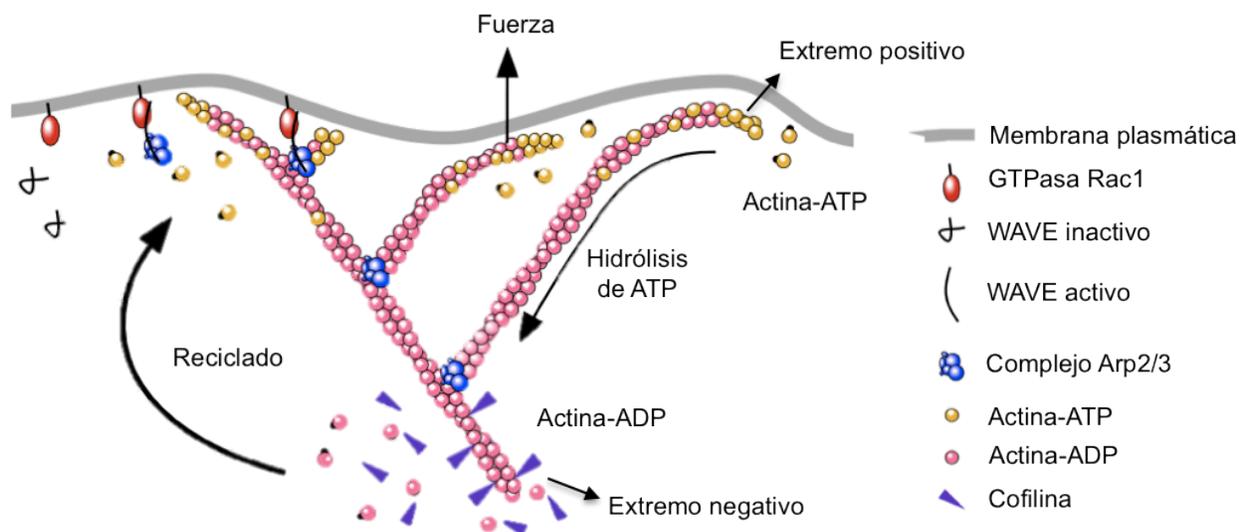


Figura 2. Polimerización de actina en el lamelipodio. El complejo Arp2/3 es activado cerca de la membrana plasmática y adquiere la capacidad de unirse a los lados de los filamentos de actina pre-existentes. De esta manera, favorece la polimerización de un nuevo filamento con un ángulo de 70° y así, se desarrolla la red de actina que empuja la membrana plasmática. Los monómeros de actina-ATP se agregan al extremo positivo del filamento, mientras que en el extremo negativo los monómeros de actina-ADP son eliminados para su reciclaje [11], [13].

Los filopodios son largos y delgados salientes que emergen de la membrana celular. Están hechos de paquetes de filamentos de actina largos, no ramificados, paralelos, a menudo decorados con las proteínas tropomiosina y fascina, y su alargamiento es mediado por forminas. Principalmente son regulados por la pequeña Rho GTPasa Cdc42 y llevan a cabo una función exploratoria, permitiendo a la célula sondear su ambiente local.

Los lamelipodios, en cambio, son amplias protuberancias parecidas a hojas, que contienen una red ramificada de filamentos de actina delgados y cortos. Los lamelipodios son generados por la pequeña GTPasa Rac1 y algunos de sus efectores, en particular WAVE y WASP, que controlan el complejo Arp2/3 (**Figura 2**). Detrás del lamelipodio, a menudo hay otra estructura, la lamela, en la que la actina se encuentra más desordenada que ramificada. El lamelipodio es la región fina ($\sim 1 \mu\text{m}$) más cercana a la membrana, mientras la lamela representa una zona más amplia (5-10 μm) y más cercana al núcleo [14].

En las células también se encuentran las fibras de estrés, las cuales son gruesos manojos de filamentos de actina decorados con miosina II, que particularmente les dota la propiedad contráctil. La pequeña GTPasa RhoA es una reguladora clave de la formación de las fibras de estrés. Estas a menudo se encuentran a lo largo de la porción ventral de la célula y terminan en una gran estructura adhesiva conocida como adhesión focal (AF) [15].

En la lamela, la reorganización de la actina, en lugar de la polimerización, es probablemente el principal mecanismo que genera la arquitectura de esta región. En ella, los filamentos de actina están organizados y agrupados en formaciones gruesas, lineales y en su mayoría anti-paralela, por la acción de dos familias de proteínas de unión a actina: miosina II y α -actinina. Estas proteínas reúnen múltiples filamentos de actina individuales y dan lugar a haces estables. Miosina II también proporciona la fuerza contráctil para el deslizamiento de los filamentos de actina, a través de un cambio conformacional impulsado por su actividad ATPasa. La actividad de miosina II es controlada principalmente por la fosforilación de la cadena ligera reguladora, mediante quinasas que, a su vez, son reguladas por Rho GTPasas, particularmente RhoA. Otras proteínas de unión a actina con función de ramificación, como tropomiosinas y filaminas, también están implicadas en la creación de haces de actina en esta región [8].

Ya sea que las células se muevan de manera individual o colectiva, el proceso de migración básicamente es el mismo y conviene analizarlo como un ciclo de cuatro etapas, las cuales están frecuentemente reguladas por los mismos efectores, independientemente del tipo celular y el modo de migración. Estas etapas que incluyen 1) polarización, 2) protrusión y adhesión, 3) translocación del cuerpo celular, y 4) retracción de la parte posterior de la célula, están coordinadas e integradas por una extensa red de señalización celular (**Figura 3**).

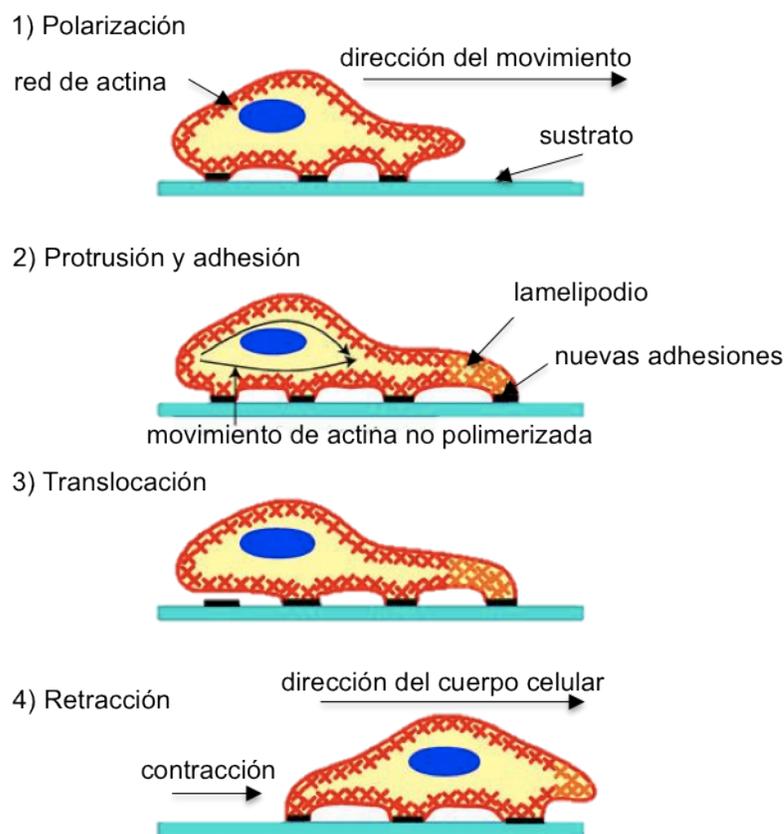


Figura 3. Esquema de las cuatro etapas de la migración celular. Luego de determinar la dirección del movimiento, 1) la célula extiende una protrusión en esa dirección mediante la polimerización de actina en el frente de avance celular. 2) El frente de avance se adhiere a moléculas de la superficie sobre la que se está moviendo y 3) tracciona de ellas para conseguir la translocación del cuerpo celular. 4) Finalmente, en la parte posterior se deshacen las adhesiones al sustrato y se produce la retracción de la parte posterior celular mediante la fuerza contráctil del citoesqueleto [16].

Proceso de migración

Polarización de la célula

La polarización celular se refiere a la tendencia que poseen las células migratorias de estructurar su cuerpo en una parte frontal y una parte posterior. La polaridad, frecuentemente es reforzada o surge en ambientes que proveen una señal direccional. Estas señales direccionales pueden ser quimiotácticas (inducidas por sustancias químicas atractantes), haptotácticas (causadas por variaciones en la concentración de un sustrato), mecanotácticas (por la ruptura de los contactos células-célula como en una herida), electrotácticas (inducidas por campos eléctricos), durotácticas (debido a diferencias en la flexibilidad del sustrato), o combinaciones de alguna de estas. El resultado de estas señales es la formación de un definido frente de avance y parte posterior celular.

El frente de avance celular se caracteriza por ser un sitio de intensa polimerización de actina, que da lugar a la protrusión de la membrana, que posteriormente se adhiere al sustrato. En cambio, la parte posterior celular se caracteriza por contener haces de actina más estables, y por ser el sitio donde se liberan y desensamblan las adhesiones al sustrato. La parte central de la célula, usualmente contiene el núcleo y los microtúbulos, los cuales exhiben diferentes grados de polarización dependiendo del tipo celular [17].

Algunas células se polarizan mediante la formación de un frente de avance en respuesta a agentes externos. Por ejemplo, en células epiteliales en cultivo, el fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) es un lípido, que se produce y localiza en el frente de avance, y el mantenimiento de la polaridad depende de su producción y degradación mediante las proteínas fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y fosfatasa homóloga a tensina (PTEN), respectivamente. La acción polarizada del PI3P es de suma importancia para la migración porque desencadena vías de señalización como las que favorecen la protrusión de la membrana [18]. Además, en el frente de avance se encuentra la pequeña Rho GTPasa Cdc42, que actúa a través de las proteínas de partición defectuosa 3 y 6 (PAR3/6) y la proteína quinasa C (PKC), las cuales también son grandes contribuyentes de la polaridad celular. Por otro lado, en la parte posterior de la célula la polaridad es establecida por la

proteína contráctil, miosina II, la cual produce largos filamentos de actina y miosina que actúan sobre las adhesiones celulares [19], (Figura 4 y 5).

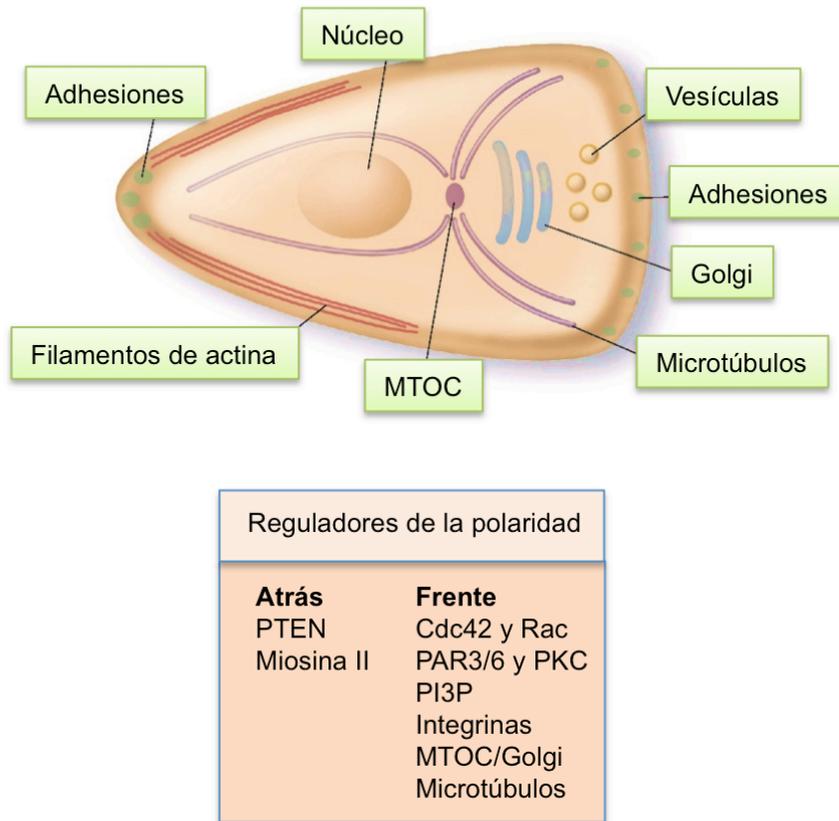


Figura 4. La polaridad durante la migración celular. Cdc42, junto a PAR3/6 y PKC, son las proteínas principalmente involucradas en la generación de la polaridad celular. Pero muchas otras proteínas adicionales también están implicadas, como las encargadas de generar el tráfico de vesículas dirigido hacia el frente de avance, la organización de los microtúbulos, y la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi por delante del núcleo. En presencia de agentes quimiotácticos, el PI3P es producido en el frente de avance a través de la acción localizada de PI3K. En cambio, PTEN es una fosfatasa del PI3P, que reside en la parte posterior celular. PTEN y miosina II están implicadas en restringir la formación de las protrusiones para que estas solo se generen en el frente de la célula [20].

Protrusión de la membrana

La protrusión es la extensión de la membrana plasmática, en la dirección de la migración o frente de avance celular. Posee tres componentes principales: 1) la extensión de la membrana plasmática, 2) la formación de una estructura subyacente que soporta la extensión de la membrana y establece la adhesión al sustrato (las cuales proveen el sitio de

tracción para el movimiento del cuerpo celular), y 3) la señales que regulan la polimerización de actina [21].

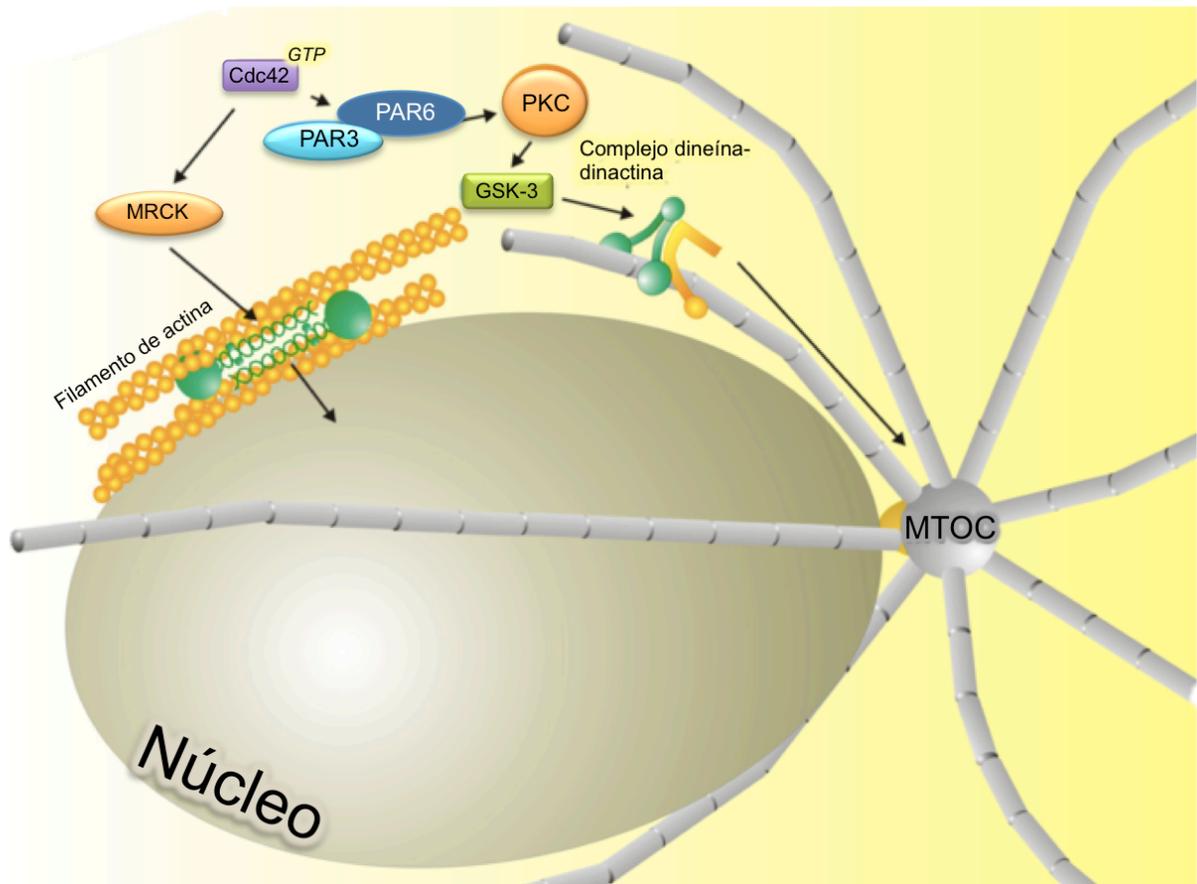


Figura 5. Principales mecanismos que controlan el posicionamiento del núcleo y los microtúbulos durante la migración celular. La pequeña Rho GTPasa Cdc42 actúa a través de los filamentos de actina y miosina II para controlar la distancia y posición del núcleo respecto al MTOC. Cdc42 también controla el módulo PAR3/PAR6/PKC para controlar la dinámica de los microtúbulos a través del complejo dineína/dinactina [12].

Básicamente, la protrusión de la membrana es producida por la reorganización del citoesqueleto de actina. Se conocen 3 tipos de protrusiones, los lamelipodios, los filopodios y los *ruffles*. Los lamelipodios son protrusiones planas y parecidas a un abanico y en estas, los filamentos de actina se encuentran mayoritariamente ramificados. Los filopodios son otro tipo de protrusiones como espigas, los cuales comprenden filamentos de actina organizados en largos haces paralelos. Estas dos formas de protrusiones se piensa que poseen diferentes roles: los filopodios actúan como sensores mecánicos o dispositivos exploratorios, mientras los lamelipodios proveen amplias superficies que generan la

tracción para realizar el movimiento [6]. Además, se encuentran los *ruffles*, los cuales son protrusiones de la membrana plasmática, ricas en filamentos de actina, que se forman cuando el lamelipodio no se adhiere adecuadamente al sustrato, por lo que la membrana forma un pliegue que se retrae hacia el cuerpo celular [22].

Como hemos visto anteriormente, en el desarrollo de las protrusiones de membrana el citoesqueleto de actina juega un papel muy importante, y su organización y regulación es llevada a cabo por una gran variedad de proteínas.

Extensión de la membrana durante la protrusión

Para que se forme la protrusión se requiere de una fuente de membrana plasmática y esto se lleva a cabo gracias al tráfico de vesículas. La pequeña GTPasa Rab8 y los microtúbulos son los encargados de la entrega de vesículas de membrana en el frente de avance celular [23]. Además, la migración celular necesita una endocitosis activa, mediante la cual se produce el reciclaje de las integrinas y otros receptores [24]. Particularmente, las vesículas endocitadas en la superficie dorsal de las células, luego del paso de reciclaje, se dirigen al frente de avance y regulan la polimerización de la actina a través de la entrega localizada de Rac1 activo [25]. Es así, como varios mecanismos celulares actúan simultáneamente para que la reorganización del citoesqueleto de actina y la protrusión de la membrana se desarrollen coordinadamente.

Otros modos de protrusión

En algunos casos concretos, la protrusión parece ocurrir en ausencia de la polimerización de actina. Por ejemplo, las células que invaden una matriz tridimensional generan protrusiones en forma de *blebs*, producidas en un principio, por la presión hidrostática del interior de la célula. En los *blebs*, la contracción de miosina II provee la energía que da lugar a la protrusión de la membrana. En etapas posteriores, el ensamble de actina proporciona estabilidad a estas estructuras, que luego evolucionan a lamelipodios [26].

En resumen, la protrusión resulta de la activa polimerización y la específica reorganización de la actina, y de la extensión de la membrana. Luego, la adhesión, juega un papel clave en la protrusión: no sólo proporciona el lugar de tracción para que la membrana se estabilice, sino que también nuclea componentes y regula la señalización que controla la reorganización de actina, la endocitosis de membrana y su entrega.

Adhesión de la célula

La adhesión de la membrana celular al sustrato ocurre principalmente a través de las integrinas. Las integrinas son una larga superfamilia de receptores heterodiméricos que se unen a diferentes ligandos de la MEC o a receptores que se encuentran sobre otras células. La unión de las integrinas al sustrato es clave para la migración celular debido a que desencadena vías de señalización que regulan la protrusión. También, estas estructuras se encargan de conectar el citoesqueleto de actina al sustrato y de ese modo, proveen el lugar de anclaje para traccionar durante la migración.

Los sitios de adhesión usualmente están restringidos espacialmente y en cuanto al tamaño, varían de pequeños y puntuales (adhesiones nacientes o complejos focales) a largos y elongados (adhesiones focales). La forma, tamaño y rol funcional de las adhesiones varía con su localización subcelular y el tipo de célula. Aquellas adhesiones que se encuentran en el frente de avance (en los lamelipodios), tienden a ser pequeñas, promueven una activa polimerización de actina, y se ensamblan y desensamblan rápidamente. En cambio, aquellas adhesiones que se encuentran más lejos del frente de avance suelen ser más largas, estables y anclan largos haces de filamentos de actina [27].

Las adhesiones focales (AFs) son estructuras formadas por más de 150 moléculas. Algunos componentes forman parte de complejos de señalización celular, como proteínas quinasas y adaptadoras. Paxilina y la quinasa de las adhesiones focales (FAK) son dos proteínas clave de las vías de señalización mediadas por las AFs. Ambas están implicadas en la regulación de las Rho GTPasas, las cuales en la migración, juegan un rol preponderante. La mayoría de las vías que regulan la migración convergen sobre estas GTPasas, las cuales a su vez, regulan la polimerización de actina y su organización, la contracción de miosina y la dinámica de los microtúbulos. Otras proteínas, muy importantes como componentes de las

AFs, simplemente conectan la actina al sustrato a través de las integrinas. Ellas incluyen talina, vinculina y alfa-actinina [28], [29], (Figura 6).

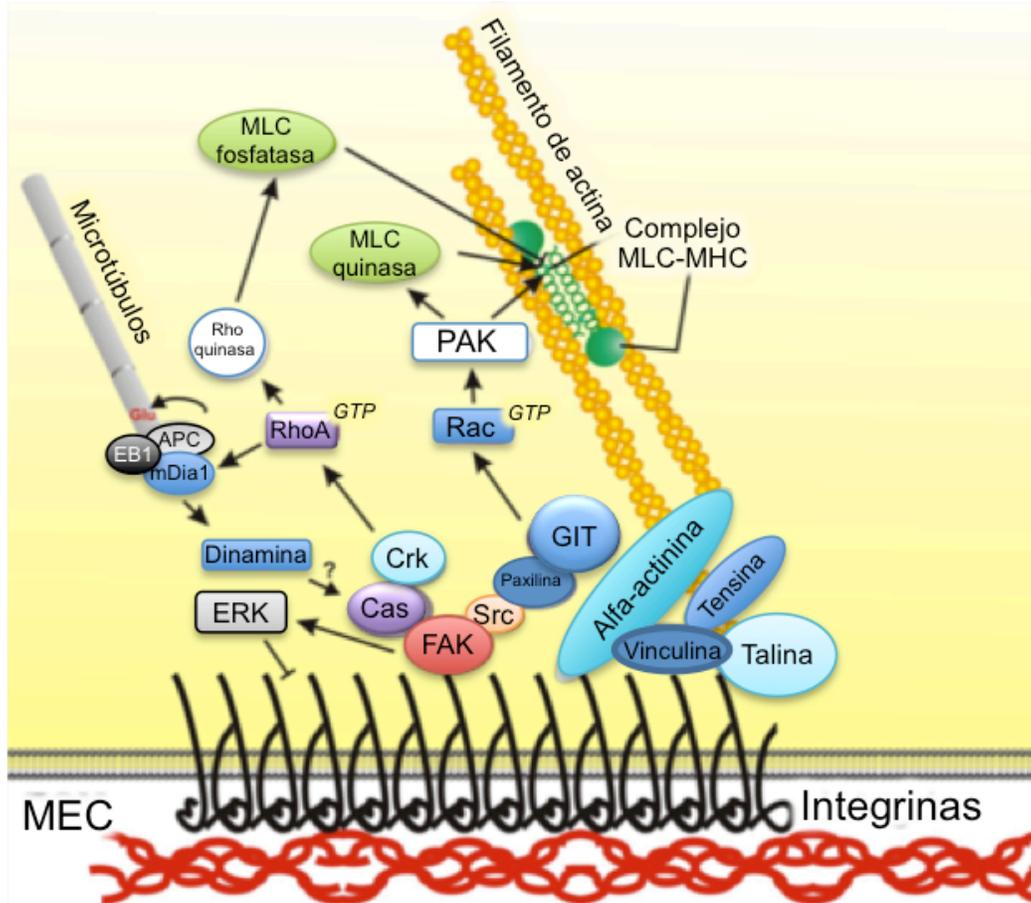


Figura 6. Esquema de la estructura y regulación de las AFs. Las AFs están conectadas al citoesqueleto de actina mediante el vínculo de la actina con talina, vinculina y alfa-actinina, y otras moléculas de señalización que incluyen FAK y paxilina. Estas uniones generan señales que activan Rac y promueven la polimerización de actina. Por otro lado, la activación de RhoA en las AFs incrementa la actividad de miosina II y la contractilidad de la estructura. Otros eventos que ocurren en las AFs son la internalización de las integrinas, mediado por dinamina, y la focalización de los microtúbulos, lo cual contribuye al desensamblaje de las AFs [12].

Translocación del cuerpo y retracción de la parte posterior celular

Para que una célula pueda migrar, la protrusión de la parte delantera y el desplazamiento del cuerpo, deben continuar con la retracción de la parte posterior celular. El desplazamiento del cuerpo de la célula es propulsado por una contracción coordinada del citoesqueleto de actina, miosina y los microtúbulos. Luego, para la efectiva retracción de la

parte posterior celular se requiere el desensamble de las AFs. Varios mecanismos convergen para el desprendimiento de las adhesiones: la contracción del citoesqueleto de actina y miosina, la relajación de las adhesiones inducida por los microtúbulos, la endocitosis de los receptores de adhesión, y el clivaje proteolítico de las proteínas que forman las AFs.

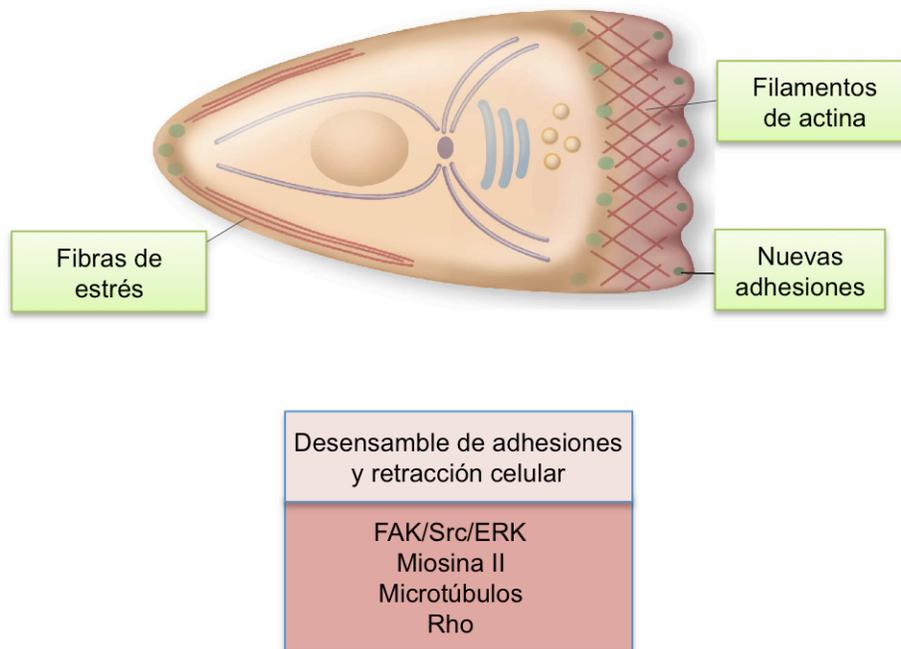


Figura 7. Moléculas claves de la etapa de retracción celular. En la parte posterior de la célula, el desensamble de las AFs da lugar a la retracción de la cola. Este proceso es mediado por varias proteínas como Rho, miosina II y calpaína, vías de señalización que incluyen FAK, la tirosina quinasa proto-oncogén (Src) y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), y el transporte de los componentes por los microtúbulos. Muchas de estas moléculas también regulan el desensamble de las adhesiones en la parte anterior de la célula, justo detrás del frente de avance [20].

Contracción del citoesqueleto de actina y miosina: El citoesqueleto de actina y miosina II promueven la retracción de la parte trasera de las células. Miosina II actúa corriente abajo de RhoA y ROCK, y genera la fuerza para llevar a cabo la retracción y el desensamble de las adhesiones.

Relajación de las adhesiones inducida por los microtúbulos: Los microtúbulos toman contacto con algunas adhesiones, en particular las ubicadas en la parte trasera de la célula, y promueven el desensamble de las mismas. La acción de dinamina y la vía de señalización

FAK/Src/ERK, son también requeridas para el desensamble de las adhesiones, pero todavía se desconoce si son necesarias para la endocitosis, o el estímulo adicional de alguna vía para la relajación de las adhesiones.

Endocitosis de los receptores de adhesión: La endocitosis y reciclado de las integrinas y otros receptores, son mecanismos importantes en la renovación de las adhesiones y por lo tanto, un paso crucial en el control de la migración. Específicamente, durante la migración direccional la endocitosis conduce la internalización y reciclaje de las integrinas a través de la acción de los microtúbulos, FAK, dinamina y varias Rabs.

Clivaje dependiente de calpaína: Las calpaínas son una familia de proteasas involucradas en la retracción de la parte trasera de la célula. Varias proteínas son sustrato de estas enzimas dependientes de calcio. Particularmente, el clivaje de talina y FAK es crítico para la retracción de la parte posterior celular y la migración [30], [31], (**Figura 7**).

Como ya se ha mencionado, para que el ciclo de migración sea continuo, es necesario reciclar algunos componentes. Las integrinas, liberadas luego del desensamble de las AFs, son reclutadas hacia dominios específicos de la membrana plasmática para ser endocitadas. Esta endocitosis suele producirse en la superficie dorsal de la célula, a través de estructuras conocidas como *ruffles* dorsales circulares (CDRs). Los CDRs son proyecciones de la membrana ricas en actina-F. Su formación comienza como un *ruffle* inmaduro, plano y abierto, y de forma progresiva se transforma en un *ruffle* circular que se cierra totalmente. Estos anillos, posteriormente se contraen y se hunden en el citoplasma. Los CDRs son formaciones transcientes, altamente dinámicas, con una función crítica en la internalización de receptores de membrana, particularmente de las integrinas. Luego de la internalización, las integrinas transitan a través de los compartimientos endosomales de reciclaje para formar nuevas AFs en el frente de avance celular [32], [33].

Regulación e integración

Los procesos de polarización, protrusión, adhesión, translocación y retracción celular son regulados por complejas redes de señalización iniciadas por integrinas y otros receptores. En el centro de esta regulación se encuentran grandes estructuras de

señalización, asociadas y organizadas por proteínas adaptadoras multidominio y lípidos de membrana. Así, estas estructuras localizan y activan proteínas quinasas y fosfatasa que contribuyen a la integración de los procesos que median la migración celular [34].

El estímulo de la migración se inicia en la superficie celular y desencadena una estrecha regulación espacio-temporal, de múltiples redes de señalización entrelazadas. La señalización puede comenzar a través de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), las integrinas, los receptores para factores de crecimiento y otros. La complejidad de esta red interconectada se observa por ejemplo, en la sinergia que existe entre los receptores para factores de crecimiento y las integrinas. En la **Figura 8** se presenta un esquema simplificado de algunos de los intermediarios de señalización entre los receptores y la familia de Rho GTPasas, RhoA, Rac1 y Cdc42. Muchos de estos receptores se agregan en respuesta a los estímulos extracelulares y finalmente organizan estructuras de señalización.

Las respuestas a nivel de los receptores de membrana incluyen: la actividad quinasa intrínseca en algunos receptores para factores de crecimiento, que lleva a la fosforilación de efectores proximales. En otros casos, la activación ocurre a través de un cambio conformacional luego de la unión del ligando, que desencadena la asociación o disociación de efectores corriente abajo. Estas señales iniciales luego se propagan a lo largo de una o varias ramas de una compleja red interconectada, de intermediarios que eventualmente llegan a la familia de las Rho GTPasas.

Las Rho GTPasas son esenciales para la migración de las células y actúan a través de efectores, para regular, entre otros procesos, la polimerización, organización y contracción de actina, la estabilidad de los microtúbulos e incluso, la transcripción de genes que promueven la motilidad celular [35]. La activación de las Rho GTPasas ocurre a través de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEFs), las cuales anteriormente fueron estimuladas por la activación de los receptores de membrana. Luego, cada miembro de las Rho GTPasas controla efectores específicos, de manera que cada una puede regular diferentes aspectos de la organización celular necesaria para una migración celular eficiente [20], [24].

Dado que las distintas etapas de la migración celular se encuentran específicamente reguladas, cualquier alteración producida en alguna de las moléculas que participan en este proceso puede tener implicancias patológicas.

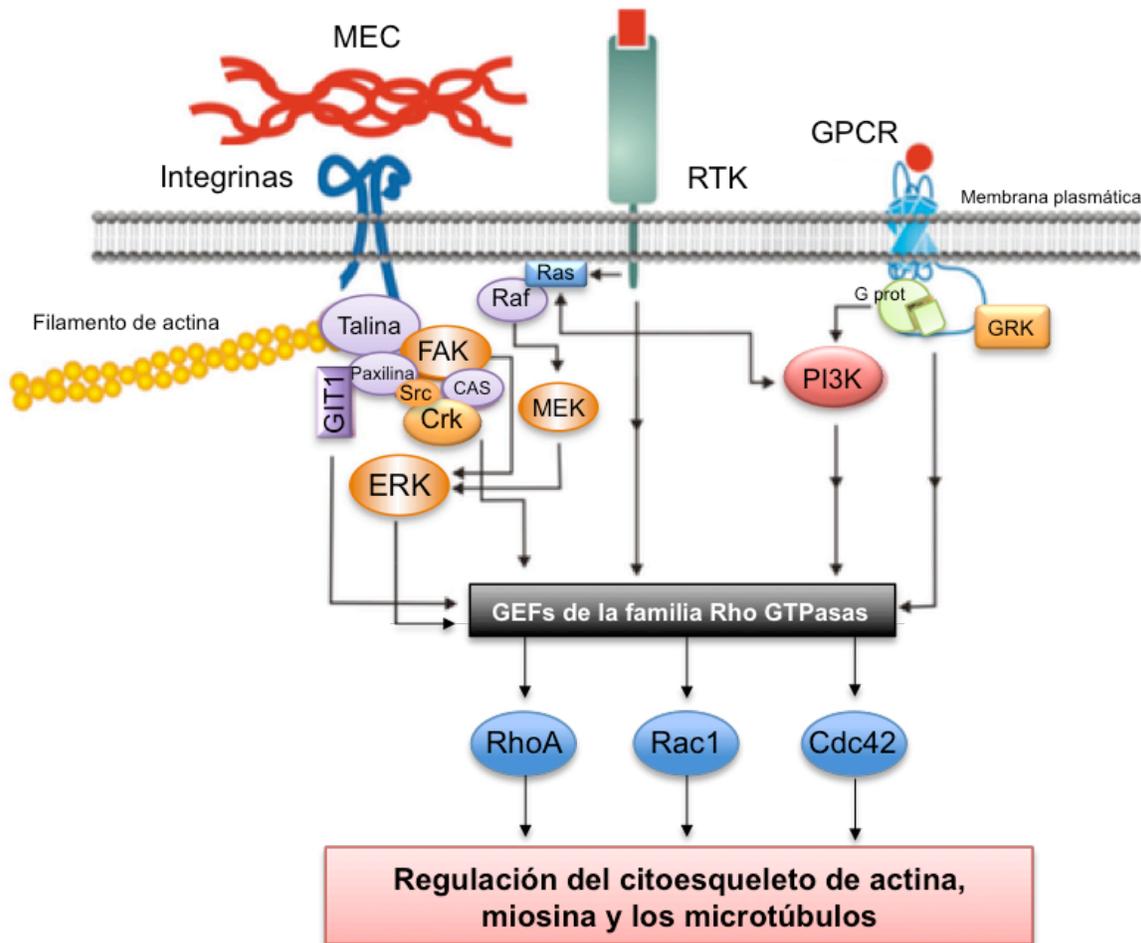


Figura 8. Vías de señalización activadas por receptores de la membrana plasmática, que incluyen las integrinas, los receptores tirosina quinasa (RTK) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El diagrama enfatiza un punto de señalización convergente, de los activadores de las Rho GTPasas, cuya acción final involucra la organización y remodelado del citoesqueleto de actina, miosina y los microtúbulos [12].

Patologías relacionadas con la migración celular

La regulación de la migración celular es un proceso complejo que involucra cientos de moléculas. Debido a esto, la falta o alteración de alguno de sus componentes puede producir una desregulación. El resultado de tales desregulaciones va a estar determinado por las moléculas implicadas y las células afectadas.

En el desarrollo embrionario, las alteraciones en la migración celular puede tener consecuencias catastróficas. Por ejemplo, la supresión genética de un receptor clave quimiotáctico, provoca alteraciones importantes que incluyen anormalidades del cerebro y el corazón, y linfopoyesis defectuosa. En el organismo adulto, la debilitación de la migración retrasa la cicatrización de heridas o deteriora la respuesta inmune.

En los síndromes inflamatorios crónicos, tales como asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis y enfermedad Crohn's, también se encuentra alterada la migración celular, es decir, se produce la constante infiltración de células inmunitarias en lugares inapropiados. Una vez que estas células se localizan de forma anormal en un tejido, se activan y causan daños masivos y deterioro progresivo.

En la aterosclerosis, la lesión vascular conduce a la disfunción endotelial, que, a su vez, promueve la expresión de marcadores inflamatorios y la migración transendotelial de leucocitos. El reclutamiento de leucocitos desde la circulación a la íntima del vaso, es un paso crucial para el desarrollo de placas fibrosas. Las citoquinas producidas en respuesta a la reacción inflamatoria, estimulan la expresión de moléculas de adhesión en la célula endotelial, e inducen la proliferación y la migración de las células musculares lisas.

Finalmente, la migración celular también contribuye al proceso de formación de metástasis. Las células tumorales migran como células individuales o en grupos pequeños, para difundir desde el sitio inicial de crecimiento del tumor. Adquieren un fenotipo invasivo caracterizado tanto por la pérdida de las interacciones célula-célula, como por una movilidad celular creciente. La migración de las células tumorales típicamente está regulada por las integrinas, las enzimas degradadoras de la matriz extracelular y las moléculas de adhesión célula-célula. Varias citoquinas y factores de crecimiento han demostrado estimular la invasión, y se encuentran sobreexpresados en una variedad de tumores [36].

El hecho de que la migración celular tenga un papel muy importante en el desarrollo de las metástasis, impulsa la intensa investigación acerca de las vías involucradas en la motilidad de las células. Como resultado de esos estudios, se espera descubrir nuevos blancos terapéuticos para evitar esta patología.

Cáncer y metástasis

El cáncer es una enfermedad que se produce por un daño genético que altera las funciones normales de la célula, que incluyen la proliferación, la apoptosis y la reparación del ADN. La acumulación de varias alteraciones en los genes incrementa el riesgo de cáncer. Básicamente, la proliferación celular incontrolada da lugar a masas tumorales que afectan la función de los órganos y tejidos en los que se sitúan, y pueden también invadir otras partes del cuerpo. No todos los tumores son malignos. Los tumores benignos suelen tener un crecimiento lento, no invaden los tejidos vecinos y quedan confinados en un lugar determinado, por lo que pueden ser extraídos fácilmente mediante cirugía. En cambio, los tumores malignos crecen rápidamente, invaden los tejidos vecinos y dan lugar a metástasis [37].

Las causas de riesgo de desarrollar cáncer incluyen el tabaco, ciertas infecciones, radiación, sedentarismo, obesidad, contaminación ambiental y fallas genéticas hereditarias. Hay que tener en cuenta que la historia familiar es un importante factor de riesgo en la mayoría de los tipos de cáncer.

En el mundo occidental, el cáncer de pulmón es el que más muertes produce y está fuertemente asociado al consumo de tabaco. En la mujer, el cáncer de mama es el más frecuente y el 10% de estos se debe a la herencia de una mutación genética específica en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama 1 y 2 (*BRCA1* y *BRCA2*). El resto de los casos se atribuyen a la acción de múltiples genes.

En el hombre, el cáncer de próstata es la segunda causa de muerte relacionada con tumores. Aparece luego de los 50 años, es de crecimiento lento, pero suele extenderse a los nódulos linfáticos y a los huesos. Los principales factores de riesgo son la obesidad, la edad avanzada y la historia familiar. Los hombres que tienen un familiar de primer grado con cáncer de próstata tienen el doble de riesgo de padecerlo. Si bien se piensa que muchos genes están implicados en el desarrollo de este tipo de cáncer, las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, el gen del cáncer de próstata hereditario 1 (*HPC1*), el receptor androgénico, el receptor de vitamina D y *PTEN*, son las más frecuentes [38].

La metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer. Es la propagación del cáncer desde un tumor primario hacia otras partes del cuerpo. Esto ocurre

porque en el tumor primario se produce un daño genético progresivo, que da lugar a células tumorales con un fenotipo maligno, que les permite invadir los tejidos vecinos, ingresar en la circulación sanguínea o linfática y colonizar tejidos distantes [39].

El proceso metastásico, también llamado “cascada metastásica” se desarrolla en una serie de pasos esquematizado de la siguiente manera. Las células del tumor primario: 1) invaden localmente la MEC, 2) ingresan a la luz de los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación), 3) son transportadas por la circulación sanguínea o linfática, 4) quedan atrapadas en la vasculatura de órganos distantes, 5) se produce la extravasación en el parénquima de los órganos distantes, 6) sobreviven en un microambiente foráneo para formar micrometastásis y 7) reinician un programa proliferativo que da lugar a las metástasis macroscópicas que pueden ser detectadas clínicamente [40], (**Figura 9**).

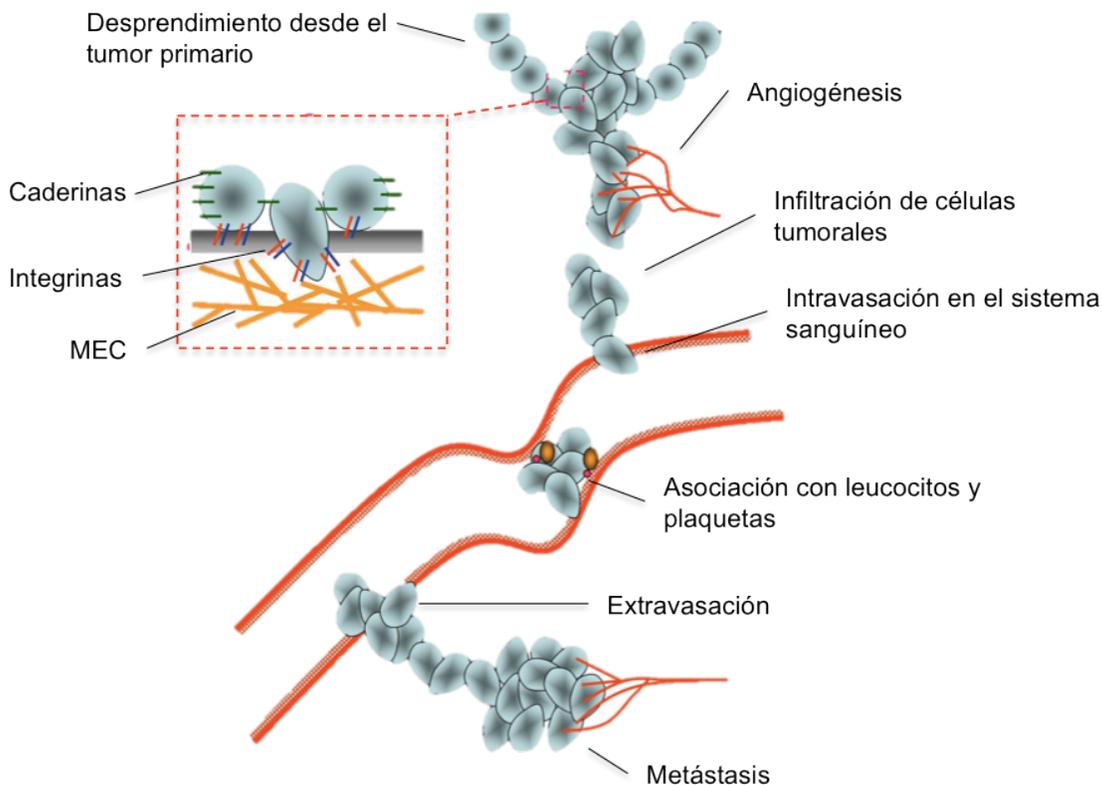


Figura 9. Invasión tumoral y metástasis. Las metástasis son eventos biológicos complejos que se producen mediante la sucesión de los siguientes pasos: 1) Las células presentes en el tumor primario rompen las uniones intercelulares y degradan la MEC para invadir los tejidos adyacentes, 2) ingresan a los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación), 3) se adhieren a leucocitos y plaquetas para sobrevivir el transporte a través de la vasculatura, 4) quedan atrapadas en órganos distantes, 5) sufren la extravasación en el parénquima de los tejidos distantes, 6) sobreviven en un microambiente foráneo para formar micrometastásis, y 7) reinician un programa proliferativo para generar una masa tumoral secundaria [40].

Cascada metastásica

Invasión local

La invasión local del tejido tumoral es el primer proceso que se produce durante el desarrollo de la metástasis. Esto significa que las células tumorales se separan del tumor primario y penetran en el estroma que circunda al tumor. Para esto, las células tumorales liberan proteasas, conocidas como metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) que degradan la MEC y así, consiguen liberar factores de crecimiento, citoquinas y componentes que se encuentran atrapados entre las fibras del tejido. De esta manera, se inician una serie de eventos que regulan la adhesión, migración, invasión y sobrevida de la célula tumoral [41].

Las metaloproteasas de la matriz extracelular

Una vez que las células tumorales invaden el tejido que rodea el tumor, interaccionan con una variedad de células estromales, como fibroblastos, macrófagos y otras células del sistema inmune. Las células estromales son capaces de ayudar a la célula tumoral en el proceso de invasión, mediante la liberación de factores de crecimiento o sustancias quimiotácticas que favorecen la metástasis [42]. La invasión local le permite a las células tumorales alcanzar un objetivo crucial de la metástasis: acceder a los vasos sanguíneos y linfáticos que les permitirán transportarse hacia tejidos lejanos [43], (**Figura 10**).

Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc, que pertenecen a una gran familia de proteasas que degradan los componentes de la MEC. Colectivamente, son capaces de degradar todo tipo de proteínas de la MEC, y además pueden procesar moléculas bioactivas. Es por eso que también son conocidas por estar involucradas en el clivaje de receptores de la superficie celular, la liberación de ligandos apoptóticos y la activación de citoquinas. Las MMPs juegan roles muy importantes en el comportamiento de la célula, como son la proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis.

Estas enzimas inicialmente son sintetizadas por la células como zimógenos inactivos, con un dominio propéptido que debe ser removido para que la proteína sea activa. Luego de ser secretadas como proenzimas, requieren de su activación extracelular mediante clivaje proteolítico [44], [45].

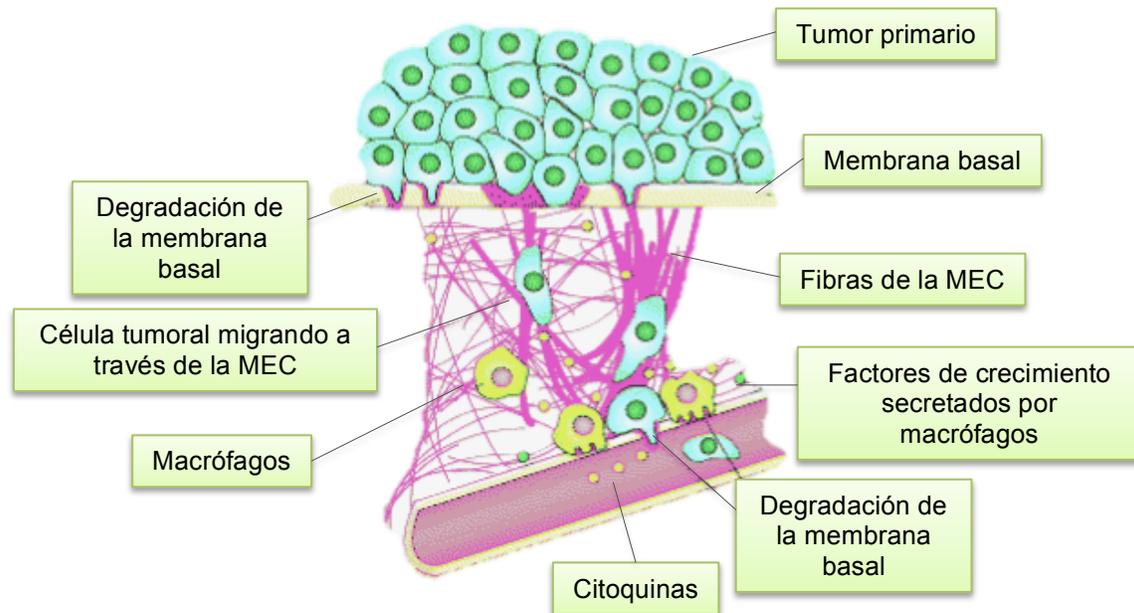


Figura 10. Proceso invasivo durante la progresión tumoral. Las células tumorales se escapan del tumor primario mediante la degradación de la membrana basal y las fibras de la MEC por la acción de proteasas. Los macrófagos y otras células del sistema inmune secretan factores de crecimiento y citoquinas que atraen a las células tumorales y las estimulan a migrar. Las células tumorales que llegan a los vasos sanguíneos y linfáticos tienen la posibilidad de dirigirse a otros tejidos de cuerpo y producir un tumor secundario [46].

Las MMPs, son muy estudiadas porque participan en el remodelado tisular asociado a varios procesos tanto fisiológicos como patológicos (entre los últimos se encuentran la angiogénesis y la metástasis). Las MMPs -2 y -9 se consideran las más involucradas en el proceso metastásico. La MMP-2 posee un peso molecular de 72 kDa, es secretada por las células tanto tumorales como estromales, y es capaz de degradar sustratos que incluyen la gelatina y el colágeno tipo I, II, III, IV, VII y X. La MMP-9 posee un peso molecular de 92 kDa, es también secretada por las células tumorales y estromales, y degrada sustratos como la gelatina y el colágeno tipo IV y V [47], [48]

Las MMPs -2 y -9 se consideran marcadores del proceso invasivo tumoral debido a que una gran cantidad de publicaciones demuestran la contribución de estas proteasas en la degradación de la MEC, la activación de factores de crecimiento, la estimulación de la angiogénesis y la migración celular [47], [48], [49].

Intravasación

Una vez que la célula tumoral atraviesa el tejido que circunda el tumor, debe ser capaz de ingresar a la vasculatura para ser transportadas a lugares distantes. La entrada de la célula tumoral a la luz de los vasos sanguíneos o linfáticos se llama intravasación, y este proceso suele ser facilitado por factores de crecimiento y citoquinas, que por un lado estimulan la angiogénesis y por el otro favorecen la quimiotaxis de las células tumorales [50], (Figura 9 y 10).

Circulación sanguínea o linfática

Una vez que la célula se encuentra en la circulación sanguínea o linfática, debe superar varios obstáculos. Por un lado, las células tumorales deben ser capaces de resistir las fuerzas hemodinámicas de la circulación y la predación de las células del sistema inmune. Esto lo consiguen principalmente adhiriéndose a las plaquetas, con las que forman cúmulos y logran de esta manera viajar protegidas (Figura 9).

Por otro lado, la célula tumoral debe soportar la falta de adhesión a la MEC, que normalmente es esencial para la vida de la mayoría de las células. Porque las células epiteliales suelen sufrir una muerte celular programada llamada anoikis, inducida por la ausencia de adhesión a un sustrato. Pero, a favor de la cascada metastásica, la mayoría de las células tumorales quedan atrapadas en los capilares pocos minutos después de la intravasación. Así, las células pasan poco tiempo en la circulación como para que se desencadene la anoikis [51].

Arresto en órganos distantes y extravasación

Las células tumorales suelen tener tropismo tisular lo que significa que producen metástasis en determinados órganos. Influenciadas principalmente por interacciones ligando-receptor, las células quedan atrapadas en la microvasculatura de órganos específicos, y pueden extravasar de forma activa hacia el parénquima tisular. En otros casos, las células pueden iniciar el crecimiento intraluminal formando microcolonias. Luego, el crecimiento de las microcolonias rompe las paredes de los vasos, y las células tumorales son volcadas directamente en el tejido [52].

Sobrevida en un microambiente foráneo

El sitio metastásico difiere del ambiente del tumor primario, porque presenta diferentes células del estroma, arquitectura de la MEC, factores de crecimiento y citoquinas. Las células tumorales solucionan el problema de un ambiente incompatible con su vida al generar un nicho pre-metastásico. Esto significa que antes de que lleguen las células tumorales a un nuevo lugar, se producen una serie de eventos que modifican el sitio de metástasis (inducen la movilización de factores de crecimiento, la modificación del estroma celular y la arquitectura de la MEC) y lo convierten en un lugar adecuado para el asiento de las células metastásicas [42], [53].

Colonización metastásica

Para que la metástasis sea exitosa, las células que llegan a un órgano distante deben ser capaces de proliferar hasta formar metástasis macroscópicas. Pero la mayoría de las células persisten como microcolonias en estado dormido (quiescentes), y otras células proliferan continuamente, pero no ocurre un incremento neto debido a que mueren por apoptosis. En muchos carcinomas, el estado quiescente de las células metastásicas se atribuye a la falta de activación de las vías de señalización que controlan la adhesión y proliferación celular. La posibilidad de escapar de la quiescencia y comenzar a proliferar depende de que cambien las condiciones del ambiente.

Se sabe que aunque las células son continuamente liberadas por el tumor primario y diseminadas ampliamente por la circulación vascular, solo se genera metástasis cuando las células son capaces de adaptarse al tejido, sobrevivir y proliferar. Esto sucede gracias a la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas en las células tumorales, y a la cooperación de las células estromales [40].

Se dice que la metástasis es un proceso ineficiente porque aunque muchas células tumorales pueden ser detectadas en la sangre de pacientes con carcinoma, incluido en aquellos que desarrollan pocas o ninguna metástasis, menos del 0,01% de las células tumorales circulantes desarrollan metástasis macroscópicas. Si bien más del 80% de las células tumorales circulantes logran la extravasación luego, menos del 3% de las células implantadas en los tejidos logra sobrevivir. Después, el proceso de colonización es todavía menos eficiente porque muchas células persisten en los tejidos de manera viable, pero en estado dormido, y solo unas pocas sufrirán una evolución genética y/o epigenética para competir la colonización metastásica [54].

Debido a que las metástasis son responsables de aproximadamente el 90% de la mortalidad asociada al cáncer, nuevas dianas terapéuticas representan áreas de gran necesidad en la investigación de esta patología. Los avances recientes han aportado nuevos conocimientos sobre los cambios biológicos celulares y moleculares, que están implicados en la progresión metastásica, y parecen ser potenciales objetivos terapéuticos.

Tratamiento del cáncer

Tratamientos convencionales

Está bien establecido que el riesgo de que aparezca una nueva malignidad es mayor en aquellas personas que ya han sobrevivido a uno o más casos de cáncer que la población en general. Los adultos sobrevivientes de un cáncer que padecieron en la niñez, tienen 6 veces mayor riesgo de desarrollar otro cáncer que el resto de las personas. Sin embargo, la probabilidad de cáncer secundario es más alta entre aquellos diagnosticados de su primer cáncer en la edad de 50 a 69 años [55].

El cáncer suele ser tratado con cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia celular y con anticuerpos monoclonales. En muchos casos, los carcinomas pueden ser removidos por cirugía, pero cuando el cáncer ha hecho metástasis, la eliminación completa por cirugía es imposible. Además, hay que tener en cuenta que incluso los tumores pequeños y localizados tienen potencial metastásico. Es por eso que la cirugía se combina con otros tratamientos para tratar el cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia.

La quimioterapia suele realizarse con drogas citotóxicas que afectan a las células de división rápida. Estas drogas interfieren con la división celular porque inhiben la duplicación del ADN o la separación de los cromosomas. Las drogas antitumorales que actualmente se utilizan involucran a los agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides derivados de plantas e inhibidores de la topoisomera [56].

Los agentes alquilantes tienen la habilidad de unirse a los grupos funcionales nucleofílicos presentes en las células. El cisplatino es el más usado y bloquea la función celular al formar puentes covalentes con los grupos aminos, carboxilos, sulfidrilos y fosfatos de importantes moléculas biológicas [57].

Los antimetabolitos, son sustancias que ocupan el lugar de las purinas y pirimidinas durante la construcción del ADN. Así, frenan a las células en la fase S del ciclo celular y también interfieren en la síntesis del ARN. Estas drogas se usan comúnmente como citostáticos.

Los alcaloides de plantas, son terpenoides que frenan la división celular, porque usualmente bloquean la función de los microtúbulos. Ejemplos de estos son los alcaloides

de la vinca y los taxanos. La vincristina y vinblastina son alcaloides de la vinca que se unen a la tubulina y no permiten el ensamble de los microtúbulos. Y dentro de los taxanos, el más conocido es el paclitaxel, que deriva de un producto natural llamado taxol, El paclitaxel aumenta la estabilidad de los microtúbulos y evita la separación de los cromosomas [58], [59].

Por último, están los inhibidores de las topoisomerasas, como el topotecan. Este, interfiere con la transcripción y la replicación del ADN, porque inhibe a las enzimas esenciales para mantener la topología del mismo [60].

Los tratamientos clásicos del cáncer, como suelen afectar a la vez, la proliferación de las células normales y tumorales, son terapias muy tóxicas. Por eso, actualmente los investigadores buscan desarrollar tratamientos específicos, basados en la patología molecular del cáncer en cuestión, y aunque ha habido algunos éxitos notables de agentes dirigidos a vías de señalización oncogénicas (por ejemplo, imatinib, trastuzumab, erlotinib, gefitinib) [61], todavía existe un largo camino por recorrer.

Las terapias primordialmente dirigidas contra el cáncer, intentan bloquean el crecimiento y la diseminación del tumor, al interferir con moléculas específicas del proceso tumoral. Así estas terapias pueden ser más eficaces y menos perjudiciales para las células normales. El mecanismo de acción de las terapias específicas involucran el bloqueo de enzimas y la señalización de receptores de factores de crecimiento que intervienen en la proliferación de las células tumorales. Otras terapias pueden inhibir la función de proteínas que regulan la expresión génica o inducir a las células tumorales a experimentar apoptosis. También, existen terapias que bloquean la angiogénesis, y dado que los tumores necesitan del suministro de sangre para obtener oxígeno y nutrientes, como respuesta se produce la inhibición del crecimiento tumoral. Además, se encuentran las terapias que estimulan al sistema inmune a destruir a las células tumorales, y los anticuerpos monoclonales que pueden entregar específicamente moléculas tóxicas a las células transformadas [62].

Algunas de estas terapias ya han sido aprobadas por la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de determinados tipos de cáncer. Otras, se están estudiando mediante ensayos clínicos, y muchas más se encuentran en ensayos preclínicos (estudios de investigación con animales).

Una consideración clave en el diseño de agentes quimioterápicos antitumorales es el hecho de que los pacientes con cáncer con frecuencia ya albergan un número significativo de células tumorales diseminadas en su sangre, médula ósea y órganos distantes del lugar de presentación inicial. En consecuencia, la terapéutica antitumoral verdaderamente eficaz debería ser capaz de intentar bloquear el escape de las células del tumor primario y alterar la proliferación y supervivencia de las células ya diseminadas.

Las terapias antimetastásicas son aquellas que inhiben alguno de los pasos de la cascada metastásica. Dentro de estas se encuentran las terapias que reducen la migración de las células tumorales. Año a año aumenta considerablemente el número de publicaciones relacionadas con terapias enfocadas en la motilidad celular. Se piensa que estos tratamientos serían útiles para acompañar a la terapia clásica del cáncer porque limitarían la invasión tumoral local, restringiría la evolución de las células hacia un fenotipo metastásico y evitaría la diseminación a distancia.

La migración de las células tumorales depende de la interacción tumor-hospedador, de la estructura del tejido y de un perfil de expresión génica pro-metastásico. Por eso, se cree que poseen un tremendo potencial para ser utilizadas en la clínica, las terapias dirigidas a limitar la interacción de las células tumorales con la MEC, bloquear el estímulo producido por factores solubles, inhibir el remodelado del citoesqueleto, evitar la degradación de la MEC y restringir la señalización de factores de transcripción que promueven un fenotipo migratorio. Entre los muchos inhibidores de la migración que ya se encuentran en desarrollo clínico tenemos a dasatinib (inhibidor de Src), emodin (inhibidor de Rac1 y Cdc42), trastuzumab (inhibidor de la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico), endostatin y curcumin (inhibidores de MMPs) y PF-562271 (inhibidor de FAK) [63].

A pesar de que las investigaciones sobre quimioterapia antitumoral han conseguido generar medicamentos más específicos para el tratamiento del cáncer, muchos de estos todavía poseen efectos secundarios indeseables. Eso ha dado lugar a una intensa búsqueda de compuestos naturales, que posean efecto antitumoral específico y muy pocos efectos secundarios. En base a esto, actualmente los productos naturales representan un papel importante en el desarrollo de fármacos, tanto para la terapia adyuvante como para la prevención del cáncer [64].

Tratamientos con productos naturales

Durante más de 40 años, La búsqueda de compuestos naturales que derivan de plantas (metabolitos secundarios) ha proporcionado una serie de útiles drogas antitumorales. En la quimioterapia actual el 74% de las drogas anticancerígenas derivan de productos naturales. Sin embargo, muchas fuentes de estos productos siguen estando a la espera de ser explotadas. Un amplio espectro de metabolitos secundarios vegetales son extraídos de frutas, verduras, té, especias y hierbas medicinales tradicionales, y muestran potentes efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antitumorales. Los recientes avances han demostrado la actividad de muchos compuestos naturales en la inhibición de la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis tanto *in vitro* como *in vivo*. Más aun, algunos fitocompuestos han mostrado suprimir no solo la acción de las células tumorales, sino también los diversos roles de las células estromales asociadas al tumor (como fibroblastos y macrófagos) [65].

Dentro de los fitocompuestos tenemos a los terpenos, que constituyen la clase más grande de productos naturales y una rica fuente de compuestos para el descubrimiento de nuevos fármacos. Los terpenos se han clasificado en cinco categorías según la estructura química, a saber, monoterpenoides, sesquiterpenoides, clerodanos, triterpenoides y tetraterpenoides. Los recientes esfuerzos en la investigación del cáncer han llevado a la identificación de una variedad de terpenos que inhiben la proliferación de células tumorales y la formación de metástasis [66].

A pesar de que la actividad antitumoral de los terpenos parece prometedora para el tratamiento del cáncer, los estudios actuales están restringidos a hallazgos descriptivos. Por lo tanto, los actuales y futuros esfuerzos en la identificación sistemática de los terpenos aumentará las posibilidades de avanzar en el campo farmacológico.

Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas (LSs) son productos naturales (metabolitos secundarios activos), derivados de una gran variedad de plantas, principalmente de la familia *Asteraceae*, que se utilizan en la medicina tradicional. Las distintas especies de plantas generalmente producen un tipo de LSs, que se concentra en las hojas y flores, y su porcentaje por peso seco puede variar de 0,01% a 8% [67].

Se ha visto que las LSs tienen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y anticancerígena, lo cual las hace muy interesantes en la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos. Como antimicrobianos, las LSs han mostrado toxicidad frente a bacterias, parásitos, virus y hongos. En cuanto a la acción antiinflamatoria, se sabe que las LSs inhiben la activación de los macrófagos y disminuyen la producción de los lipopolisacáridos, las prostaglandinas y el óxido nítrico. Por otro lado, la actividad anticancerígena de las LSs se atribuye a que inhiben la proliferación e inducen apoptosis en varias líneas de células tumorales y disminuyen el crecimiento de tumores en modelos animales [68], [69].

En los últimos años, las propiedades anticancerígenas de las LSs han generado gran interés y una gran cantidad de trabajos de investigación se han realizado para caracterizar los mecanismos moleculares de estos compuestos, para su aplicación en la prevención y el tratamiento del cáncer [55].

Actividad biológica

Químicamente, las LSs son terpenoides formados por la condensación, cabeza con cola, de tres unidades isoprenoides y el subsiguiente ciclado y transformación oxidativa para producir una *cis* o *trans* lactona. Según su esqueleto molecular, las LSs se clasifican en germacranólidos, heliangólidos, eudesmanólidos, guaianólidos y pseudoguaianólidos [70], (Figura 11).

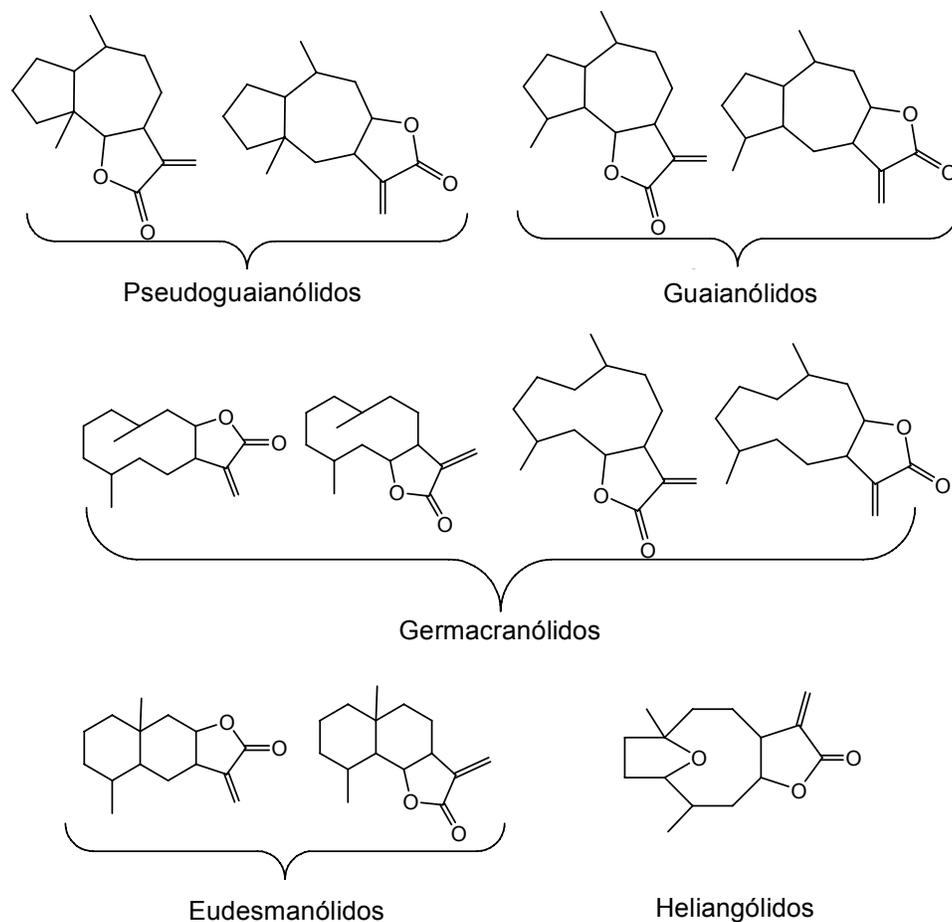


Figura 11. Estructura básica de las LSs [71].

En las LSs, las estructuras reactivas o “centros alquilantes” son el grupo carbonilo alfa-beta-insaturado y el anillo alfa-metilen-gama-lactona, que además tienen incorporado en muchos casos, grupos hidróxilos, éster o epóxido. Las funciones biológicas de las LSs se deben fundamentalmente a las características de los centros alquilantes que poseen, a la propiedad lipofílica y a la geometría molecular.

En cuanto a los centros alquilantes, el grupo carbonilo alfa-beta-insaturado es el que produce una reacción de adición tipo Michael, con los tioles de las cisteínas de las proteínas, y forma con ellos aductos estables. De esta manera, las LSs afectan el funcionamiento de muchas proteínas celulares. Los típicos centros alquilantes de las LSs son: la alfa-metilen-gama-lactona, la ciclopentenona conjugada y la cadena lateral éster conjugada.

Aparentemente, la específica toxicidad sobre las células tumorales es producida por el grupo carbonilo insaturado presente en la lactona.

La lipofilia es también una importante característica, que facilita el ingreso de la LS a la célula, debido a la rápida penetración de la membrana. En muchos casos la presencia de más de un centro alquilante aumenta la reactividad de la molécula pero disminuye la lipofilia, por lo que reduce la posibilidad de penetrar a la célula. Incluso, se sabe que algunas LSs pueden unirse a glúcidos presentes en la sangre que actúan como transportadores, pero esto también reduce la capacidad de penetrar la bicapa lipídica.

Otra característica de la molécula es la flexibilidad conformacional. Por cuestiones de impedimento estérico, se sabe que los compuestos con anillos lactona *cis* son más reactivos que los isómeros *trans*. Finalmente, es importante el entorno químico que rodea al grupo tiol, presente en la proteína blanco. Porque algunas interacciones no covalentes, preceden a la reacción de Michael y la facilitan, como los puentes de hidrógeno, que se forman entre la LSs y los aminoácidos adyacentes a la cisteína reactiva en la proteína blanco [68].

Selectividad tumoral

Algo especial de las LSs es que muestran cierta selectividad para la células tumorales, lo que las hace más interesantes para desarrollar tratamientos oncológicos. Inclusive, podemos mencionar varias LSs que se encuentran en ensayos clínicos, como son: artemisina para cáncer de mama metastásico y cáncer colorectal; artesunate para cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma metastásico y carcinoma laríngeo; artemetera para el macroadenoma pituitario; partenolide para leucemia mieloide aguda, leucemia linfática aguda y otros tumores linfáticos; y tapsigargina para tumores sólidos avanzados [68], (**Figura 12**).

La aparente acción selectiva de las LSs, se debe a que tienen como blanco los procesos celulares característicos de las células tumorales. Así, estos compuestos suelen actuar de la siguiente manera: inhiben la bomba de calcio ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), modifican el contenido de hierro citosólico y los receptores de transferrina en la superficie celular, inhiben la vía del NFkB y promueven la activación

de p53, modulan los mecanismos epigenéticos e inhiben la angiogénesis y la migración celular [69].

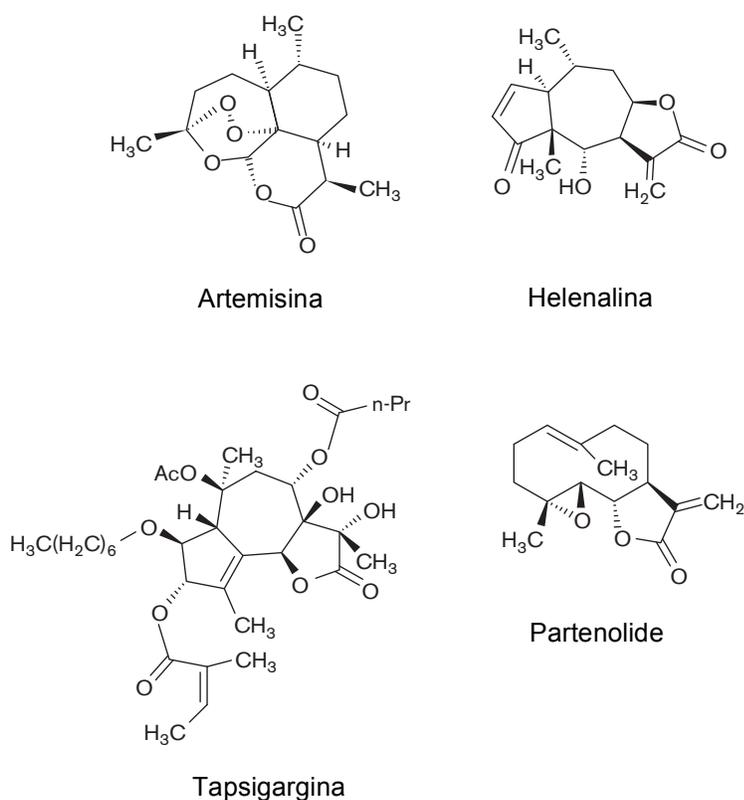


Figura 12. Estructura química de las LSs mejor caracterizadas [72].

Inhibición de la bomba SERCA

La bomba SERCA, es la encargada de los cambios espacio-temporales en la concentración de calcio iónico (Ca^{2+}) dentro de la célula, y provee el ambiente necesario para la función del Ca^{2+} como segundo mensajero, en la regulación de numerosos procesos celulares. El mal funcionamiento de esta bomba produce una desregulación del almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, que da lugar a un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} . El aumento del Ca^{2+} es un factor importante en la inducción de procesos apoptóticos, porque conduce a la disfunción mitocondrial con liberación de citocromo c, activación de caspasas y muerte celular. Como consecuencia, la interferencia de la función celular por inhibición de la bomba SERCA puede conducir a la

muerte celular, independientemente del estado proliferativo de la célula. A modo de ejemplo, taspigargina es una LS extraída de la planta *Thapsia garganica*, y de particular interés como inhibidor selectivo de la bomba SERCA (**Figura 13**). Debido a su blanco específico y su potencia, taspigargina es muy valiosa para el desarrollo de estrategias para destruir a las células cancerosas [73].

Generación de radicales libres a través del hierro

Las células de rápida proliferación tienen altos niveles de receptores de transferrina en su superficie y una alta cantidad de hierro intracelular. Artemisina, es una LS que ha generado interés para el tratamiento del cáncer, porque tiene capacidad de unirse al hierro y generar radicales libres que destruyen las células tumorales [74]. El grupo peróxido presente en la lactona de la molécula de artemisina, reacciona con el hierro dando lugar a una molécula inestable. Luego, esta desencadena una cascada de reacciones que libera especies reactivas del oxígeno (ROS) y termina destruyendo a la célula [75], (**Figura 13**).

Regulación del NFκB y la p53

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB), es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, implicado en el desarrollo y progresión del cáncer. Una elevada actividad de este se asocia con resistencia a la quimioterapia y la radioterapia [68].

Partenolide y artemisina son inhibidores del NFκB y vuelven a las células tumorales sensibles a la quimioterapia. Partenolide inhibe directamente a la subunidad p65 del NFκB y éste queda inactivo. También suprime la actividad de la quinasa (IKK) del inhibidor de kappa B (IκB), y esto estabiliza la inhibición del NFκB (**Figura 13**). Las células normales no son sensibles a estas LSs porque la actividad del NFκB suele ser baja y cuando su actividad aumenta suele estar relacionado con la diferenciación celular y no con la oncogénesis [68].

En los cánceres humanos es muy común que se produzca simultáneamente la hiperactivación del NFκB y la inactivación de la proteína pro-apoptótica p53. Partenolide, además de inhibir al NFκB, ha demostrado activar a p53 al promover la ubiquitinación y

degradación de la proteína murina doble minuto 2 (MDM2), la cual es un regulador negativo de p53 [68].

Modulación epigenética

Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de las histonas, están frecuentemente afectados en el cáncer. Muchas células tumorales muestran una elevada actividad de la histona desacetilasa 1 (HDAC1), y de la ADN metil-transferasa -1 (DNMT1) y -3 (DNMT3b). Partenolide, es capaz de disminuir los niveles de la enzima HDAC1 mediado por degradación proteasómica, e inducir la hipometilación global del ADN a través de la inhibición de la DNMT1 [76], (**Figura 13**).

Asimismo, helenalina es una LS considerada como un prometedor compuesto antitumoral. Esta, ha demostrado ser un potente inhibidor de la transcriptasa reversa de telomerasa humana (hTERT) y la telomerasa, en células de cáncer hematopoyético [77].

Inhibición de la angiogénesis y migración celular

Dentro de las LSs que poseen efecto antiangiogénico la más conocida es costunolide. Este compuesto inhibe selectivamente la proliferación de las células endoteliales, estimulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [78]. También, esta LS es capaz de inducir la diferenciación en células de leucemia, a través de su acción sobre PKC, PI3K, ERK y NFκB [79], y afectar la organización nuclear y la arquitectura de los microtúbulos en células de cáncer de mama [80].

Artemisina, también previene la angiogénesis porque inhibe la proliferación de las células endoteliales vasculares, y la expresión del VEGF y su receptor. Otras propiedades antimetastásicas se le atribuyen debido a que inhibe a las MMPs, al factor inducido por hipoxia (HIF) y el factor de crecimiento fibroblástico [68].

Por otro lado, existen LSs que han demostrado una acción supresora de la migración y la invasión celular como resultado de la disminución de la secreción de enzimas responsables de la degradación de la MEC (como la MMP-9 y la uroquinasa) [81].

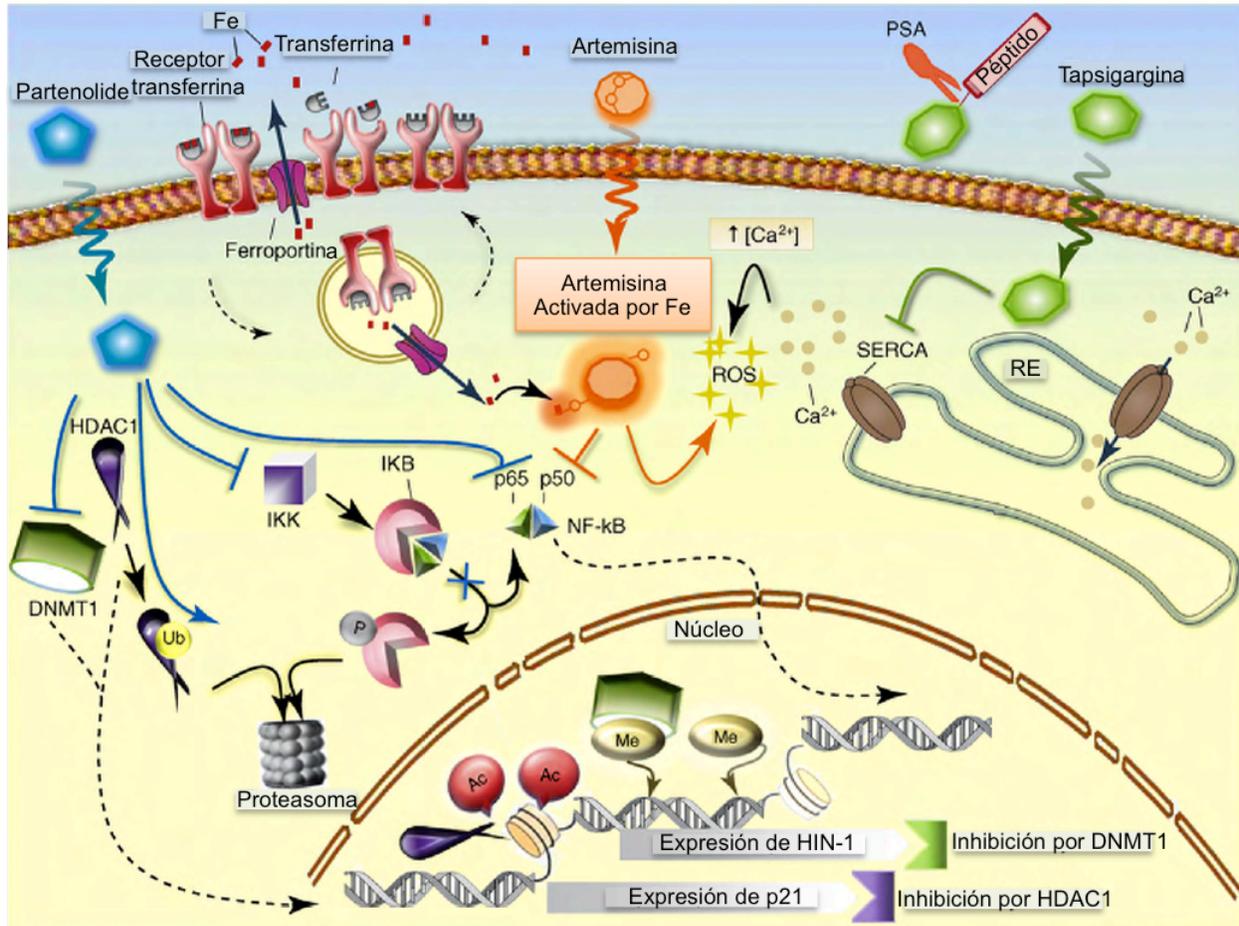


Figura 13. Mecanismo de acción de las LSs en las células tumorales. Las LSs que han sido incluidas en ensayos clínicos son derivados de tapsigargina, artemisina y partenolide. Las LSs difunden a través de la membrana plasmática y actúan selectivamente sobre la bomba SERCA, el alto contenido de hierro y los receptores de transferrina de la superficie celular, el NFκB, y los mecanismos epigenéticos. Tapsigargina, actúa sobre la bomba SERCA y bloquea su capacidad de transferir el Ca²⁺ desde el citosol hacia el RE. Las altas concentraciones de Ca²⁺ dan lugar a la generación de ROS y la subsiguiente muerte celular. Muchas células tumorales tienen un alto contenido de hierro citosólico y elevados niveles de receptores de transferrina en su superficie. El hierro citosólico se une al grupo peróxido de artemisina y causa su activación, con la posterior generación de ROS. Partenolide, directamente inhibe la DNMT1 y causa la degradación proteasómica de HDAC1, permitiendo la expresión de la proteína normalmente alta 1 (HIN-1) y p21, respectivamente. Partenolide también inhibe la subunidad p65 del NFκB y el complejo IKK, lo que previene la fosforilación de IκB mediada por IKK y su degradación proteasómica. Artemisina también puede inhibir directamente la actividad de NFκB [68].

Estos datos, más el hecho de que algunas LSs son capaces de inhibir el desarrollo de metástasis en ratones [82], claramente demuestran que estos compuestos naturales tienen un gran potencial para ser explorado en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Deshidroleucodina

Deshidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpénica, tipo guaianólido, aislada de las hojas de la planta medicinal llamada matico (*Artemisia douglasiana* Besser), que crece en la zona nor-oeste de Argentina. Popularmente, se utiliza la infusión de las hojas del matico, por sus propiedades citoprotectoras contra la ulcera péptica y para el tratamiento externo de lesiones en la piel [83], (**Figura 14**).



Figura 14. Parte aérea de *Artemisia douglasiana* Besser. Esta hierba medicinal es de fácil obtención y comúnmente utilizada en Argentina para la preparación de infusiones. Conocida popularmente como "matico", de las hojas de esta planta DhL puede ser aislada y purificada en concentraciones >1% [84], [85].

Estructura química

Numerosas publicaciones han demostrado la acción de DhL como antidiarreica [86], antiinflamatoria [83], antiparasitaria [87], antibacteriana [88], antiproliferativa [89] y antitumoral [90]. En cuanto a su estructura química, la molécula está formada por una metileno-gama lactona, unida a una ciclopentenona sustituida en posición beta. La actividad farmacológica como antiulcerosa se le atribuye al grupo metileno exocíclico conjugado al anillo gama-lactona [85], y las propiedades antiinflamatoria, antimicrobiana y antitumoral se asocian a la ciclopentenona [91], (**Figura 15**).

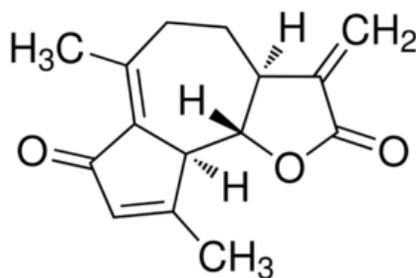


Figura 15. Estructura química de DhL. DhL es una lactona sesquiterpénica perteneciente al grupo guaianólido, que contiene un anillo alfa-metilen-gama-lactona en su molécula [92].

Antecedentes

La acción protectora de DhL sobre la mucosa gástrica se debe a que aumenta la síntesis local de glicoproteínas y de esta manera previene las lesiones inducidas por el alcohol y otros agentes necrotizantes [93], [94]. En el intestino, DhL tiene acción antidiarreica debido a la disminución del tránsito intestinal, [86], [95], la estimulación de la producción de moco y la inhibición de la liberación de histamina y serotonina por los mastocitos [84]. Se cree que el efecto antiinflamatorio de DhL en el tracto gastrointestinal, se debe principalmente a la inhibición del NFκB y la producción de citoquinas [83].

Como antiparasitario, se ha demostrado la acción de DhL sobre el *Trypanosoma cruzi*. El tratamiento con este compuesto disminuye el número de parásitos en las células infectadas y en el medio extracelular, sin producir toxicidad en la célula hospedadora [96]. También se ha reportado la acción antibacteriana de DhL contra *Staphylococcus aureus* [97] y *Helicobacter pylori* [88].

El efecto de DhL como antiproliferativo se ha observado en las células meristemáticas de la cebolla [98] y en las células musculares vasculares [89], donde produce un arresto transiente del ciclo celular en la fase G2 [99]. Además, se le atribuye a DhL un efecto antitumoral porque produce arresto del ciclo celular en varias líneas de células tumorales. Nuestro laboratorio, recientemente ha demostrado que DhL induce senescencia o apoptosis en las células HeLa, según la concentración utilizada. En este caso, produce específicamente, la acumulación de marcadores de daño del ADN, como son la activación de proteínas que forman parte de los puntos de control de ADN dañado [90].

Numerosos antecedentes aquí mencionados demuestran las características antitumorales de las LSs y nuestro laboratorio ha obtenido importantes resultados sobre el efecto inhibitorio de DhL en la proliferación de las células tumorales, *in vitro* e *in vivo*. Esto nos ha motivado a continuar dilucidando las propiedades de DhL como compuesto antitumoral.

El fin de esta tesis es demostrar el potencial antimetastásico que posee DhL. Para esto, estudiamos el efecto inhibitorio de este compuesto natural en el proceso de adhesión, migración e invasión de las células tumorales en cultivo. En efecto, esperamos que nuestros resultados generen la base a partir de la cual se avance sobre la investigación de esta molécula.

HIPÓTESIS

Deshidroleucodina, una lactona sesquiterpénica extraída de la planta de matico, posee una amplia variedad de actividades biológicas, entre ellas la capacidad de inhibir la progresión del cáncer. Este compuesto natural, al afectar diversos pasos de la cascada metastásica, resulta de interés farmacológico como un importante inhibidor de la metástasis tumoral.

OBJETIVOS

Objetivo general

En el trabajo de esta tesis nos propusimos como objetivo general, resaltar el potencial de Deshidroleucodina de inhibir las características metastásicas de las células tumorales y postular a este producto natural como un prometedor prototipo farmacológico de la terapia antitumoral.

Objetivos específicos

Para estudiar las características antimetastásicas de DhL, planteamos analizar su efecto en la adhesión, invasión y migración de las células tumorales. En base a esto, nuestro **primer objetivo** fue determinar como modelo de experimentación, la utilización de células tumorales en cultivo, arrestadas con hidroxurea y luego, analizar el efecto de DhL en la viabilidad celular.

A continuación, debido a que la adhesión de las células tumorales a la MEC es un importante estímulo para la metástasis, nuestro **segundo objetivo** fue evaluar el efecto de DhL en la adhesión de las células tumorales a la MEC y en la formación de las adhesiones focales.

El **tercer objetivo** se basó en estudiar el potencial inhibitorio de DhL en la invasión de las células tumorales. Para esto analizamos el efecto de DhL en la capacidad de las células tumorales de invadir una matriz tisular, en la actividad de las MMPs y en la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

Por último, como inhibir la migración de las células tumorales es un importante propósito de la terapia antimetastásica, nos propusimos como **cuarto objetivo**, caracterizar el efecto de DhL en la morfología y motilidad celular, y en las proteínas que conforman el citoesqueleto.

RESULTADOS

SECCIÓN 1: Efecto de DhL en la viabilidad de las células tumorales arrestadas con hidroxiurea

Varios trabajos de investigación han demostrado que es conveniente el arresto del ciclo celular cuando se realizan estudios de migración. Así, se evita confundir los signos de la proliferación celular cuando se quiere analizar específicamente el efecto de un compuesto en la motilidad. El arresto de las células es una estrategia para asegurar que la masa celular con la que estamos trabajando se encuentra en una misma fase del ciclo. El proceso de arresto involucra el bloqueo de las células en una fase específica del ciclo, logrado a través de diferentes agentes. Para esto se pueden utilizar inhibidores de los microtúbulos, que arrestan a las células en metafase, y la timidina o hidroxiurea (HU), que producen el arresto en interfase [100]–[102].

La HU es una molécula de bajo peso molecular (un agente mielosupresivo no alquilante) que bloquea la síntesis del ADN. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa, que reduce los ribonucleótidos difosfatos a desoxi-ribonucleotidos difosfatos (dNDP). Como consecuencia de esto, en la célula disminuye la fuente de dNDP, los cuales son indispensables para la síntesis de ADN. Por lo tanto, se produce el arresto del ciclo celular al final de la fase G1, anterior a la síntesis de ADN (fase G1/S). Se ha comprobado que la HU solo inhibe la replicación del ADN y no interfiere con la transcripción del ARN o la síntesis de las proteínas [103], [104].

En esta sección, se muestran los ensayos que se llevaron a cabo para determinar el modelo de estudio, para analizar el efecto de DhL en las distintas etapas de la migración celular. Nuestro objetivo era arrestar a las células con HU y así, evitar la proliferación celular para que esta no interfiriera en los ensayos de migración. Además, buscamos el arresto en la fase G1/S, porque se ha demostrado que esta es la fase del ciclo donde las células desarrollan mayor velocidad de migración [105]. En primer lugar, determinamos la concentración de HU necesaria para arrestar a las células sin producirles efectos tóxicos. Esto fue realizado por medio de ensayos de proliferación, citometría de flujo y análisis de la viabilidad celular. En segundo lugar, en las células arrestadas con HU, analizamos el efecto de DhL en la viabilidad celular, y la inducción de senescencia o apoptosis.

Resultados

Arresto del ciclo celular

Para determinar la concentración de HU que produce arresto del ciclo celular, realizamos ensayos de proliferación y recuento celular. Trabajamos con células de carcinoma cervical humano (HeLa), melanoma espontáneo de ratón (B16-F0), melanoma altamente metastásico de ratón (B16-F10), adenocarcinoma de mama receptor estrógeno positivas (MCF-7) y adenocarcinoma de mama receptor estrógeno negativas (MDA-MB-231). Estas células fueron cultivadas en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12), con 10% suero fetal bovino (SFB), hasta una confluencia del 80% y luego, fueron incubadas en medio de cultivo sin suero por 24 horas. A continuación, las células fueron desprendidas con tripsina y se sembraron 30.000 células por pocillo (células/p), en placas de 24 pocillos, y fueron incubadas por 2 horas para permitir la adhesión celular. Luego, fueron estimuladas con medio de cultivo con 1,5% SFB, en presencia de concentraciones crecientes de HU (0; 0,5; 1; 2; 4 y 8 mM) por 24 horas. Posteriormente, para determinar el número de células/p, desprendimos las células con tripsina y realizamos el recuento celular en cámara de Neubauer.

En las células HeLa, a las 24 horas de incubación, observamos que a medida que aumentaba la concentración de HU, el número de células/p disminuía. Mediante el recuento celular, comprobamos que las células HeLa que no habían recibido HU habían proliferado y encontramos 52.000 células/p. El tratamiento con 0,5 y 1 mM HU mostró un número de 44.000 y 40.000 células/p, respectivamente. En el tratamiento de las células con 2 mM HU encontramos un número de 30.000 células/p. En cambio, en los tratamientos con 4 y 8 mM HU encontramos 10.000 y 5.000 células/p, respectivamente. Debido a que el cultivo se había iniciado con 30.000 células/p, interpretamos que 2 mM HU mantuvo el mismo número de células sembradas y por lo tanto inhibió la proliferación celular, mientras que los tratamientos con concentraciones mayores a 2 mM HU produjeron el desprendimiento de las células, ya que se encontraron cantidades significativamente menores a las células sembradas (**Figura 16**).

En el caso de las células B16-F0 tratadas con 0-8 mM HU por 24 horas, el recuento celular indicó que en los cultivos que no recibieron HU había mayor número de células que las que habíamos sembrado. En los pocillos que recibieron 0,5 mM HU había 35.000 células/p, y en los que recibieron 1 y 2 mM de HU había alrededor de 32.000 y 29.500 células/p, respectivamente. En cambio, en los pocillo que recibieron 4 y 8 mM HU había menor número de células que las que se sembraron. Esto indica que la concentración de 2 mM HU inhibió la proliferación celular y mantuvo a las células B16-F0 en un número similar al que se sembró (Figura 16).

De la misma manera, se realizó el recuento de las células B16-F10 tratadas con 0-8 mM HU por 24 horas, el cual indicó que las concentraciones inferiores a 1 mM HU no inhibieron la proliferación celular, 1 mM HU mantuvo el mismo número de células que se sembraron y concentraciones mayores a 2 mM HU produjo el desprendimiento de las mismas (Figura 16).

El tratamiento de las células MCF-7 y MDA-MB-231 con 0-8 mM HU por 24 horas indicó que 1 mM HU en las células MCF-7, y 2 mM HU en las células MDA-MB-231, detuvo la proliferación celular y mantuvo el mismo número de células que se sembraron (estos datos no se muestran).

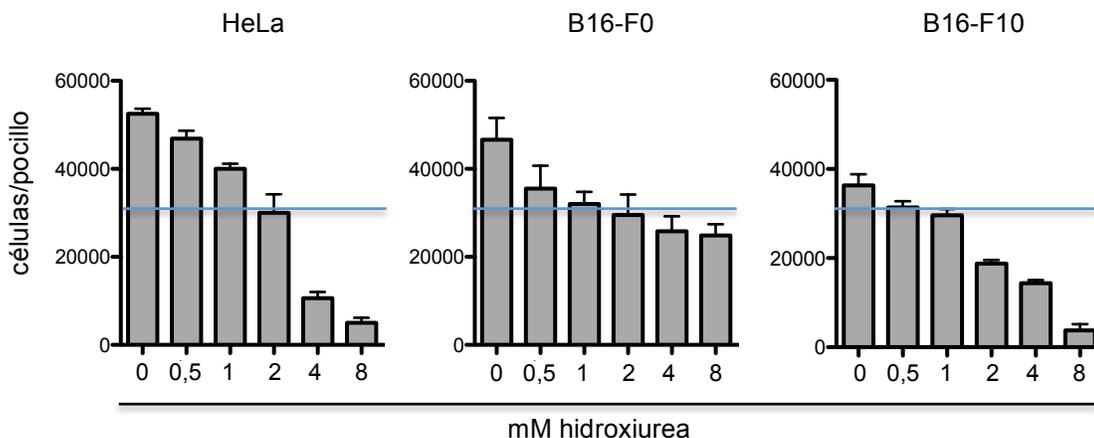


Figura 16. Tratamiento de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 con HU. Se sembraron 30.000 células/p y fueron tratadas con 0; 0,5; 1; 2; 4 y 8 mM HU por 24 horas. Luego, las células se desprendieron con tripsina y se contaron en una cámara de Neubauer. Los gráficos muestran el número de células/p a las 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de HU. Valor medio \pm SEM, $n=3$. La línea celeste indica el número de células sembradas.

De manera complementaria y con el fin de corroborar el arresto del ciclo celular mediante el uso de HU, realizamos en las células HeLa, el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar en que fase del ciclo celular se encuentran las células en base a su contenido de ADN. Para ello, las células son marcadas con yoduro de propidio, el cual se intercala en el ADN y de esta manera permite su detección por el aparato. Luego, mediante el uso de un programa de computación específico se puede cuantificar, según hayan duplicado o no el ADN, la proporción de células que se encuentran en la fase G1, S y G2 del ciclo celular.

Para realizar la citometría de flujo, las células HeLa en 80% de confluencia fueron incubadas sin suero durante 24 horas. Posteriormente, se incubaron en medio con 1,5% SFB y 0 ó 2 mM HU por 24 horas. Transcurrido el tratamiento, las células fueron desprendidas con tripsina, lavadas con PBS, fijadas con etanol y marcadas con yoduro de propidio. Por último, la suspensión de células fue analizada en un citómetro de flujo y los resultados interpretados mediante el programa de computación FlowJo.

Como se señala en la **Figura 17**, el análisis de las células marcadas con yoduro de propidio demostró que cuando las células fueron incubadas en medio sin SFB por 24 horas, el 61% de las mismas se encontraban en G1, el 28% en S y el 11% en G2. La incubación en medio con 1,5% SFB por 24 horas presentó un 54% de las células en G1, 31% en S y 15% en G2. En cambio, en la incubación en medio con 1,5% SFB y 2 mM HU se observó un 71% de células en G1, 27% en S y 2% en G2. Esto indica que la incubación de las células en medio sin suero por 24 horas dio lugar a una población con un gran número de células en G1 y cuando fueron estimuladas con 1,5% SFB disminuyó el número de células en G1 y aumentó en G2, lo que sugiere un pequeño estímulo de la proliferación. Sin embargo, en el tratamiento con HU se incrementó el número de células en G1 y prácticamente desaparecieron las células en la fase G2, lo cual indica que se inhibió la duplicación del ADN. Por lo tanto, consideramos que el tratamiento con 2 mM HU efectivamente arrestó a las células HeLa en la fase G1/S del ciclo celular.

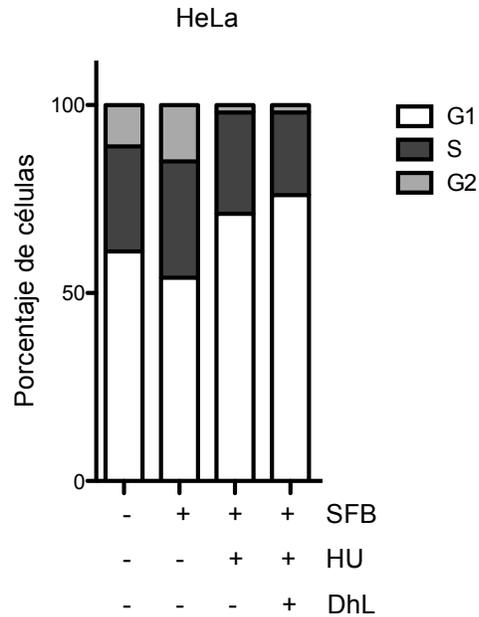


Figura 17. El tratamiento de las células HeLa con HU o HU + 20 μ M DhL produce arresto del ciclo celular en G1/S. Las células HeLa fueron incubadas en medio sin SFB por 24 horas y luego fueron tratadas con medio de cultivo con 0 ó 1,5% SFB, 0 ó 2 mM HU y 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. A continuación, las células fueron marcadas con yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo. El gráfico muestra la proporción de células en la fase G1, S y G2 del ciclo celular. Valor medio, $n=2$.

Hasta aquí, hemos demostrado que el tratamiento de las células que se encuentran en un 80% de confluencia, con medio de cultivo sin suero por 24 horas, y el posterior tratamiento por 24 horas con 1,5% SFB, en presencia de 2 mM HU, detuvo la proliferación de las células HeLa, B16-F0 y MDA-MB-231, y 1 mM HU, inhibió la proliferación de las células B16-F10 y MCF-7. Además, en las células HeLa el arresto del ciclo celular en la fase G1/S con HU, fue corroborado mediante citometría de flujo.

En los siguientes experimentos, el tratamiento con HU utilizado para inhibir la proliferación celular, se menciona como “**células arrestadas con HU**”. Este tratamiento involucra a células en un 80% de confluencia, incubadas sin SFB por 24 horas y que luego son tratadas con HU y 1,5% SFB.

Viabilidad de las células arrestadas con HU

Debido a que concentraciones mayores a 2 mM HU produjo el desprendimiento de las células de la placa de cultivo, nos preguntamos si las concentraciones de HU seleccionadas para arrestar a las células afectan la viabilidad de éstas. Para ello, analizamos la viabilidad celular utilizando el método de coloración con azul tripán.

El fundamento del método de exclusión vital con azul tripán es que si las células están vivas, mantienen su membrana plasmática intacta y por lo tanto el colorante no ingresa a ellas. Si las células han sido afectadas por el tratamiento, el colorante ingresa a las células y estas se observan de color azul.

Para estudiar el efecto de HU en la viabilidad celular, las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231 fueron arrestadas con HU por 24 horas. Luego, fueron desprendidas con tripsina y teñidas con 0,4% azul tripán. A continuación, mediante recuento celular en cámara de Neubauer determinamos el número de células viables (no teñidas) y muertas (teñidas).

Encontramos, que cuando las células HeLa, B16-F0 y MDA-MB-231 son tratadas con 2 mM HU, y las células B16-F10 y MCF-7 son tratadas con 1 mM HU, más del 98% de las mismas no se tiñen con el colorante, lo que indica que la mayoría de las células se encuentran viables (**Figura 18**).

De este resultado, concluimos que las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231, arrestadas con HU por 24 horas, no pierden la viabilidad. Por lo tanto, la concentración de HU que contendrán los medios de cultivo en los experimentos subsiguientes será de 1 ó 2 mM HU según el tipo de célula que se utilice.

Debido a que resultados de nuestro laboratorio indican que las células HeLa en proliferación tratadas con DhL pueden entrar en senescencia o morir por apoptosis [90], nos preguntamos el efecto que tendría DhL en las células HeLa arrestadas con HU. El tratamiento de las células HeLa arrestadas con HU y tratadas con 30 μ M DhL por 24 horas, produjo el desprendimiento de las mismas de la placa de cultivo. En cambio, el tratamiento con 20 μ M DhL por 24 horas, no produjo daño celular aparente. Por lo tanto, a continuación

analizamos si el tratamiento con 20 μM DhL afecta la viabilidad de las células arrestadas con HU y si se induce senescencia o apoptosis.

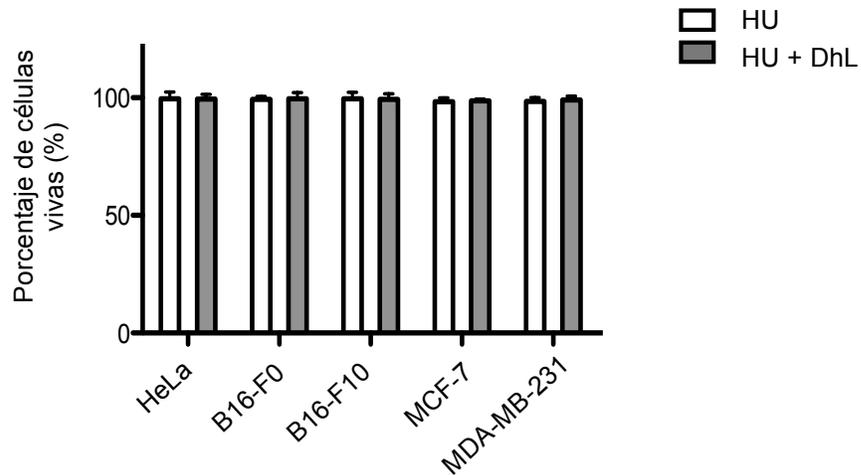


Figura 18. El tratamiento con HU y HU + 20 μM DhL no afecta la viabilidad de las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231. Las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231 fueron arrestadas con 1 mM HU ó 2 mM HU, y tratadas con 0 ó 20 μM DhL. A las 24 horas, se realizó el recuento celular, en cámara de Neubauer, y mediante coloración con azul tripán se determinó el porcentaje de viabilidad celular. Valor medio \pm SEM, $n=3$

Viabilidad de las células arrestadas con HU y tratadas con DhL

Para determinar el efecto de DhL en la viabilidad celular utilizamos el colorante azul tripán. Para esto, las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231 arrestadas con HU, fueron tratadas con 20 μM DhL por 24 horas. Luego, mediante coloración con azul tripán y recuento en cámara de Neubauer, analizamos la viabilidad celular. De esta manera observamos que la viabilidad celular fue de 99% en las células HeLa, B16-F0, B16-F10 y MDA-MB-231, y de 98% en las células MCF-7 (**Figura 18**). Así, afirmamos que el tratamiento con 20 μM DhL durante 24 horas, no afecta significativamente la viabilidad de las células arrestadas con HU.

De forma complementaria, se realizó el análisis del ciclo celular en las células HeLa arrestadas con HU y tratadas con 20 μM DhL por 24 horas. Así, los datos arrojados por la citometría de flujo indicó que el 76% de las células se encontraban en la fase G1, el 22% en

S y el 2% en G2 (Figura 17). Esto revela que el tratamiento con 20 μ M DhL por 24 horas no afectó el arresto celular inducido por HU y las células se mantuvieron en la fase G1/S.

Senescencia

La senescencia es un proceso por el cual las células pierden la capacidad de dividirse e ingresan en un estado arrestado en el cual adquieren una característica morfología alargada y plana. Este proceso, se piensa que se debe a una respuesta por daño en el ADN o como causa del envejecimiento celular [106].

Las células senescentes están asociadas con un incremento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa, que se detecta a pH 6 y es conocida como “actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia” (SA- β gal), [107]. Es necesario tener en cuenta que la actividad de la beta-galactosidasa a pH 6, a diferencia de la beta-galactosidasa que se detecta a pH 4, solo esta presente en las células senescentes y no se encuentra en las células pre-senescentes, quiescentes o inmortales [108].

En estudios previos, encontramos que las células HeLa en proliferación presentan senescencia prematura cuando son tratadas con 20 μ M DhL por 48 horas [90]. Para verificar si las células arrestadas con HU y tratadas con 20 μ M DhL se tornan senescentes, analizamos la actividad de SA- β gal, mediante una reacción de tinción citoquímica que revela en células en cultivo, la actividad de beta-galactosidasa a pH 6.

Para este experimento, las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas (las células sin DhL fueron tratadas con igual volumen de vehículo del compuesto, DMSO, y se mencionan como “células controles”). Como control positivo de senescencia, las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 en proliferación, fueron tratadas con 10% SFB y 20 μ M DhL por 48 horas. Al final del tratamiento las células se fijaron y se determinó la actividad de SA- β gal mediante la coloración con X-gal a pH 6, 37 $^{\circ}$ C, por 6 horas. Por último, observamos los preparados con un microscopio óptico y las células senescentes se identificaron por la tinción azul en la región perinuclear.

En las células HeLa en proliferación, tratadas con 20 μ M DhL por 48 horas, la mayoría de las células presentaron coloración azul, lo que indica que se encontraban en estado senescente. En cambio, las células controles (arrestadas con HU) no se colorearon,

por lo tanto estas células no se encontraban senescentes. En las células arrestadas con HU y tratadas con 20 μ M DhL por 24 horas, no se produjo coloración azul, por lo que consideramos que tampoco se encontraban senescentes (**Figura 19**). La cuantificación del número de células que presentaron actividad SA- β gal arrojó que el 99% de las células HeLa en proliferación, tratadas con DhL por 48 horas, presentó coloración azul perinuclear. En cambio, solo el 1% de las células controles y tratadas con DhL mostraron reacción positiva a la coloración.

El mismo análisis fue realizado en las células B16-F0 y B16-F10. En ambas líneas celulares, el 99% de las células en proliferación tratadas con 20 μ M DhL por 48 horas, presentó coloración azul perinuclear, lo que indica que se encontraban en senescencia. En cambio, solo el 1% de las células B16-F0 y B16-F10, arrestadas con HU, tanto en ausencia como en presencia de 20 μ M DhL por 24 horas, presentó reacción positiva a SA- β -gal (**Figura 19**).

De esta manera, confirmamos que el tratamiento con 20 μ M DhL por 24 horas, no produce senescencia en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU.

Apoptosis

En células HeLa en proliferación, el tratamiento con 30 μ M DhL por 24 horas produce apoptosis, por eso, nos preguntamos si 20 μ M DhL produce el mismo efecto cuando las células son arrestadas con HU. Debido a que el análisis de la viabilidad celular con azul tripán no es sensible para las células que podrían encontrarse en los primeros estadios de apoptosis, realizamos para determinar este proceso el ensayo con anexina V.

En las células normales (no apoptóticas), el fosfolípido fosfatidilserina está localizado en la superficie citoplasmática de la membrana celular. En cambio, en los primeros estadios de apoptosis, la fosfatidilserina se transloca desde la superficie interna hacia la externa de la membrana plasmática, y queda expuesta al ambiente extracelular.

La anexina V es una glucoproteína de 35 kDa, dependiente de calcio y con gran afinidad por la fosfatidilserina. Para evaluar si 20 μ M DhL produce apoptosis en las células arrestadas con HU, realizamos la tinción con anexina V-FITC.

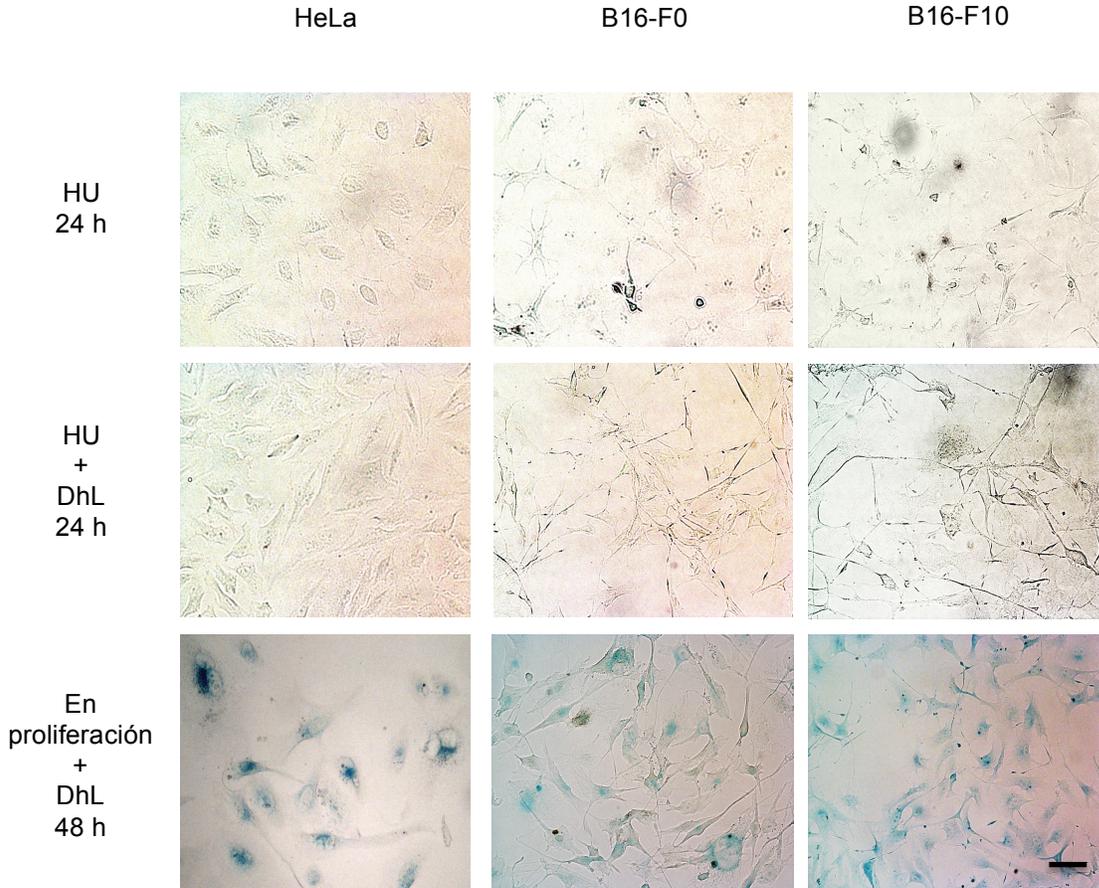


Figura 19. El tratamiento con 20 μM DhL por 24 horas no produce senescencia en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU. Las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Para el control positivo de senescencia las células en proliferación se trataron con 10% SFB y 20 μM DhL por 48 horas. Luego del tratamiento, las células fueron incubadas con el reactivo para la detección de beta-galactosidasa a pH 6, a 37°, por 6 horas, y se observaron en un microscopio óptico (objetivo 40x). Las células senescentes presentan tinción perinuclear azul. Barra 50 μm .

Para realizar este experimento, las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Como control positivo de apoptosis, las células en proliferación fueron expuestas a la luz ultravioleta (UV) por 1 hora. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron teñidas con anexina V-FITC y observadas en un microscopio de fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 20**, las células HeLa expuestas a la luz UV presentaron en su mayoría una intensa fluorescencia verde, lo que indica que estaban en estado de apoptosis. En cambio, en las células controles y tratadas con DhL, las células no se

observaron teñidas y por lo tanto no se encontraban en apoptosis. El recuento celular demostró que el 99% de las células expuestas a la luz UV se encontraban apoptóticas. En cambio, en las células controles y tratadas con DhL solo un 2% desarrollaron apoptosis.

En las células B16-F0 y B16-F10 se obtuvo un resultado similar. En ambas líneas celulares, la mayoría de las células expuestas a la luz UV se encontraban en apoptosis. Por el contrario, en las células controles y tratadas con DhL, solo un 1% se tiñeron con anexina V.

Por lo tanto, consideramos que el tratamiento con 20 μM DhL por 24 horas no produce apoptosis en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU.

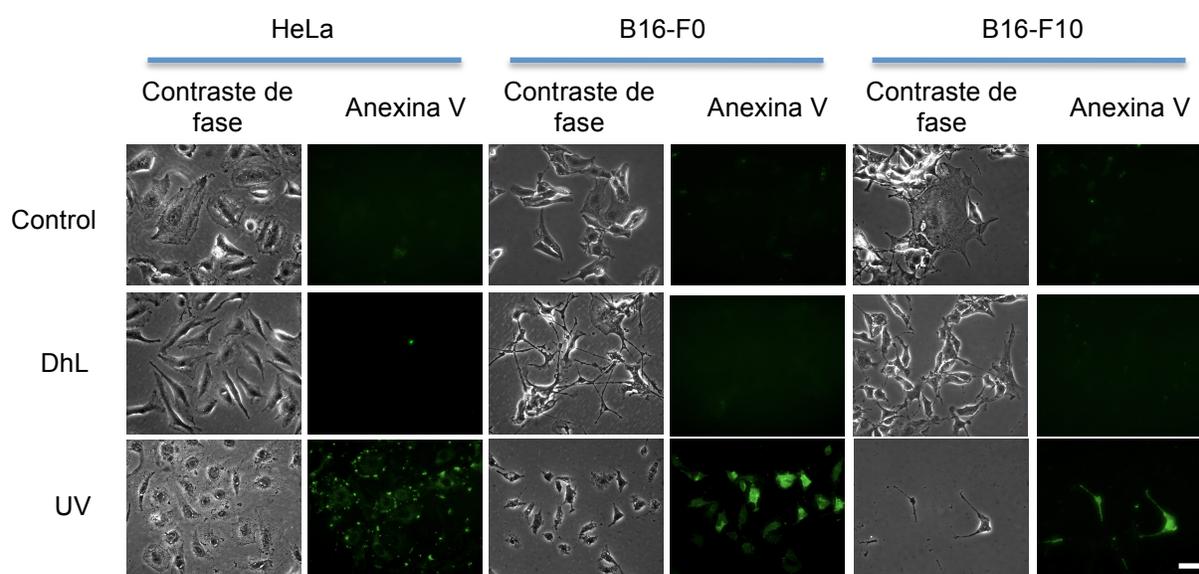


Figura 20. El tratamiento con 20 μM DhL por 24 horas no produce apoptosis en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU. Las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 (Control) ó 20 μM DhL (DhL) por 24 horas. Como control positivo de apoptosis, las células en proliferación fueron expuestas a la luz UV durante 1 hora. Luego, las células fueron teñidas con anexina-V FITC y analizadas en un microscopio con contraste de fase y fluorescencia. La tinción fluorescente de las células indica apoptosis. Barra 50 μm .

Conclusión

En este estudio, la HU fue utilizada para inhibir la proliferación de las células tumorales. De la misma manera que otros autores han reportado [109]–[112], en nuestros experimentos observamos un efecto antiproliferativo de HU en las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231. Sin embargo, la sensibilidad a la droga varía entre las

distintas líneas celulares. Es por eso que determinamos la proliferación y viabilidad celular mediante el método de recuento directo y coloración con azul tripán. Encontramos que la utilización de HU en concentración de 2 mM en las células HeLa, B16-F0 y MDA-MB-231, y 1 mM en las células B16-F10 y MCF-7, inhibe completamente la proliferación sin afectar la viabilidad celular. Además, comprobamos por citometría de flujo, que 2 mM HU produce en las células HeLa, arresto del ciclo celular en la fase G1/S.

Luego, analizamos el efecto de DhL en la viabilidad celular, y la inducción de senescencia o apoptosis, en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU. Los experimentos indicaron que la viabilidad celular no fue significativamente afectada por el tratamiento con DhL. Además, el análisis del ciclo celular por citometría de flujo reveló que DhL no modifica el arresto de las células HeLa inducido por HU, de manera que estas se mantienen en la fase G1/S. Por otro lado, el análisis de SA- β gal demostró que el grado de senescencia de las células arrestadas con HU y tratadas con DhL es despreciable. Luego, los ensayos realizados para evaluar apoptosis, revelaron que este proceso tampoco se produce por el tratamiento con HU y DhL.

Con estos resultados, demostramos que en nuestro modelo conseguimos la condición de arresto del ciclo celular en G1/S, sin producir muerte celular, senescencia o apoptosis. Consideramos la utilización de las células tumorales arrestadas con HU, como la condición óptima para evaluar el efecto de DhL en las distintas etapas de la migración celular.

SECCIÓN 2: Efecto de DhL en la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular y en la formación de las adhesiones focales

Matriz extracelular

La MEC es una red compleja de macromoléculas con distintas propiedades físicas, bioquímicas y mecánicas. Algunas proteínas que la componen se unen a receptores de adhesión celular como las integrinas, que median la adhesión célula-matriz y además, traducen señales al interior de la célula. Así, la MEC tiene muchos efectos más allá de proveer una estructura de soporte. Señales específicas de la MEC pueden estimular la progresión del cáncer mediante la promoción de la transformación celular y el desarrollo de metástasis [113], [114].

La fibronectina (FN) es una abundante proteína de la MEC, de múltiples dominios, con la habilidad de unirse al colágeno, a proteoglicanos y a las integrinas. Es secretada por las células como un dímero soluble y posteriormente se ensambla en fibrillas multiméricas insolubles que pasan a formar parte de la MEC. La FN media una amplia variedad de interacciones célula-matriz y juega roles importantes en la adhesión, expansión, migración, proliferación y diferenciación celular [115].

Muchos estudios han aportado evidencias de que la unión de las células con la FN de la MEC da lugar a distintos fenotipos celulares. Particularmente, se ha demostrado que al bloquear la interacción de la célula con la FN se inhibe la proliferación celular, la migración, se altera la organización de la actina y la contractilidad del citoesqueleto. Varias investigaciones también indican el papel de la FN en establecer un ambiente extracelular biológicamente activo, requerido para la apropiada función celular [116], [117], [118], [119], [43].

Proceso de adhesión y expansión celular

La mayoría de las células en suspensión, cuando toman contacto con superficies recubiertas con proteínas de la MEC, se adhieren y luego se expanden adquiriendo una morfología plana. La adhesión y expansión celular se encuentran bajo control de múltiples

vías de señalización, las cuales provienen de los componentes de la MEC y también desde el interior de la célula. La integración de estas señales regulan la adhesión y la expansión celular mediante el ensamble de las AFs.

El proceso de adhesión y expansión celular puede dividirse en tres fases. La primera fase está caracterizada por la formación de puentes iniciales entre las moléculas adhesivas de la célula y los componentes de la MEC. Esto es seguido por una segunda fase, que comprende el inicio de la expansión celular. Esta es llevada a cabo por la polimerización de actina, que incrementa la superficie celular y da lugar a la formación, en la membrana plasmática, de protrusiones con forma de burbujas llamadas *blebs*. Los *blebs* son característicos de la apoptosis y la división celular, pero también aparecen durante la expansión de las células. Estos se observan transcientemente en la fase de expansión y su principal función es reclutar, desde el interior de la célula, membrana plasmática adicional para aumentar el área celular. Luego que desaparecen los *blebs*, las células entran en una tercera fase del proceso de adhesión y expansión, donde la membrana plasmática se relaja, el endoplasma se aplana y las AFs maduran. Las distintas fases, se acompañan de cambios sustanciales en los mecanismos celulares, para alcanzar el desafío mecánico planteado por la expansión, en particular el cambio de volumen, que representa una amenaza a la integridad de la membrana plasmática [120], [121].

Adhesiones focales

La adhesión de la célula al sustrato comprende: la unión de las integrinas a las fibras de la MEC, la agrupación de las integrinas y su interacción con el citoesqueleto de actina, y el ensamble de las AFs. Las AFs comprenden numerosas proteínas estructurales como vinculina, talina y alfa-actinina, y elementos de señalización como FAK, Src y paxilina. Las fuerzas externas ejercidas sobre las integrinas son el estímulo para que se produzca el ensamble de las AFs y por lo tanto, la conexión entre las integrinas y el citoesqueleto de actina [122].

La formación de las AFs, es iniciada gracias a la unión de talina y actina-F a las integrinas, y luego este complejo de proteínas es reforzado mediante vinculina. En un principio, la unión de la mayoría de los ligandos a vinculina es inhibido por la interacción

intramolecular entre la región globular (N-terminal) de vinculina y la región de la cola (C-terminal), de manera que la proteína adopta una conformación cerrada. Luego, la presencia de fosfatidil-inositol-di-fosfato (PIP₂), permite que vinculina sea activada y adopte una conformación abierta. De esta manera, vinculina puede ser reclutada a los complejos focales formados inicialmente entre integrina, talina y actina-F. Esto facilita el agregado de otras proteínas y la maduración de los complejos focales hacia estructuras más grandes y estables como son las AFs [123]. La forma activada de vinculina contribuye principalmente con la nucleación y polimerización de actina, necesaria para la extensión de la lamela y la expansión celular [124], [125]. Se sabe que vinculina es clave en la regulación del número y tamaño de las AFs y que las células deficientes de esta proteína pueden formar AFs pero muestran significativos defectos en la morfología, la expansión y la migración celular [126].

Como la adhesión de las células a la MEC juega un rol importante en el desarrollo de las metástasis, nos propusimos investigar el efecto de DhL en la interacción de las células tumorales con las proteínas de la MEC. Para eso, desarrollamos una serie de ensayos en placas de cultivo recubiertas con FN. En primer lugar, analizamos la adhesión y expansión celular y posteriormente estudiamos la concentración de vinculina y la formación de las AFs.

Resultados

Adhesión de las células tumorales a fibronectina

Para estudiar el efecto de DhL en la capacidad de adhesión celular, desarrollamos ensayos de adhesión en placas recubiertas con FN. Para esto, las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células fueron desprendidas de la placa con EDTA/PBS (en los ensayos de adhesión no utilizamos tripsina para no dañar las proteínas de la superficie celular), y se incubaron 50.000 células/p en placas de 6 pocillos recubiertas con FN, durante 10, 20 y 60 minutos. En cada uno de estos tiempos, se realizó el recuento de las células adheridas, con un microscopio óptico con objetivo 4x.

A medida que transcurría el tiempo de incubación, observamos un incremento del número de células HeLa adheridas a la placa de cultivo, pero cuando comparamos las células controles con las tratadas con DhL, evidenciamos que en estas últimas era menor el número de células adheridas a la placa (**Figura 21 A**). En las células controles, se observaron 71 células/campo (células/c) a los 10 minutos, 107 células/c a los 20 minutos y 173 células/c a los 60 minutos de incubación. En cambio, en las células tratadas con DhL se observaron 54 células/c a los 10 minutos, 76 células/c a los 20 minutos y 108 células/c a los 60 minutos de incubación. Si bien a los 10 minutos de incubación el tratamiento con DhL no produjo un efecto significativo en la adhesión de las células HeLa, a los 20 minutos DhL redujo un 29% el número de células adheridas a FN. Luego, a los 60 minutos, el efecto de DhL fue más marcado y la reducción del número de células adheridas fue de 38% (**Figura 21 B**).

De manera similar, analizamos la adhesión de las células B16-F0 y B16-F10. En las células B16-F0, DhL inhibió la adhesión un 35% a los 20 minutos y un 45% a los 60 minutos. En las células B16-F10, la inhibición de la adhesión por el tratamiento con DhL fue de 32% a los 20 minutos y 40% a los 60 minutos (**Figura 21 B**).

Por lo tanto, este resultado indica que DhL inhibe la adhesión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 a FN.

Dado que DhL tiene efecto inhibitorio en la adhesión de las células a FN, nos preguntamos si también se afecta la capacidad de expansión celular. Para eso, estudiamos el efecto de DhL en la expansión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 sobre FN.

Expansión de las células tumorales sobre fibronectina

Para este experimento, las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células se desprendieron de la placa con EDTA/PBS, se sembraron en placas recubiertas con FN, y se incubaron por 1 hora para permitir la adhesión celular. Después de eliminar las células no adheridas a la placa, se continuó con la incubación de las células adheridas (tiempo 0 de expansión) y se midió el área celular durante 3 horas de expansión.

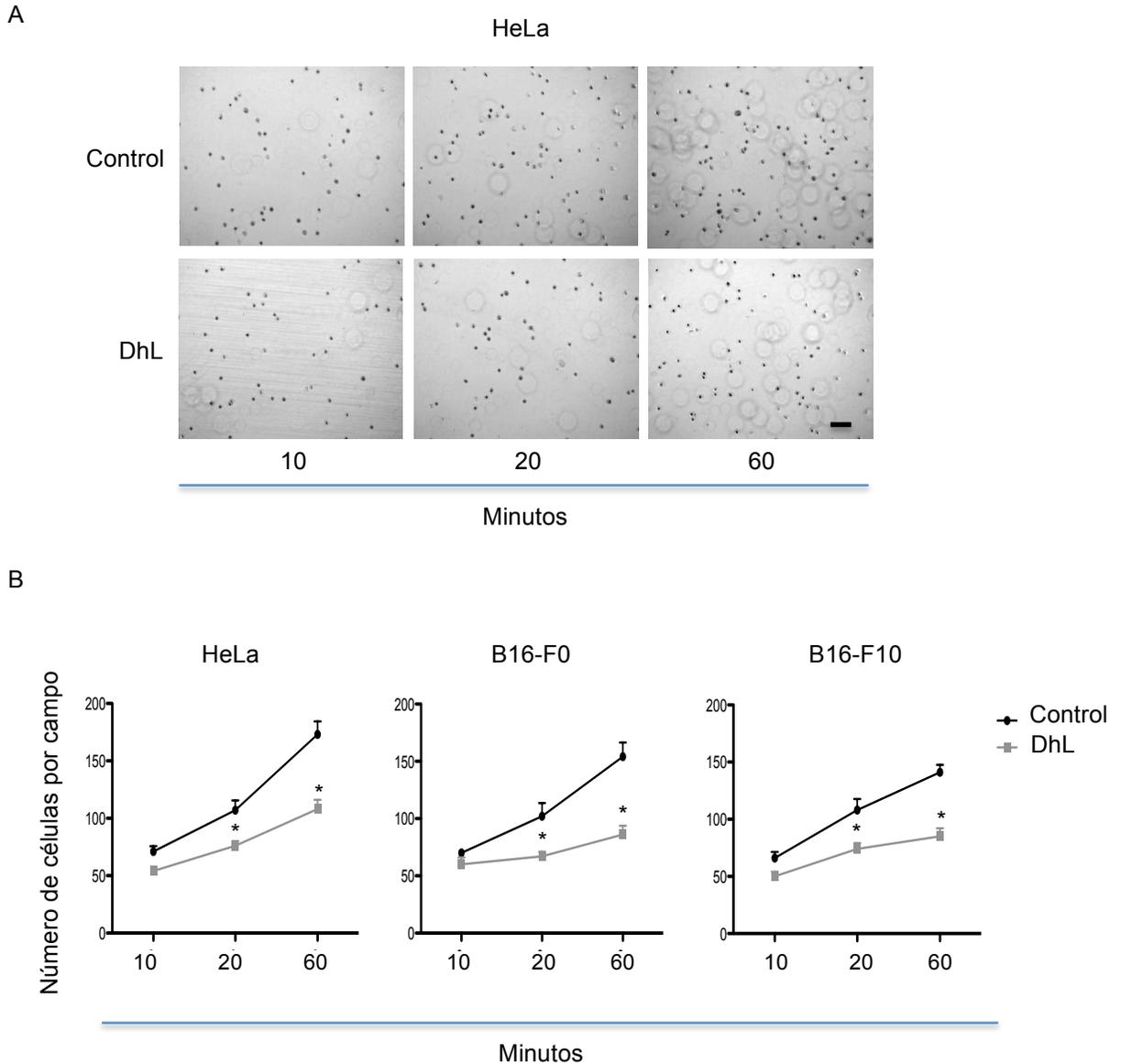


Figura 21. DhL inhibe la adhesión de las células tumorales a FN. Las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Luego, fueron desprendidas con EDTA/PBS, colocadas en placas recubiertas con FN, e incubadas durante 10, 20 y 60 minutos. Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio de cultivo y se contaron las células adheridas a la placa en un microscopio óptico con objetivo 4x. A) imágenes en contraste de fase de las células HeLa adheridas a la placa con FN, luego de 10, 20 y 60 minutos de incubación. Barra 100 μm . B) Número de células por campo, adheridas a la placa luego de 10, 20 y 60 minutos de incubación. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

En las células HeLa, observamos que luego de 1 hora de expansión, las células controles comenzaban a expandirse y emitir procesos, y con el incremento en el tiempo de incubación, el área celular aumentaba. De forma similar, en las células tratadas con DhL el

área celular y la formación de procesos aumentaba a medida que se extendía el tiempo de incubación. Sin embargo, evidenciamos un defecto en la expansión de las células tratadas con DhL, ya que luego de 3 horas de incubación estas no alcanzaron a aumentar el área como lo hicieron las células controles (**Figura 22 A**). La medición del área celular durante las 3 horas de expansión demostró que las células controles alcanzaron un área de $5.500 \mu\text{m}^2$ en la primera hora, $5.700 \mu\text{m}^2$ en la segunda hora y $7.600 \mu\text{m}^2$ en la tercer hora de expansión. En cambio, en las células tratadas con DhL, el área alcanzada fue de $3.500 \mu\text{m}^2$ en la primera hora, $3.800 \mu\text{m}^2$ en la segunda hora y $3.900 \mu\text{m}^2$ en la tercer hora de expansión. Es decir, durante la primera y segunda hora de expansión no encontramos diferencia significativa entre el área de las células controles y tratadas con DhL, pero luego de 3 horas de expansión, observamos que DhL produjo una disminución del área celular del 50% (**Figura 22 B**).

De igual manera, analizamos el efecto de DhL en la expansión de las células B16-F0 y B16-F10 sobre FN. El tratamiento no produjo diferencias significativas en la expansión de las células B16-F0 y B16-F10 durante la primera y segunda hora de expansión, pero si observamos una disminución del área celular en la tercera hora de expansión. La cuantificación del área celular demostró que la inhibición de la expansión a las 3 horas de incubación fue de 54% en las células B16-F0 y 84% en las células B16-F10 (**Figura 22 B**).

Este resultado indica que DhL produce un defecto en la expansión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 sobre FN.

Concentración de vinculina

Para que la célula se expanda sobre FN necesita de la formación y maduración de las AFs y la vinculina es una proteína clave de este proceso. Se ha reportado que las células depletadas de vinculina tienen habilidad reducida de adherirse a una variedad de proteínas de la MEC. Como DhL inhibe la expansión celular, nos preguntamos si se encuentra afectada la formación de las AFs. Por eso, a continuación analizamos el efecto de DhL en la concentración de vinculina y en la formación de las AFs.

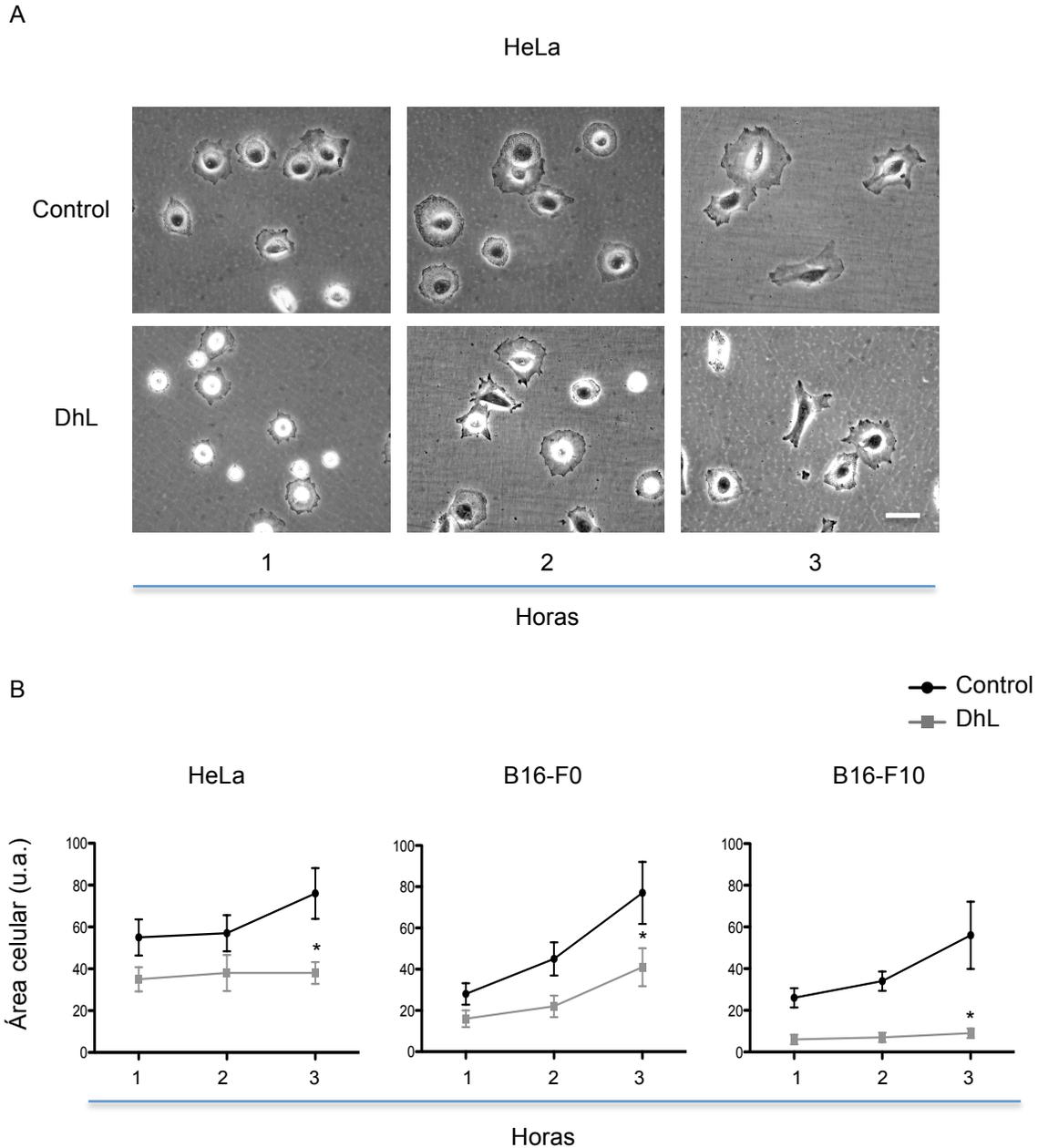


Figura 22. DhL reduce la expansión de las células tumorales sobre FN. Las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL durante 24 horas. Luego, fueron desprendidas con EDTA/PBS, colocadas en placas recubiertas con FN e incubadas durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se eliminaron las células no adheridas a la placa y desde ese momento se midió el área de las células que quedaron adheridas, durante 3 horas de incubación (tiempo de expansión). A) Imágenes en contraste de fase de las células HeLa adheridas a la placa con FN, durante 3 horas de expansión. Barra 50 μ m. B) Área celular (en unidades arbitrarias), de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 durante tres horas de expansión. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

El efecto de DhL en la concentración de vinculina fue estudiado por Western blot. Las células HeLa arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, los

lisados celulares se prepararon en buffer Laemmli y las muestras fueron cargadas en un gel para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las proteínas fueron separadas y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche por 30 minutos, e incubada con el anticuerpo primario anti-vinculina y anti-alfa-tubulina (utilizado como control de carga), por 18 horas a 4 °C. A continuación, se lavó varias veces con PBS-tween seguido de la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), por 2 horas a 22°C. Por último, la detección de las bandas de proteínas se realizó por reacción de quimioluminiscencia.

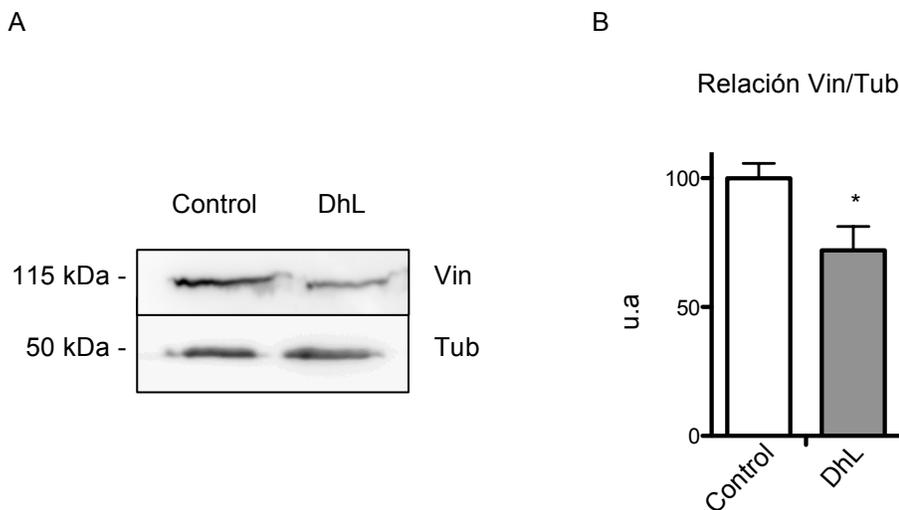


Figura 23. DhL disminuye la concentración de vinculina en las células HeLa. Las células HeLa arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, con el lisado celular se realizó el Western blot y la identificación de la banda de vinculina con el anticuerpo específico. Se utilizó el anticuerpo anti-alfa-tubulina como control de carga. A) Imágenes del revelado del Western blot realizado con los anticuerpos anti-vinculina y anti-alfa-tubulina. B) Con el programa Image J se midió la densidad óptica de las bandas y se calculó la relación entre vinculina y tubulina. Promedio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

En el revelado del Western blot visualizamos las bandas de proteínas correspondientes a vinculina a la altura de 115 kDa, y de alfa-tubulina a 50 kDa (proteína utilizada como control de carga). En las bandas de vinculina evidenciamos que el tratamiento con DhL produjo una disminución de la concentración de la proteína (Figura 23 A). La cuantificación de la densidad óptica de las bandas reveló que en las células tratadas con DhL se produjo una reducción del 28% de la concentración de vinculina (Figura 23 B).

Por lo tanto, consideramos que DhL afecta la expresión de vinculina, la cual es una proteína esencial para la maduración de las AFs y la expansión celular.

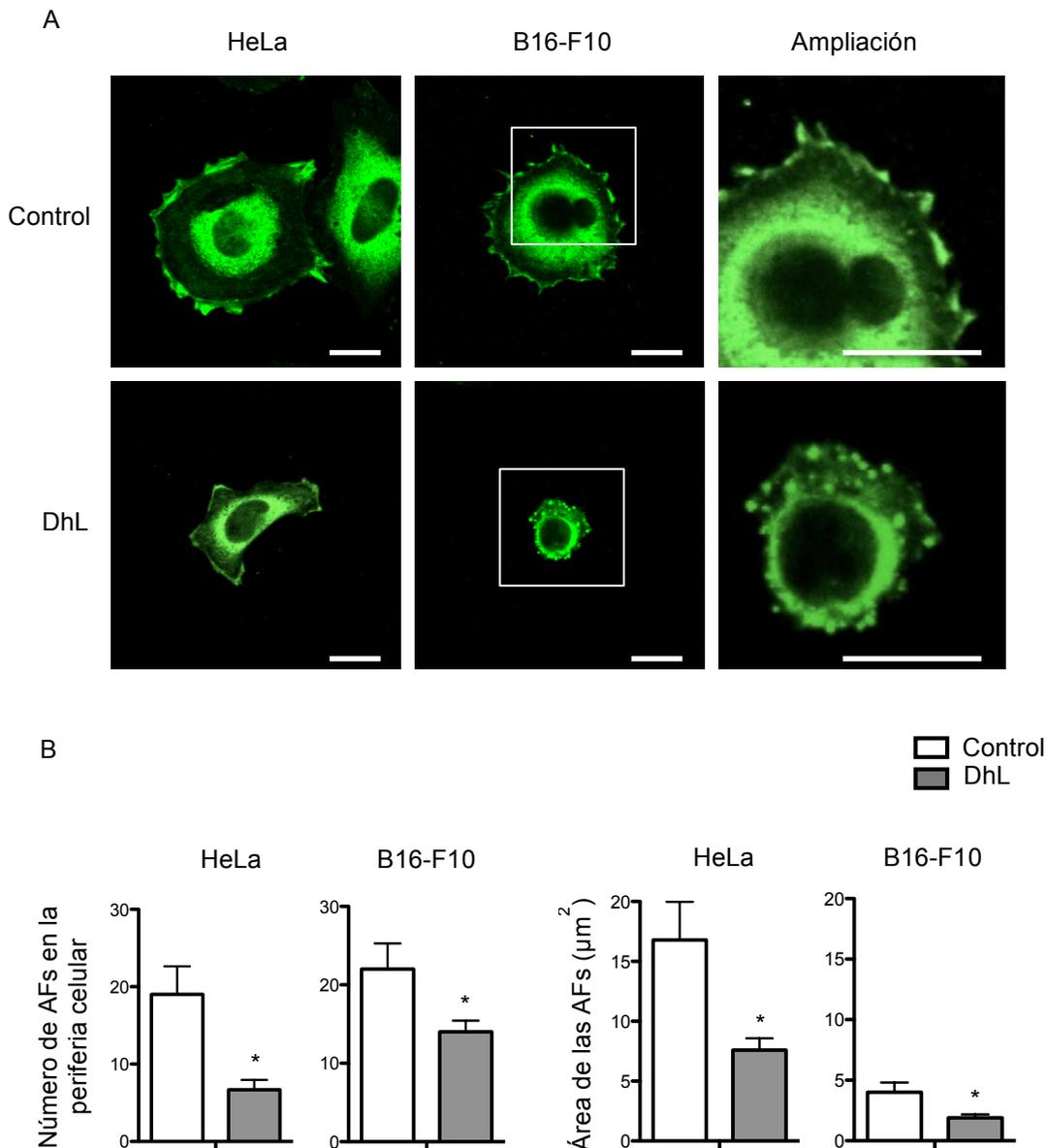


Figura 24. DhL disminuye la cantidad y el tamaño de las adhesiones focales en las células HeLa y B16-F10. Las células HeLa y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Luego, fueron desprendidas con EDTA/PBS e incubadas en placas recubiertas con FN durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se eliminaron las células no adheridas y se incubaron durante 3 horas para permitir la expansión celular. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo fluorescente anti-vinculina-FITC. A) Imágenes de fluorescencia de las células HeLa y B16-F10, controles y tratadas con DhL, luego de 3 horas de expansión. El recuadro blanco indica el área ampliada. Barra 50 μm . La fluorescencia verde marca la vinculina soluble y la presente en las adhesiones focales. B) Cantidad y área de las adhesiones focales de la periferia de las células HeLa y B16-F10. Promedio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

Número y tamaño de las adhesiones focales

Vinculina es una proteína que forma parte de las AFs y comúnmente se la utiliza para visualizar estas estructuras por inmunofluorescencia. Con el fin de investigar el efecto de DhL en la formación de las AFs, analizamos la distribución celular de vinculina mediante la tinción con un anticuerpo fluorescente.

Las células HeLa y B16-F10 arrestadas con HU, fueron tratadas 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Luego desprendimos las células con EDTA/PBS y las incubamos durante 1 hora en placas recubiertas con FN para permitir su adhesión. Posteriormente, retiramos las células no adheridas y continuamos la incubación de las células adheridas a la placa por 3 horas para permitir la expansión celular. Luego de tres horas de expansión, las células fueron fijadas y se realizó la tinción de las AFs con el anticuerpo fluorescente específico para vinculina. Por último, en el microscopio de fluorescencia, analizamos la cantidad y tamaño de las AFs.

En las células HeLa, luego de 3 horas de expansión sobre FN, la tinción con el anticuerpo anti-vinculina-FITC demostró en la periferia celular, la formación de AFs de aspecto alargado. En las células controles las AFs se presentaron en mayor cantidad y tamaño que en las células tratadas con DhL (**Figura 24 A**). Se observaron 19 AFs/célula en las células controles y 6 AFs/célula en las células tratadas con DhL. En cuanto al tamaño de las AFs, en las células controles estas presentaron un área de $16 \mu\text{m}^2$ y en las células tratadas con DhL, $7 \mu\text{m}^2$ (**Figura 24 B**).

El efecto de DhL en el número y tamaño de las AFs también fue analizado en las células B16-F10. En estas, observamos la formación de AFs de aspecto alargado en la periferia de las células controles, en cambio, en las células tratadas con DhL, las AFs se presentaron tanto en la periferia como en la zona más interna de la células y su aspecto fue redondeado. Considerando que solo se contaron las AFs presentes en la periferia celular, en las células controles se observó una cantidad de 22 AFs/célula, en cambio, en las células tratadas con DhL se encontraron 14 AFs/célula. En cuanto al tamaño de las AFs, en las células controles estas fueron de $4 \mu\text{m}^2$ y en las células tratadas con DhL de $1,9 \mu\text{m}^2$ (**Figura 24 A y B**). El marcado cambio en el aspecto de las AFs por el tratamiento con DhL

especulamos que se debe a una falta de maduración de estas estructuras, teniendo en cuenta que la expansión de las células también se mostró gravemente afectada.

Estos resultados evidenciaron que DhL disminuye el número y tamaño de las AFs en las células HeLa y B16-F10.

Conclusión

La interacción entre las células tumorales y la MEC es compleja. La adherencia de las células tumorales a las fibras de la MEC puede desencadenar señales que favorecen la migración celular, el cual es un paso crucial en la metástasis. En esta sección, analizamos el efecto de DhL en la adhesión y expansión de las células tumorales sobre un sustrato de FN, y en la formación de las AFs. Encontramos que el tratamiento con DhL inhibió la adhesión y expansión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 sobre FN. Además, nuestros resultados evidenciaron que el tratamiento con DhL disminuye la concentración de vinculina, y el número y tamaño de las AFs. Estos cambios probablemente contribuyen a disminuir la motilidad celular. Por lo tanto, consideramos que DhL es efectiva en un importante blanco de la terapia antimetastásica, como es la adhesión de las células tumorales a la MEC.

SECCIÓN 3: Efecto de DhL en la capacidad invasiva de las células tumorales

La invasión tumoral es un evento destacado del proceso metastásico, que transforma el crecimiento localizado de un tumor en una afección sistémica. Los pasos iniciales de la invasión local incluyen la activación en las células tumorales, de vías de señalización que controlan la dinámica del citoesqueleto y el recambio de las adhesiones células-matriz y célula-célula, dando lugar a una activa migración a los tejidos adyacentes [127].

El microambiente local o nicho que rodea a la célula tumoral, juega roles importantes en el desarrollo del cáncer. El principal componente de este nicho es la MEC, la cual forma parte del ambiente que circunda a la célula e influencia su funcionamiento [128]. Las células tumorales adquieren la habilidad de atravesar la MEC mediante la expresión de las enzimas MMPs [45]. El grado de sobreexpresión de ciertas MMPs se ha visto correlacionado con el estadio del cáncer y su pronóstico. Las MMPs -2 y -9 presentan un peso molecular de 72 y 92 kDa respectivamente y se consideran efectoras clave en el proceso metastásico, porque promueven la invasión de las células tumorales, a través de la degradación del colágeno tipo IV. Por consiguiente, se considera que la inhibición de las MMPs podría ser una estrategia efectiva para el tratamiento del cáncer [44], [48].

Entre las vías de señalización que favorecen la invasión tumoral se encuentran las que convergen en las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que incluyen las subfamilias ERK $\frac{1}{2}$, quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y p38 [129]. Estas proteínas son serina/treonina quinasas con importantes roles en el desarrollo del fenotipo tumoral, y se presentan desreguladas en aproximadamente un tercio de los tumores humanos. Estas quinasas son activadas por fosforilación debido a numerosas señales extracelulares provenientes de factores de crecimiento, sustancias quimiotácticas, interleuquinas y factores de estrés ambiental [130], [131].

ERK $\frac{1}{2}$ tiene la capacidad de estimular la fosforilación de miosina, la asociación de paxilina y FAK, la activación de calpaína y la expresión de MMPs, y en consecuencia, da lugar a la protrusión de la membrana, la renovación de las AFs y la degradación de la MEC. JNK es otra MAPKs que tiene como sustrato proteínas que favorecen la renovación de las AFs, y la dinámica de la actina y los microtúbulos. Por último, se encuentra p38 que también

favorece la migración e invasión celular al estimular proteínas como paxilina, la proteína de golpe de calor pequeña 27 (Hsp-27) y caldesmon, que actúan sobre las AFs y el citoesqueleto [132]. Además, p38 también modula la actividad de MMP-2 y MMP-9, las cuales son enzimas claves del proceso invasivo [133].

En este trabajo, nos preguntamos si DhL tiene efecto en el proceso de invasión de las células tumorales. Para contestar esta pregunta desarrollamos una serie de experimentos con líneas celulares de distinta capacidad metastásica. En primer lugar, evaluamos la invasión celular mediante la utilización de cámaras *transwell* con matrigel. Luego, estudiamos la actividad de las MMPs que las células liberan al medio extracelular con la técnica de zimografía. Por último, analizamos la activación de ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38 mediante Western blot.

Resultados

Invasión celular

La invasión de las células tumorales es típicamente evaluada *in vitro* mediante el ensayo de invasión en cámaras *transwell* con matrigel. El matrigel, es un extracto derivado de un tumor de ratón, rico en laminina y colágeno tipo IV, y es utilizado como un sustituto de tejido para investigar una variedad de comportamientos celulares, incluida la invasión. En el ensayo de invasión, una fina capa de matrigel recubre una membrana porosa ubicada en la base de la cámara *transwell*. Así, el sembrado de las células en la cámara superior permite analizar la capacidad de las mismas de invadir el matrigel y atravesar la membrana para llegar a la cámara inferior que contiene 10% SFB como quimioattractante. Para examinar el efecto de DhL en la invasión celular, desarrollamos este ensayo, con líneas de células tumorales de distinta capacidad metastásica: HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 derivan ambas, de un adenocarcinoma mamario humano, pero las MCF-7 presentan baja capacidad invasiva en comparación con las MDA-MB-231, las cuales son más invasivas y resistentes a las drogas [134]. Las células B16-F0 y

B16-F10 provienen de un melanoma de ratón C57BL/6. Las células B16-F0 son menos invasivas que las células B16-F10 [135].

Para el ensayo de invasión las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231 fueron cultivadas con 10% SFB hasta un 80% de confluencia y posteriormente, incubadas con medio de cultivo sin suero por 24 horas. Luego, las células fueron desprendidas con tripsina, sembradas en cámaras *transwell* recubiertas con matrigel e incubadas por 1 hora para permitir la adhesión celular. A continuación, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Posteriormente, se eliminaron las células que quedaron en la cámara superior del matrigel (células que no migraron) y se tiñeron con cristal violeta las células ubicadas en la cámara inferior (células que migraron). Para terminar, las células fueron visualizadas en un microscopio óptico con objetivo 20x.

El análisis de la invasión del matrigel demostró claramente la diferencia en la capacidad invasiva que poseen las distintas líneas celulares que utilizamos para este experimento. Así, las células con características más invasivas, como son las células B16-F10 y las MDA-231 fueron las que penetraron el matrigel en mayor número (**Figura 25 A**).

El recuento de las células HeLa que atravesaron el matrigel demostró que las células controles invadieron el matrigel con facilidad, encontrándose 39 células/c. En cambio, las células tratadas con DhL mostraron una menor habilidad de penetrar los transwell y solamente invadieron 20 células/c (**Figura 25 B**).

En las células controles B16-F0 y B16-F10, encontramos que invadieron 48 y 72 células/c respectivamente, en cambio el tratamiento con DhL redujo el proceso invasivo a 22 células/c en las B16-F0 y 43 células/c en las B16-F10 (**Figura 25 B**). Con las células de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231 obtuvimos un resultado similar. En los controles invadieron 35 y 57 células/c, MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente, y el tratamiento con DhL redujo la invasión a 18 células/c en las MCF-7 y 28 células/c en las MDA-MB-231 (**Figura 25 B**).

Por lo tanto, el tratamiento con DhL redujo la habilidad de las células tumorales de penetrar el matrigel. La inhibición en la invasión celular fue de 49% en HeLa, 55% en B16-F0, 41% en B16-F10, 48% en MCF-7 y 51% en MDA-MB-231. Si bien el porcentaje de inhibición de la invasión no fue muy diferente entre las líneas celulares utilizadas, este

resultado claramente demostró que DhL inhibe significativamente el proceso de invasión de todas las células tumorales analizadas.

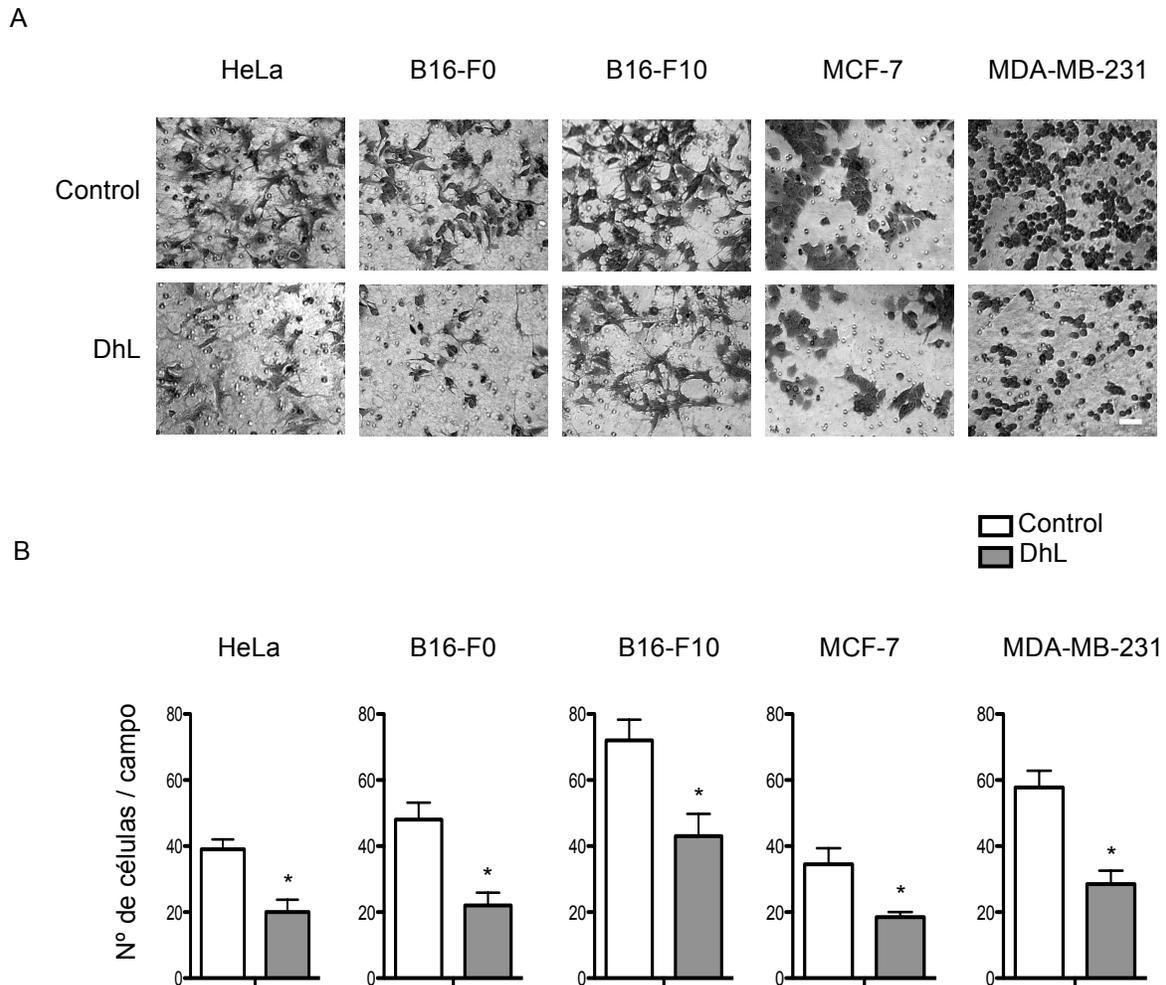


Figura 25. DhL inhibe el proceso de invasión en las células tumorales. Las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-MB-231, fueron sembradas en placas transwell recubiertas con matrigel, arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. A) Las células que atravesaron el matrigel fueron teñidas con cristal violeta y fotografiadas con un microscopio óptico (objetivo 20x). Barra 50 μ m. B) Número de células/c observadas. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

Debido a que el proceso de invasión requiere de la degradación de la MEC por las células tumorales, a continuación estudiamos el efecto de DhL en la actividad de las MMPs liberadas al medio extracelular por las células HeLa y B16-F0.

Actividad de las MMPs

Para estudiar si DhL tiene efecto en la actividad de las MMPs utilizamos la técnica de zimografía. Este es un método sensible y cuantificable que permite el análisis funcional de las enzimas degradativas según su peso molecular.

La zimografía se basa en una SDS-PAGE, que contiene el sustrato (gelatina) copolimerizado en la matriz del gel de poliacrilamida, al que se le carga la muestra y se hacen correr las proteínas a analizar. Las muestras son preparadas de la misma manera que para una SDS-PAGE estándar, pero se realiza bajo condiciones no desnaturizantes (en ausencia de β -mercapto-etanol y calor). La corrida electroforética es seguida por la incubación del gel en un buffer de activación apropiado, en el cual las enzimas recuperan su forma nativa y actúan sobre la gelatina. Luego, mediante la tinción del gel con azul de Coomasie, las áreas de digestión pueden ser distinguidas porque aparecen como bandas claras en un fondo azul oscuro.

Para realizar esta técnica, las células HeLa y B16-F0 fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, se recuperó el medio de cultivo y se cargaron volúmenes iguales en un gel al 8% poliacrilamida con 1% gelatina. Realizamos la electroforesis en condiciones reductoras, no desnaturizantes, lo que permitió la separación de las enzimas según su peso molecular. Luego, el SDS fue eliminado del gel mediante lavados con Tritón X-100. Posteriormente, el gel fue incubado en un buffer renaturalizante por 48 horas y por último, la tinción del gel con azul de Coomasie nos permitió evidenciar la acción gelatinolítica de las enzimas.

En el gel correspondiente a las muestras de las células HeLa, observamos una serie de bandas de digestión a la altura de 100, 92, 72 y 62 kDa. Luego de fotografiar el gel, el análisis de la densidad óptica de las bandas demostró que DhL efectivamente disminuyó la digestión de la gelatina (**Figura 26 A**). Si consideramos que las bandas de digestión que se encuentran a 100 y 92 kDa podrían corresponder, según su movilidad electroforética, al zimógeno de MMP-9 (pro-MMP-9) y a la MMP-9 respectivamente, la disminución de la digestión de la gelatina por el tratamiento con DhL sería del 14% (**Figura 26 A y B**). En base a un análisis similar, las bandas encontradas a la altura de 72 y 62 kDa podrían corresponder

a la pro-MMP-2 y a la MMP-2, respectivamente, y en este caso la disminución de la digestión sería del 15% (Figura 26 A y B).

Por otro lado, la zimografía de las muestras correspondientes a las células B16-F0, demostró una banda de digestión a la altura de 85 kDa en las células controles. En cambio, en las células tratadas con DhL la banda de digestión se encontraba ausente, por lo tanto consideramos que DhL anuló completamente la actividad de esta MMP (Figura 26 C).

Con este resultado, demostramos que DhL disminuye la actividad de las colagenasas liberadas al medio extracelular por las células HeLa y B16-F0.

Debido a que la actividad de las MMPs -2 y -9 es regulada por las MAPKs, y además estas quinasas juegan un rol importante en la inducción de la migración e invasión celular, a continuación analizamos el efecto de DhL en la activación de ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38.

Activación de las MAPKs

Para determinar el efecto de DhL en la activación de las MAPKs estudiamos mediante Western blot la concentración de las proteínas ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38, y sus respectivas formas fosforiladas.

Las células HeLa arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células fueron recolectadas en buffer de lisis con inhibidores de proteasas y el lisado celular se preparó con buffer Laemmli. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo para la proteína fosforilada ERK $\frac{1}{2}$, por 18 horas a 4°C, seguido por la incubación con el anticuerpo secundario marcado con HRP. Posteriormente, las bandas de proteínas fueron reveladas por reacción de quimioluminiscencia. A continuación, la misma membrana se incubó con una solución de leche para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, y el proceso de incubación y revelado se repitió con el anticuerpo contra la proteína total de ERK $\frac{1}{2}$. El Western blot se realizó de la misma manera para evaluar los niveles de activación de JNK y p38.

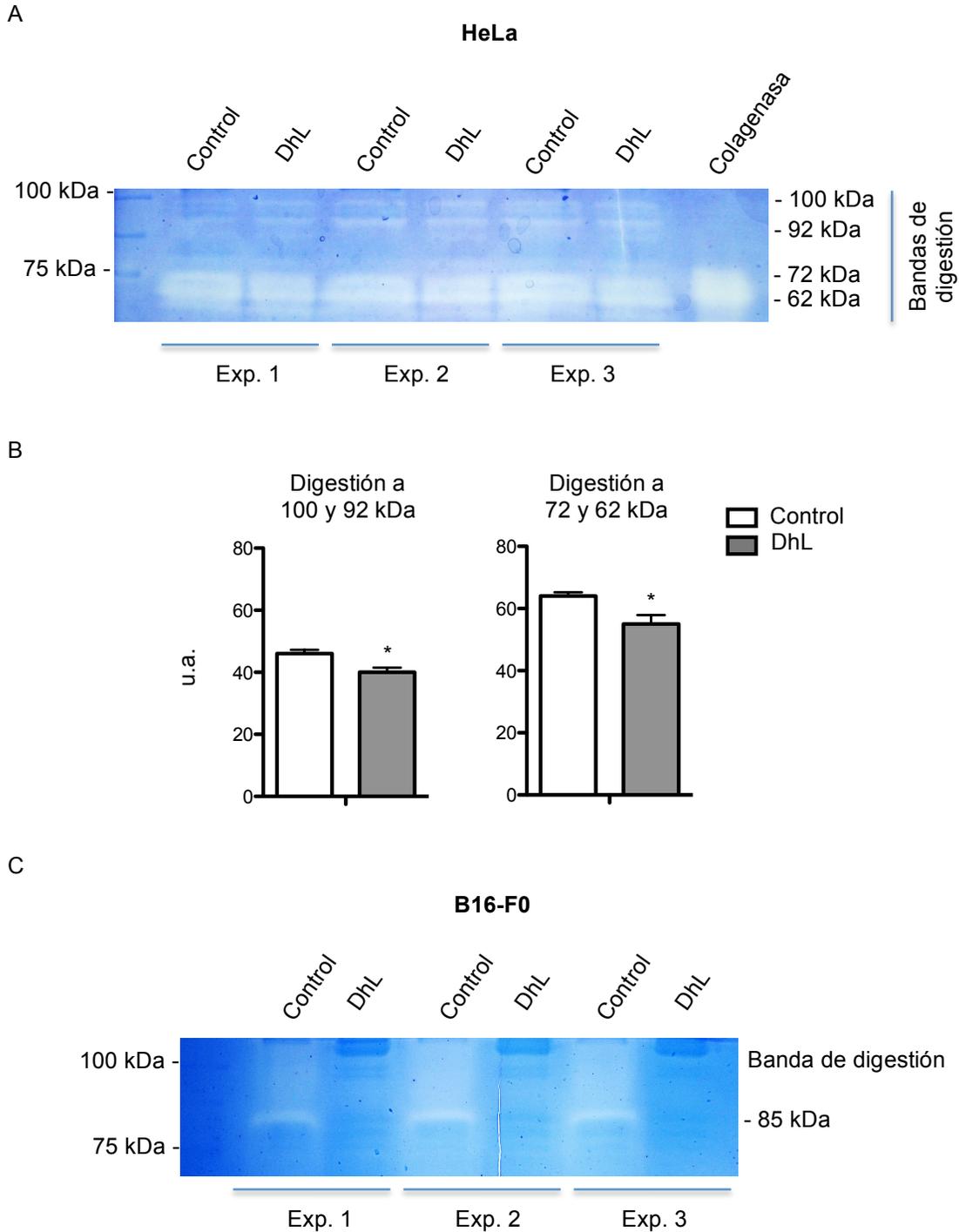


Figura 26. DhL inhibe la actividad de las MMPs en las células HeLa y B16-F0. Las células HeLa y B16-F0 arrestadas con HU, fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, se recuperó el medio de cultivo y se realizó la zimografía. A y C) Las bandas claras corresponden a la actividad gelatinolítica de las proteínas separadas según su movilidad electroforética. Se utilizó la enzima colagenasa (68 kDa) como control de actividad gelatinolítica. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular. B) Cuantificación de la densidad óptica de las bandas de digestión de gelatina. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n = 3$

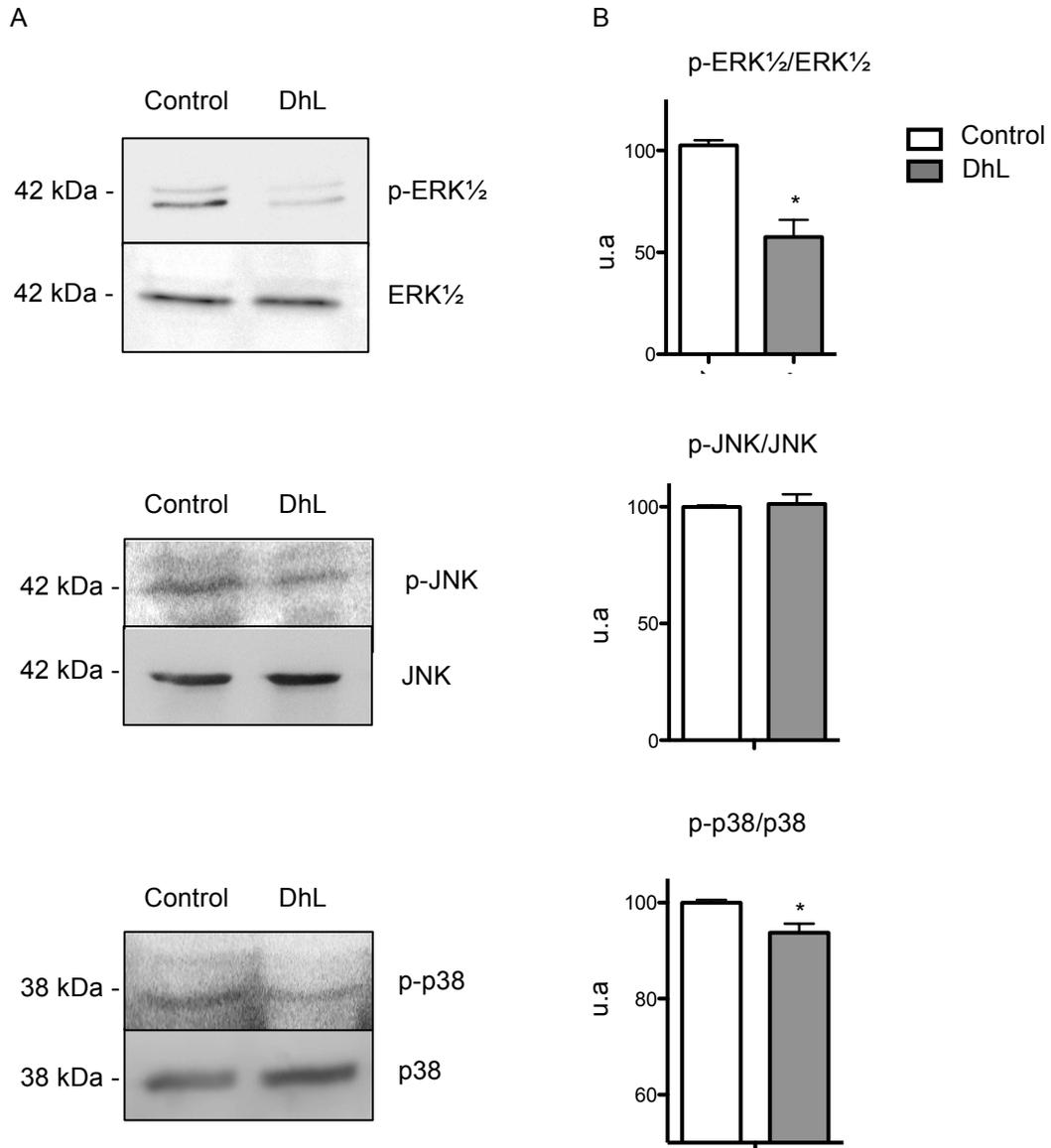


Figura 27. DhL disminuye la actividad de ERK $\frac{1}{2}$ y p38, pero no afecta la de JNK. Las células HeLa arrestadas con HU fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, con el lisado celular se realizó el Western blot y la identificación de las bandas de p-ERK $\frac{1}{2}$, ERK $\frac{1}{2}$, p-JNK, JNK, p-p38 y p38 con los anticuerpos específicos. A) Imágenes del revelado del Western blot realizado para la identificación de ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38, y sus respectivas formas fosforiladas. B) Con el programa Image J se midió la densidad óptica de las bandas y se calculó la relación entre p-ERK $\frac{1}{2}$ /ERK $\frac{1}{2}$, pJNK/JNK y p-p38/p38. Promedio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=2$

Como resultado del revelado del Western blot para ERK $\frac{1}{2}$ total y su forma fosforilada (p-ERK $\frac{1}{2}$), observamos una doble banda a la altura de 42 kDa, en las cuales se determinó la densidad óptica. La relación entre p-ERK $\frac{1}{2}$ y ERK $\frac{1}{2}$ total mostró una

significativa reducción (45%) por el tratamiento con DhL, lo que sugiere una importante inhibición en la activación de ERK (Figura 27).

El mismo análisis se realizó con el Western blot para las proteínas JNK y p38. La relación de la densidad óptica de las bandas de proteínas correspondientes a JNK y su forma fosforilada (p-JNK) no mostró diferencia significativa por el tratamiento con DhL. En cambio, la relación de los niveles de p38 y su forma fosforilada (p-p38) demostró que DhL produce una leve reducción (7%) de la activación de esta quinasa (Figura 27).

Debido a este resultado, consideramos que DhL no afecta la activación de JNK, pero si disminuye levemente la activación de p38 y en gran medida la de ERK $\frac{1}{2}$.

Conclusión

En esta sección hemos investigado acerca del efecto de DhL en el proceso de invasión de las células tumorales. Para esto, desarrollamos experimentos que nos permitieron analizar la capacidad de las células de invadir una matriz tisular, la actividad de las MMPs y la activación de las MAPKs.

El ensayo de invasión en cámaras *transwell* recubiertas con matrigel evidenció que DhL tiene efecto inhibitorio de la capacidad invasiva de las células HeLa, B16-F0, B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231. La reducción de la invasión por el tratamiento con DhL fue marcada (cercana al 50%), inclusive en aquellas líneas celulares de alta capacidad metastásica como son las células B16-F10 y las células MDA-MB-231.

En el proceso de invasión, la actividad de las MMPs juega un papel crucial al degradar la MEC. Mediante la técnica de zimografía evaluamos el efecto de DhL en la actividad de las MMPs que las células liberan al medio extracelular. Así, descubrimos que en las células HeLa, DhL reduce la actividad gelatinolítica de las enzimas que poseen movilidad electroforética similar a las MMPs -2 y -9, las cuales son enzimas que suelen estar sobreexpresadas en los tumores metastásicos. De la misma manera, en las células B16-F0 DhL inhibió completamente la actividad de la MMP que posee un peso molecular aproximado de 85 kDa.

Por último, evaluamos mediante Western blot la activación de las MAPKs, ERK $\frac{1}{2}$, JNK y p38, las cuales estimulan la migración e invasión y suelen estar desreguladas en los

tumores. El estudio del efecto de DhL sobre estas proteínas demostró que el tratamiento no afecta la activación de JNK, pero produce una leve disminución de la activación de p38 y una marcada inhibición de la activación de ERK $\frac{1}{2}$.

Por lo tanto, en esta sección hemos abarcado tres procesos importantes de la invasión tumoral al analizar la capacidad de las células tumorales de penetrar una matriz tisular, la actividad de las colagenasas que degradan la MEC y la activación de las MAPKs que regulan procesos relacionados con la metástasis. Nuestros resultados indican que DhL inhibe varios procesos que estimulan la invasión celular y por lo tanto consideramos que este compuesto posee potencial antimetastásico.

SECCIÓN 4: Efecto de DhL en la motilidad y morfología celular, y en las proteínas que conforman el citoesqueleto

La motilidad celular es esencial para muchos procesos biológicos, como el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, y el cierre de heridas. Es un proceso complejo, integrado, que requiere cambios en la expresión de genes, la transducción de señales, la organización de la membrana y el citoesqueleto. Las señales que participan en la regulación de la migración celular son precisamente controladas porque una migración inapropiada puede resultar en condiciones patológicas como la inflamación o la invasión tumoral [136].

La migración celular involucra un ciclo de cuatro pasos. 1) La polimerización del citoesqueleto de actina genera el lamelipodio que conduce la extensión inicial de la membrana plasmática en el frente celular. 2) En la protrusión recién formada se generan las AFs, que involucran el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto y se unen a la MEC para estabilizar la base del lamelipodio. 3) La red contráctil de actina-F localizada en la lamela y el área ventral de la célula, utiliza las AFs como sitios para impulsar el cuerpo celular hacia delante. 4) Por último, la liberación de las AFs y la retracción de la parte posterior de la célula completa el ciclo migratorio, que permite la translocación neta de la célula en la dirección del movimiento [20].

Encontrar agentes que puedan frenar la motilidad celular es crucial para la cura o el tratamiento preventivo de muchas enfermedades que son causadas por anormalidades en la locomoción celular. En base a esto, el estudio de la migración de las células tumorales es esencial para comprender el efecto de las drogas y así tratar satisfactoriamente las metástasis [63].

La velocidad de migración y direccionalidad de las células tumorales son importantes parámetros para determinar su potencial metastásico. Los procedimientos que anulan el movimiento de las células tumorales son generalmente considerados fuertes candidatos para nuevas terapias para tratar las metástasis. De forma similar, los métodos que no anulan completamente el movimiento pero disminuyen la velocidad de migración celular se espera que restrinjan la diseminación de las células desde el tumor primario e incrementen la oportunidad de localizar una terapia específica [63].

El movimiento *in vitro* de las células eucariotas sobre una superficie adhesiva uniforme está caracterizado por una marcha persistente y aleatoria. Las células migran con trayectorias bastante rectas, durante intervalos de tiempo cortos, mientras en intervalos de tiempo más largos, las células ejecutan cambios aleatorios en la dirección. La transición entre estos regímenes ocurre en una escala de tiempo que depende del contexto experimental. Aunque está claro que la migración sobre una superficie rígida es muy diferente de la motilidad celular *in vivo* como se observa en las metástasis, la migración celular en dos dimensiones es un sistema viable para estudiar los aspectos fundamentales del movimiento de las células [21].

En el trabajo de esta sección, nuestro objetivo fue analizar si DhL afecta la migración de las células tumorales y el mecanismo por el cual actúa. En este sentido, realizamos dos tipos de experimentos de migración, como son el ensayo de la herida y el ensayo en cámaras *transwell*. Así, cuantificamos las principales características de la migración celular, tales como la velocidad y la direccionalidad. También, evaluamos la morfología celular y los cambios que se producen en el citoesqueleto de actina y los microtúbulos. Luego, estudiamos las propiedades dinámicas del frente de avance celular, como son la protrusión de la membrana y la formación de *ruffles*. Por último, evaluamos la distribución celular y los niveles de activación de la proteína Rho GTPasa Rac1, la cual es clave en la polimerización de actina, el desarrollo del frente de avance celular y una migración efectiva.

Resultados

Migración de las células tumorales

El análisis *in vitro* de la migración de células epiteliales se realiza frecuentemente mediante el ensayo de la herida. Este es un método que ha sido utilizado por mucho tiempo para estudiar la migración celular. Las células son sembradas en placas de cultivo e incubadas hasta que forman una monocapa. Entonces, con una punta de pipeta se raspa la monocapa para crear un área libre de células y así se las estimula a migrar. Luego los

cultivos son fotografiados a través del tiempo en el microscopio óptico para monitorear el cierre de la herida.

Por otro lado, existe el ensayo de migración *transwell* que ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la motilidad de diferentes tipos de células, incluyendo las células tumorales metastásicas. Este ensayo sirve especialmente para estudiar compuestos que actúan como quimioattractantes o inhibidores de la quimiotaxis celular. El ensayo radica en una membrana permeable de soporte posicionada entre dos compartimientos. Así, las células colocadas en la cámara superior del *transwell*, migran a través de los microporos de la membrana, atraídas por el quimioattractante. Luego, las células que migraron pueden ser cuantificadas mediante recuento en el microscopio óptico.

Para investigar el efecto de DhL en la migración de las células tumorales desarrollamos el ensayo de la herida y de migración *transwell* en células HeLa, B16-F0 y B16-F10.

Para realizar el ensayo de la herida, incubamos las células HeLa, B16F0 y B16F10 hasta un 80% de confluencia, realizamos la herida, las arrestamos con HU y las tratamos con concentraciones crecientes de DhL (0, 5, 10 y 20 μM). Como inhibidor de la migración utilizamos 1 $\mu\text{g/ml}$ citocalasina B (CitB), que afecta la polimerización de los filamentos de actina y de esta manera se inhibe la migración celular [137]. Tomamos fotografías de la herida a las 0 y 24 horas y contamos la cantidad de células que cubrieron la zona de la herida.

En el ensayo de la herida con células HeLa, encontramos que a las 24 horas de tratamiento, las células controles habían cubierto la herida en un número considerable. En cambio, el tratamiento con CitB inhibió casi por completo la migración celular. Por otro lado, los tratamientos con 5-20 μM DhL mostraron una importante disminución del número de células que migraron (**Figura 28 A**). El análisis del número de células, indicó que a las 24 horas cubrieron la herida 222 células en el control, 157 células en el tratamiento con 5 μM DhL, 132 células con 10 μM DhL, 116 células con 20 μM DhL y 115 células con CitB (**Figura 28 B**). Estos resultados indican que CitB impidió la migración de las células HeLa y que DhL inhibió la migración en forma concentración dependiente, encontrándose que 20 μM DhL produjo un efecto inhibitorio similar a CitB (**Figura 28 B**).

En las células B16-F0, a las 24 horas de tratamiento, CitB produjo una marcada inhibición de la migración celular, similar a la observada con 20 μ M DhL. El número de células controles que cubrieron la herida fue de 250, mientras que en las células tratadas con 20 μ M DhL fue de 117 y con CitB fue de 117 células (**Figura 28 A y B**).

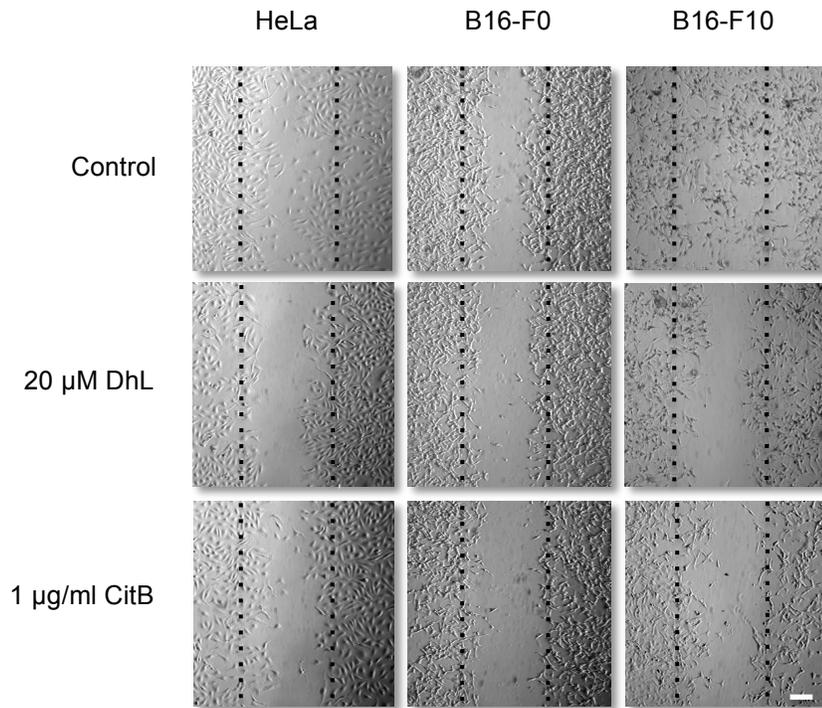
En las células B16-F10 se observó un resultado similar al de las células HeLa y B16-F0. CitB produjo una importante inhibición de la migración celular al igual que el tratamiento con 20 μ M DhL. El número de células que cubrieron la herida a las 24 horas de tratamiento fue de 220 en las células controles y 113 en las células tratadas con 20 μ M DhL (**Figura 28 A y B**).

Por lo tanto, 20 μ M DhL produjo una disminución del cierre de la herida de 42% en las células HeLa, 25% en B16-F0 y 45% en B16-F10. Estos resultados indican que el cierre de la herida fue inhibido de forma concentración dependiente por el tratamiento con DhL en las tres líneas celulares.

Para el ensayo de migración *transwell*, una suspensión de 5.000 células HeLa, B16-F0 y B16-F10 se colocó en la cámara superior del *transwell* que tiene como base una membrana con poros de 8 μ m. Luego, las células se incubaron durante 2 horas para permitir la adhesión celular. Posteriormente, las células fueron arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Por último, las células que atravesaron la membrana y llegaron a la cámara inferior fueron teñidas y contadas con el microscopio óptico (objetivo 20x).

En las células HeLa, observamos que el tratamiento con DhL produjo una importante disminución del número de células que atravesaron la membrana. El recuento celular demostró que en las células controles migraron 88 células/c y en las tratadas con DhL 32 células/c (**Figura 29**). Este mismo análisis se realizó en las células B16-F0 y B16-F10 y en ambas líneas celulares observamos que el tratamiento con DhL redujo la proporción de células que atravesaron la membrana. En las células B16-F0 controles migraron 98 células/c y en las tratadas con DhL 28 células/c. En las células B16-F10 controles atravesaron la membrana 82 células/c y en las tratadas con DhL 47 células/c. Por lo tanto, el tratamiento con 20 μ M DhL produjo una inhibición de la migración *transwell* de 63% en las células HeLa, 71% en las B16-F0 y 43% en las B16-F10 (**Figura 29**).

A



B

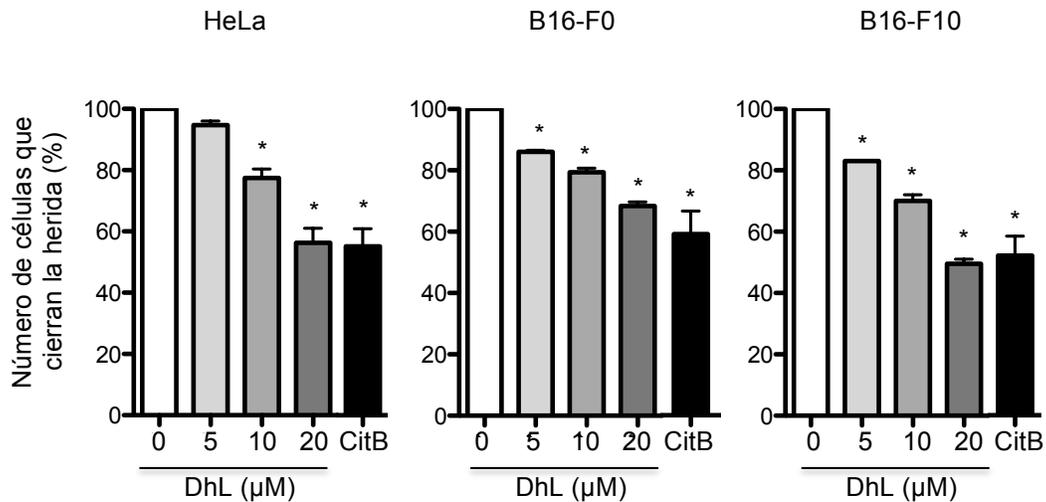
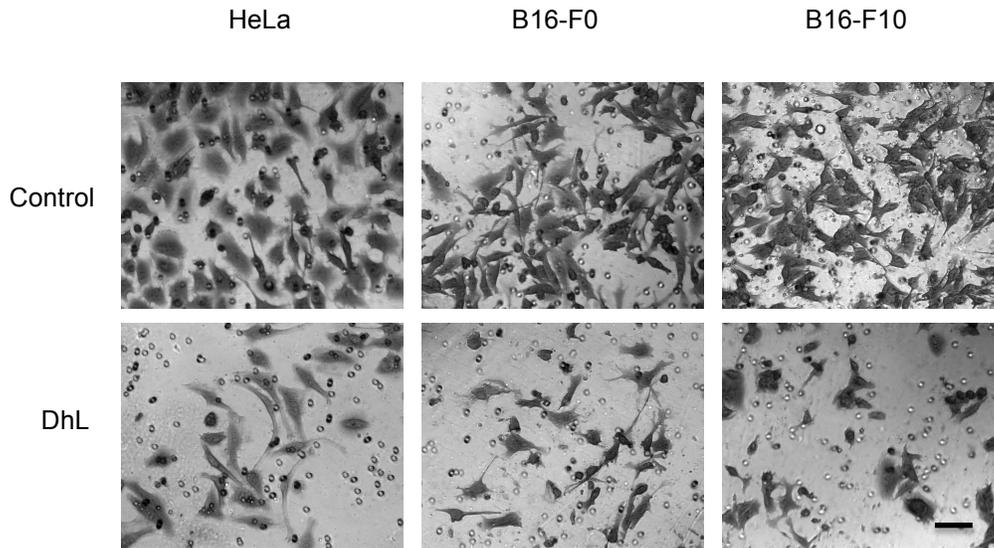


Figura 28. DhL inhibe el cierre de la herida en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10. Se realizó la herida en una monocapa de células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU y se trataron con 0, 5, 10 ó 20 μM DhL, y 1 μg/ml CitB. A) Imágenes en contraste de fase de la herida a las 24 horas de tratamiento. La línea punteada indica el margen de la herida al comienzo del tratamiento. Barra 100 μm. B) Número de células que cubren la herida a las 24 horas del tratamiento. Valor medio ± SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

A



B

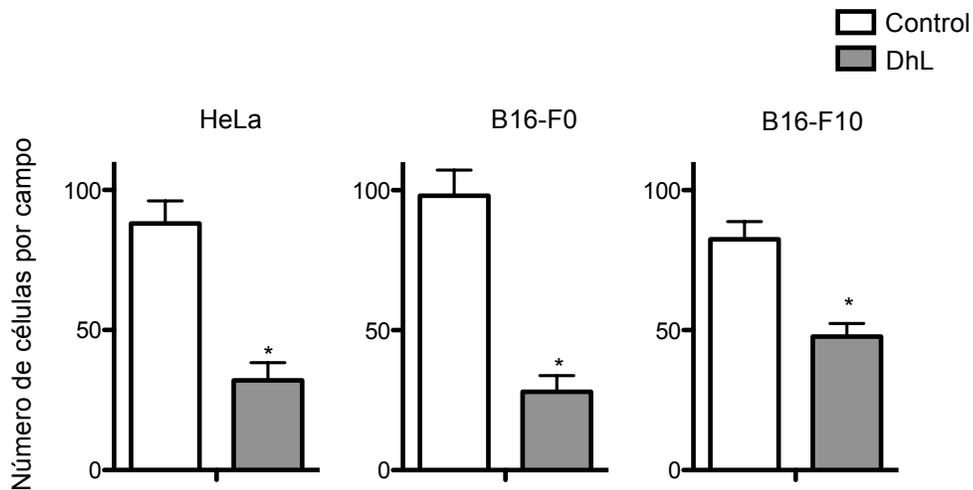


Figura 29. DhL inhibe la migración de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10: Las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 fueron colocadas en cámaras *transwell* con membrana de poros de 8 μm , en una densidad de 5.000 células/p. Luego, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Posteriormente, las células que atravesaron a la cámara inferior fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y contadas en un microscopio óptico con contraste de fase y objetivo 20x. A) Imágenes de la cámara inferior del *transwell*, a las 24 horas de tratamiento. Barra 50 μm . B) Número de células por campo, que atravesaron la membrana a las 24 horas del tratamiento. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$

Con estos resultados demostramos mediante dos técnicas, que DhL inhibe el proceso de migración en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10.

La inhibición en el cierre de la herida y la capacidad de atravesar la membrana del

transwell podrían deberse a una disminución de la velocidad de migración celular o a la pérdida de la dirección en la trayectoria (direccionalidad). Para analizar el efecto de DhL en estos parámetros utilizamos la video microscopía.

Velocidad de migración y direccionalidad

El uso de la video microscopía nos provee una importante herramienta para realizar mediciones cuantitativas del movimiento de las células en diferentes condiciones. El rastreo celular, conocido en inglés como *cell tracking*, comprende técnicas para monitorear el comportamiento de las células a través del tiempo. Esto incluye el comportamiento migratorio, la división celular, los contactos transcientes célula-célula, el movimiento del citoesqueleto y el destino celular.

Un requisito básico para el rastreo celular *in vitro* es poseer un equipo de microscopía convencional con una platina termostatazada, acompañado de un sistema de adquisición de imágenes automático y computadorizado, con suficiente resolución espacio-temporal. La adquisición de imágenes periódicas de las células, resulta en una larga secuencia de imágenes que representan los datos crudos sobre los cuales operan los algoritmos de rastreo celular.

La mayoría de estos algoritmos consisten en dos partes independientes: 1) la detección de las células en cada imagen individual y 2) el rastreo celular, identificar y seguir cada célula a través de las imágenes, y de este modo reconstruir su continuidad temporal. A pesar del considerable rango de algoritmos de rastreo automático que existen, el resultado más confiable sigue siendo el rastreo manual y es el que realizamos en este trabajo.

El ensayo de la herida es un modelo muy adecuado para estudiar la migración direccional, en el cual una franja de células de una monocapa confluyente es eliminada y las células remanentes migran colectivamente para cerrar la herida. Debido a que DhL produce una inhibición del cierre de la herida en las células HeLa, B16-F0 y B16-10, nos propusimos determinar si el cambio en el movimiento neto de las células se debe a una alteración en la velocidad o en la direccionalidad de la migración.

Mediante video microscopía y el posterior rastreo celular, analizamos como las células HeLa migraban para cerrar la herida. Para esto se realizó la herida en la monocapa

de las células HeLa, se arrestaron con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL. A continuación, en el microscopio de contraste de fase, las imágenes fueron capturadas cada 15 minutos por 24 horas (con objetivo 20x). Luego, la trayectoria de cada célula fue rastreada manualmente en la secuencia de imágenes, con el programa Image J. Solo fueron rastreadas las células ubicadas en el margen de la herida, y las células en división o apoptosis fueron excluidas del análisis. El trayecto celular lo proyectamos en los ejes x-y, y medimos la distancia total atravesada por las células y así, calculamos la velocidad de migración (distancia recorrida por unidad de tiempo) y la direccionalidad (proporción de la distancia vectorial recorrida en la longitud total del trayecto de la célula).

Como se puede observar en las fotografías de la zona de la herida tomadas a tiempo 0 y 24 horas, las células controles avanzaron considerablemente sobre la herida, en cambio, en las células tratadas con DhL se observó un discreto avance (**Figura 30 A**).

El análisis cuantitativo de las imágenes adquiridas de la migración de las células HeLa, demostró que las células controles presentaban una velocidad de 5,38; 5,16; 3,59 y 2,01 $\mu\text{m}/\text{h}$ a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento respectivamente, mientras que las células tratadas con DhL poseían una velocidad de 2,79; 2,43; 2,02 y 1,24 $\mu\text{m}/\text{h}$ a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento, respectivamente (**Figura 30 B**). En concordancia con la notable diferencia entre las dos poblaciones en el avance de las células sobre la herida, observamos que las células tratadas con DhL exhiben una disminución significativa de la velocidad de migración a las 6 y 12 horas de tratamiento.

Luego, nos preguntamos como sería la direccionalidad de las células a lo largo del tratamiento con DhL. Así, el análisis de la trayectoria de las células controles demostró que esta era perpendicular al eje mayor de la herida con una direccionalidad de 0,93. En las células tratadas con DhL, la trayectoria de las células fue similar al control con una direccionalidad de 0,85 (**Figura 30 C y D**). Por lo tanto, no se produjo una diferencia significativa en la direccionalidad de migración por el tratamiento con DhL.

Concluimos que el tratamiento con DhL altera significativamente la velocidad de migración de las células pero no produce cambios en la trayectoria de la migración.

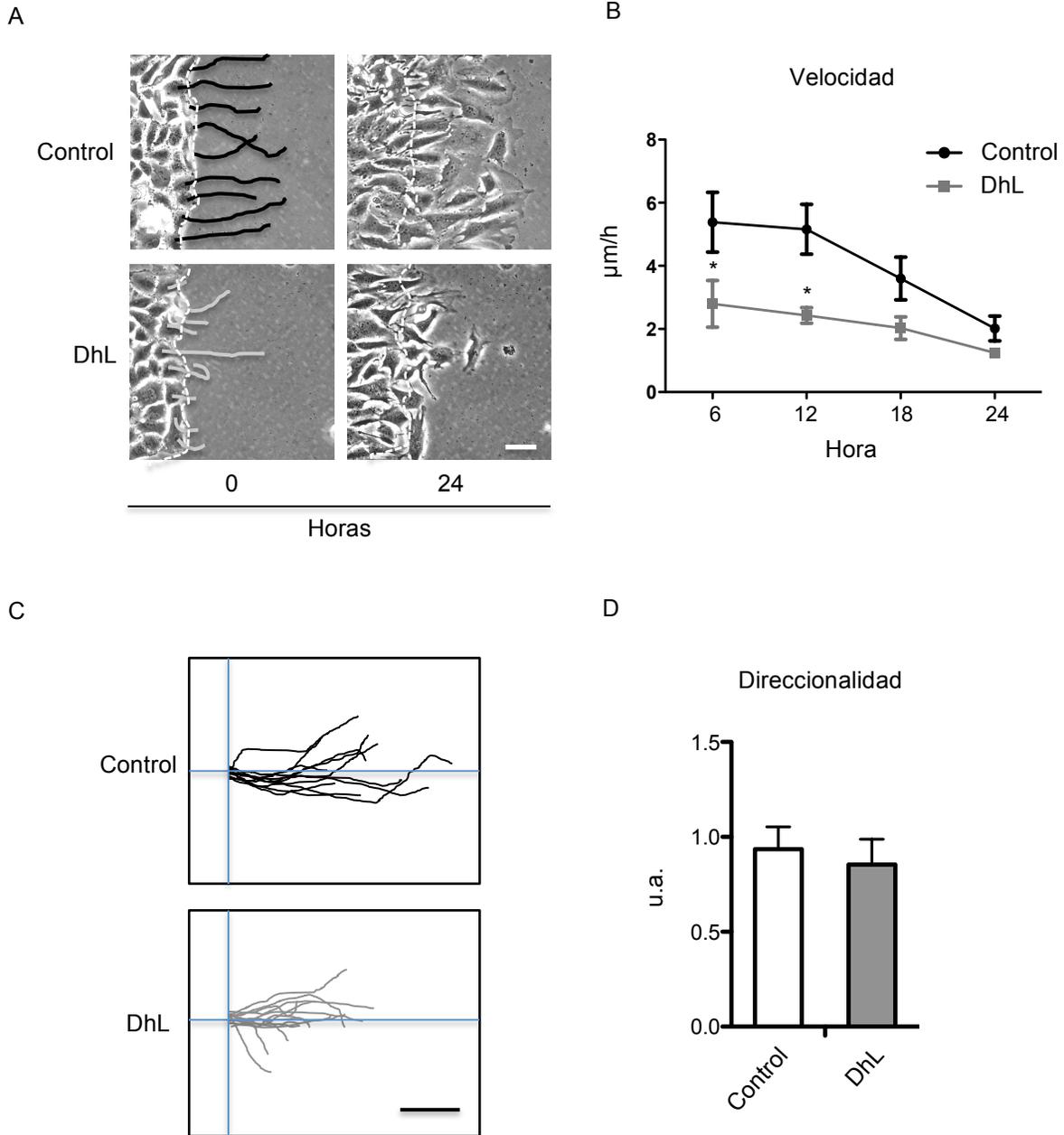


Figura 30. DhL disminuye la velocidad de migración de las células HeLa pero no altera la direccionalidad. Se realizó la herida en una monocapa de células HeLa, se arrestartaron con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL. Se tomaron imágenes del frente de avance celular, cada 15 minutos, por 24 horas. A) Imágenes en contraste de fase del frente de avance celular a las 0 y 24 horas de tratamiento. La línea punteada blanca indica el margen de la herida en el tiempo 0. Se indica la trayectoria del núcleo durante 24 horas en las células controles (negro) y tratadas con 20 μM DhL (gris). Barra 50 μm . B) Velocidad de migración celular en 24 horas de tratamiento. C) Representación de la trayectoria de las células tratadas con 0 y 20 μM DhL, durante 24 horas. Los lugares de origen se reunieron en un mismo punto para facilitar la visión de la dispersión en la trayectoria. Barra 50 μm . D) Direccionalidad celular (distancia de migración neta por distancia de migración total) durante 24 horas de tratamiento. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$, $n = 7$

Muchos compuestos que inhiben la migración alteran a su vez la morfología de la célula, y en varios casos la disminución de la velocidad de migración se asocia a un problema en la polarización y el desarrollo del frente celular. Con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual DhL inhibe la migración, a continuación analizamos el efecto de este compuesto en la morfología celular.

Morfología

Para investigar el efecto de DhL en la morfología celular, utilizamos la técnica de video microscopía y el análisis computacional de las imágenes con el programa Image J. Así, examinamos los parámetros morfológicos de las células HeLa durante 24 horas de migración.

Se realizó una herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Las imágenes se tomaron a tiempo 0, 6, 12, 18 y 24 horas. Luego, en las imágenes obtenidas se dibujó el contorno celular manualmente y mediante el programa se determinó el casco convexo celular. Posteriormente, se calcularon los parámetros que describen la morfología celular que incluyen área, longitud, ancho, factor forma $[(4\pi \times \text{área celular})/(\text{perímetro}^2)]$, índice de bipolaridad $[\text{longitud celular}/\text{ancho celular}]$, índice de procesos $[\text{número de dominio creados por sustracción del área celular al área del casco convexo}]$ e índice de expansión $[\pi(\text{longitud del casco convexo})^2/4(\text{área del casco convexo})]$. El área celular, índice de bipolaridad y factor forma pueden ser obtenidos directamente a partir del contorno de las células, mientras que el índice de procesos y el índice de expansión (el cual refleja la extensión de los procesos celulares), derivan del casco convexo [138], [139].

Como muestra la **Figura 31-A**, ocurrieron cambios pronunciados en la morfología de las células HeLa desde las 0 hasta las 24 horas de migración. A medida que transcurrió el tiempo, las células controles aumentaron de tamaño y desarrollaron un frente celular con una superficie amplia. En cambio, las células tratadas con DhL tendieron a ser más pequeñas, se hicieron filiformes, desarrollaron más procesos y el frente celular tenía una superficie reducida. Específicamente, a las 24 horas de tratamiento, el área celular fue de 3.218 μm^2 en las células controles y de 2.097 μm^2 en las células tratadas con DhL. El factor

forma, el cual es una medida de la redondez celular, fue de 0,66 en células controles y 0,43 en células tratadas con DhL. El índice de bipolaridad, que indica el grado de elongación celular, fue de 2,28 en células controles y 4,25 en células tratadas con DhL. El índice de expansión, que denota la extensión de los procesos celulares, fue de 1,78 en células controles y 2,70 en células tratadas con DhL. El índice de procesos, que se relaciona con la cantidad de procesos celulares, fue de 1,61 en células controles y 4,82 en células tratadas con DhL. Por lo tanto, el tratamiento con DhL produjo una disminución del 40% tanto del área celular como del factor forma. En contraste, DhL produjo un aumento del 100% en el índice de bipolaridad, del 51% en el índice de expansión y del 200% en el índice de procesos (Figura 31-B). Esto significa que las células HeLa tratadas con 20 μ M DhL, sufrieron una disminución de tamaño, pero alcanzaron un alto grado de elongación y además, aumentaron el número y extensión de los procesos celulares.

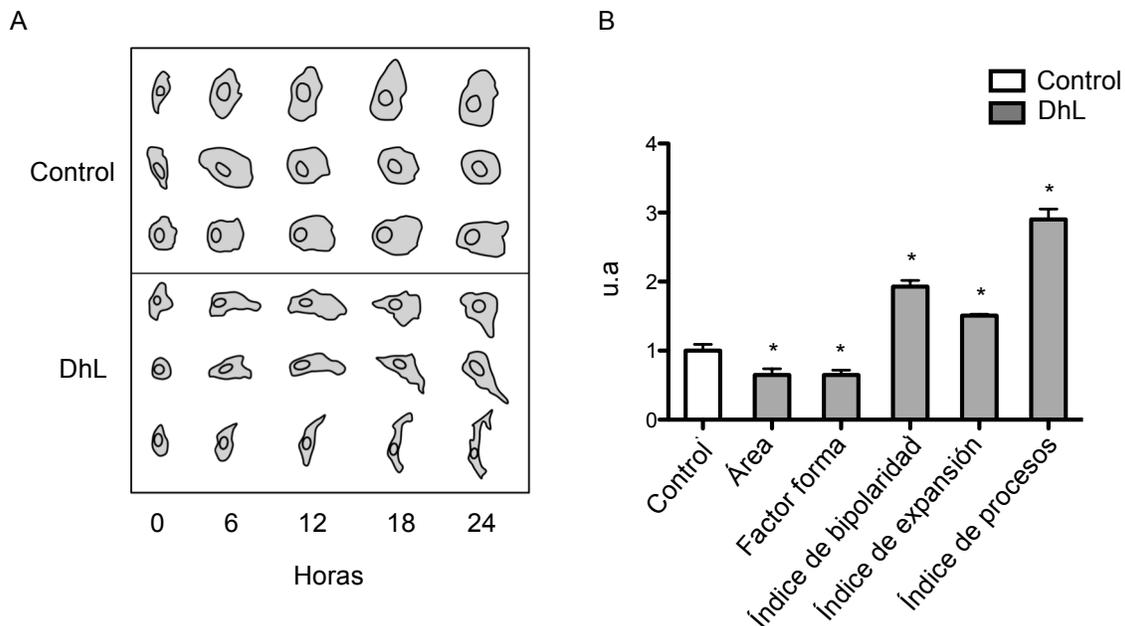


Figura 31. Efecto de DhL en la morfología celular. Se realizó la herida en la monocapa de células HeLa, se arretaron con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL. Luego, se tomaron imágenes de las células ubicadas en el margen de la herida a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Con el programa Image J se analizó el área total, el factor forma, el índice de bipolaridad, el índice de expansión y el índice de procesos. A) Contorno de las células HeLa durante 24 horas de tratamiento. B) Parámetros morfológicos de las células HeLa a las 24 horas de tratamiento. Para facilitar la comparación se estableció cada parámetro morfológico del control con valor 1. Valor medio \pm SEM. * Diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=7$

Las células responden a un estímulo migratorio adoptando una morfología polarizada, con su frente celular orientado en la dirección del estímulo. La extensión del frente celular es lo que inicia la migración y establece la dirección del movimiento. Las células con una débil polaridad pierden la habilidad de avanzar en una única dirección, lo que resulta en una trayectoria aleatoria y se reduce la velocidad de migración.

Para determinar si DhL afecta la formación del frente celular, medimos a tiempo 0, 6, 12, 18 y 24 horas, las dimensiones (área y ancho) del frente de las células HeLa tratadas con 0 y 20 μM DhL. En las células que se encontraban migrando para cerrar la herida, establecimos como "frente celular", al área que se proyecta desde el núcleo hasta el margen anterior de la célula.

Como muestra la **Figura 32-A**, el tratamiento con DhL produjo una disminución del área y ancho del frente de las células HeLa. En las células controles el área del frente celular fue de 2.035, 2.265, 2.389 y 2.437 μm^2 a las 6, 12, 18 y 24 horas, respectivamente. En cambio, en las células tratadas con DhL el área del frente celular fue de 1.040, 759, 1.244 y 917 μm^2 a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento, respectivamente. En cuanto al ancho del frente celular, en las células control fue de 32, 39, 41 y 42 μm a las 6, 12, 18 y 24 horas, respectivamente. En cambio, en las células tratadas con DhL el ancho del frente celular fue de 15, 19, 17 y 17 μm a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento, respectivamente (**Figura 32 B**). Por lo tanto, con este resultado demostramos que a partir de las 12 horas de tratamiento con DhL, se ve afectado el desarrollo del frente celular y este presenta dimensiones más pequeñas que el de las células controles.

En conclusión, el tratamiento con DhL en las células HeLa, produjo significativas alteraciones en la morfología global de la célula y en el desarrollo del frente celular. Esto sugiere que los cambios observados en la motilidad celular por el tratamiento con DhL, podrían ser el resultado de una alteración en la dinámica y organización del citoesqueleto.

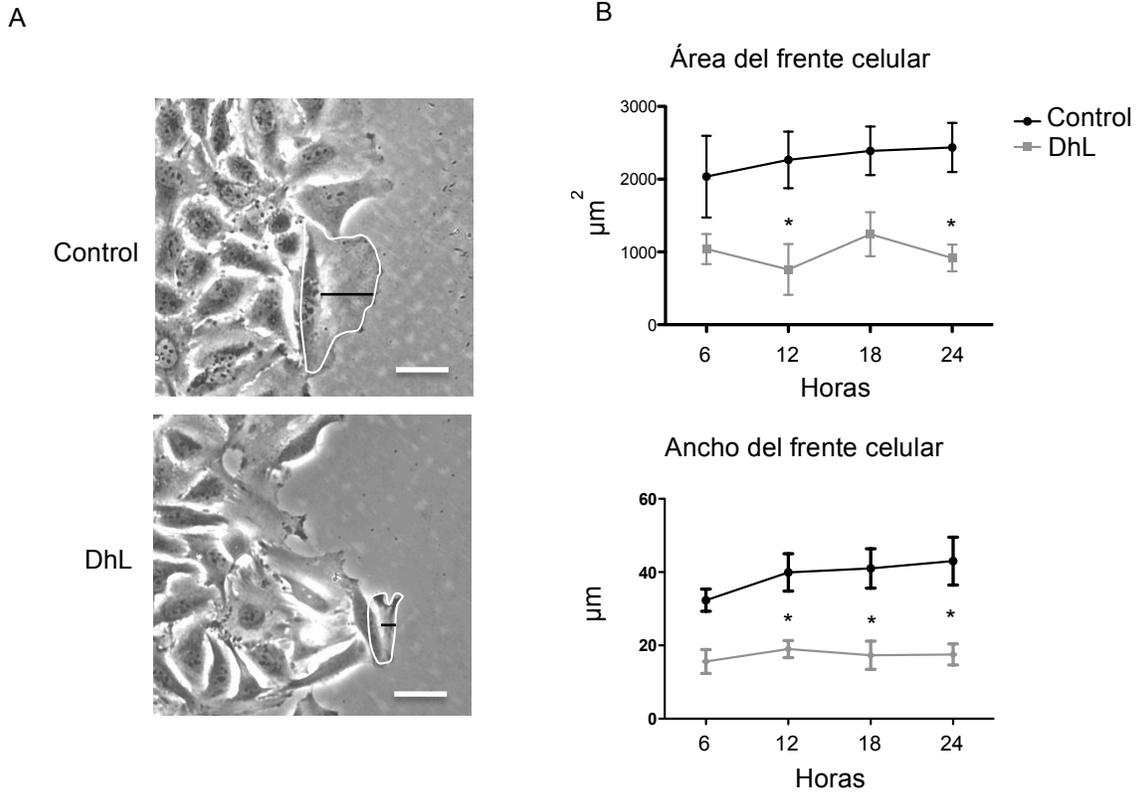


Figura 32. Efecto de DhL en la formación del frente celular. Se realizó la herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL, y se tomaron imágenes de las células ubicadas en el margen de la herida a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Con el programa Image J se analizó las dimensiones del frente celular. A) Imágenes en contraste de fase de las células HeLa a las 24 horas de tratamiento. El trazado blanco indica el área y la línea negra indica el ancho del frente celular. Barra 50 μm . B) Área y ancho del frente de las células HeLa durante las 24 horas del tratamiento. Valor medio \pm SEM. * Diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=7$

Como DhL afecta la morfología celular, la cual está íntimamente relacionada con el citoesqueleto de la célula, nos preguntamos si DhL altera la estructura de los microtúbulos. Por eso, a continuación analizamos la distribución celular de estos mediante inmunofluorescencia.

Distribución de los microtúbulos

Para investigar el efecto de DhL en los microtúbulos, se realizó una herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se las trató con 0 ó 20 μM DhL por 6 y 24

horas. Luego, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo primario anti-alfa-tubulina. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti IgG-ratón-Cy3 y las células fueron observadas con un microscopio confocal.

La observación de los microtúbulos por inmunofluorescencia, a las 6 y 24 horas de tratamiento, evidenció que en la mayoría de las células controles estos irradiaban desde la región perinuclear hacia la periferia celular, lo que denominamos “distribución radial”. En cambio, en las células tratadas con DhL una gran proporción de células mostraron una distribución diferente a la de las células controles, a la que llamamos “distribución alterada” (**Figura 33 A**). A las 6 horas de tratamiento, el 91% de las células controles presentaron distribución radial de los microtúbulos. En cambio, en las células tratadas con DhL el número de células con distribución radial de microtúbulos disminuyó a 49% y se observaron un 51% de células con distribución alterada, con zonas ausentes de microtúbulos en el frente celular y agrupados en las protrusiones de la membrana. A las 24 horas de tratamiento, en el 87% de las células controles los microtúbulos se presentaban con distribución radial. En cambio, en las células tratadas con DhL, solo el 38% mostraron microtúbulos con distribución radial (**Figura 33 B**).

Los microtúbulos son importantes para el establecimiento de la polaridad, la extensión y migración de las células. En este resultado demostramos que DhL produce en las células HeLa una perturbación significativa en la organización de los microtúbulos.

Debido a que las células tratadas con DhL desarrollan un frente celular de reducidas dimensiones, nos preguntamos si el tratamiento con este compuesto afecta la polimerización de los filamentos de actina. Para determinar esto, analizamos en las células HeLa, el efecto de DhL en la proporción de monómeros, filamentos cortos y filamentos largos de actina.

Polimerización de actina

Para investigar si el tratamiento con DhL afecta la polimerización de los filamentos de actina, a partir de lisados celulares separamos los monómeros, filamentos cortos y

filamentos largos de actina mediante una técnica de centrifugación a alta velocidad. Luego, en las fracciones obtenidas, analizamos el contenido de actina mediante Western blot.

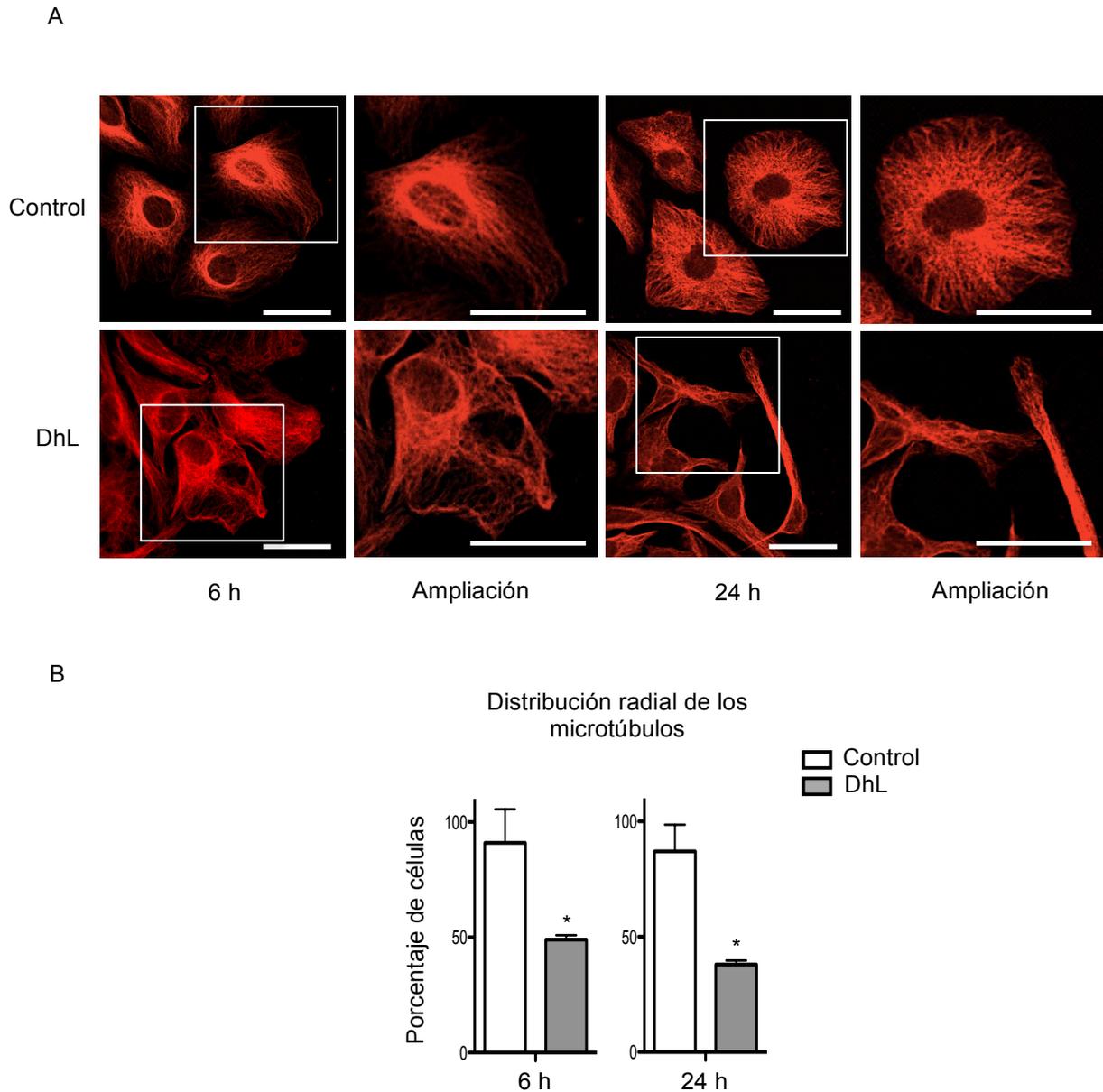


Figura 33. DhL modifica la distribución de los microtúbulos en las células HeLa.

Se realizó la herida en las células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL por 6 y 24 horas. A) Las células fueron fijadas, permeabilizadas y se tiñeron los microtúbulos con el anticuerpo anti-alfa-tubulina. Como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG-ratón-Cy3. El recuadro blanco indica el área ampliada. Barra 50 μ m. B) Porcentaje de células tratadas con 0 y 20 μ M DhL por 6 y 24 horas, con microtubulos en distribución radial. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$.

Las células HeLa arrestadas con HU fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células aún adheridas a la placa de cultivo fueron lisadas con tritón X-100. Así, fueron separados los monómeros y filamentos cortos, de los filamentos largos de actina que luego de la lisis celular quedaron adheridos a la placa de cultivo. El lisado celular fue posteriormente fraccionado en monómeros de actina (fracción 1) y filamentos cortos de actina (fracción 2) mediante centrifugación a alta velocidad (100.000g), y los filamentos largos de actina todavía adheridos a la placa, fueron recuperados por disolución en un buffer con urea (fracción 3). Con las tres fracciones obtenidas se realizó el SDS-PAGE y la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-beta-actina y un anticuerpo secundario apropiado, para estimar la proporción de actina involucrada en los monómeros, filamentos cortos y filamentos largos de actina existentes en las células.

El revelado del Western blot incubado con el anticuerpo específico para beta-actina, demostró la presencia de una banda a la altura de 40 kDa en cada fracción del citoesqueleto. Claramente, observamos que el tratamiento con DhL produjo mayor proporción de actina en la fracción de monómeros, pero menor proporción en forma de filamentos largos. En cambio, el contenido de actina en la fracción de filamentos cortos no fue modificado por el tratamiento con DhL (**Figura 34 A**). La cuantificación de la densidad óptica de las bandas pertenecientes a cada fracción, evidenció que en las células controles, las tres fracciones de actina, monómeros, filamentos cortos y filamentos largos, representaban respectivamente el 6%, 43% y 51%. En cambio, en las células tratadas con DhL aumentó la fracción de monómeros de actina a 15%, la proporción de filamentos cortos se mantuvo en valores similares al control (46%), y los filamentos largos de actina disminuyeron a 38% (**Figura 34 B**). Este resultado nos sugiere que DhL afecta la formación de los filamentos largos de actina.

Dado que DhL afecta la polimerización de los filamentos largos de actina y estos son necesarios para el desarrollo del frente de avance celular, a continuación examinamos por inmunofluorescencia el efecto de DhL en la distribución de los filamentos de actina.

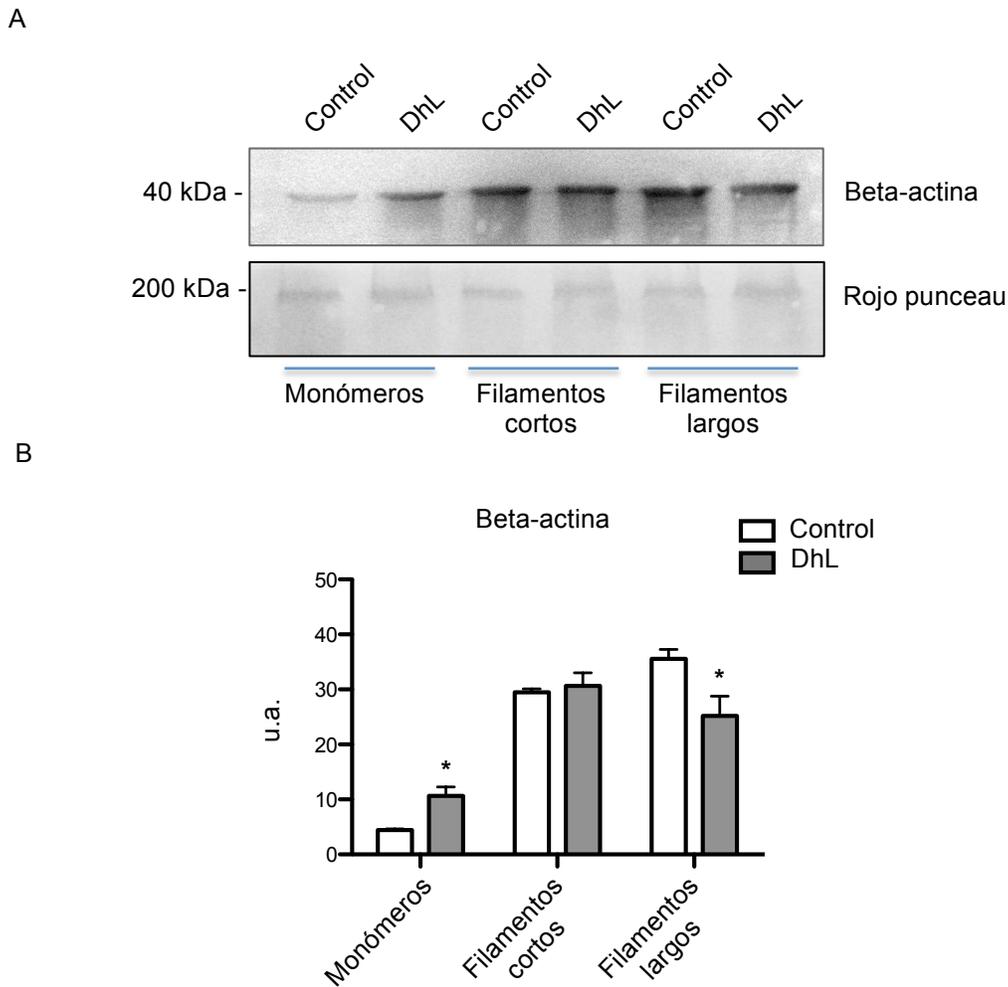


Figura 34. DhL afecta la formación de los filamentos largos de actina. Las células HeLa arrestadas con HU fueron tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, mediante centrifugación se obtuvieron las fracciones de los monómeros, filamentos cortos y filamentos largos de actina y con iguales volúmenes de estas se realizó el Western blot para determinar los niveles de beta-actina. A) imágenes del revelado del Western blot con el anticuerpo específico para beta-actina y la tinción de la membrana con rojo punceau. B) Niveles de beta-actina en las tres fracciones obtenidas por centrifugación. Media \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$.

Organización del citoesqueleto de actina

Algunas moléculas pequeñas que se unen a la actina son muy útiles para visualizar el citoesqueleto de actina en la célula. Estas moléculas incluyen compuestos estabilizadores de actina-F como la faloidina. En efecto, la faloidina, representa una herramienta importante para la observación de actina-F en células fijadas y es la técnica que utilizamos en este

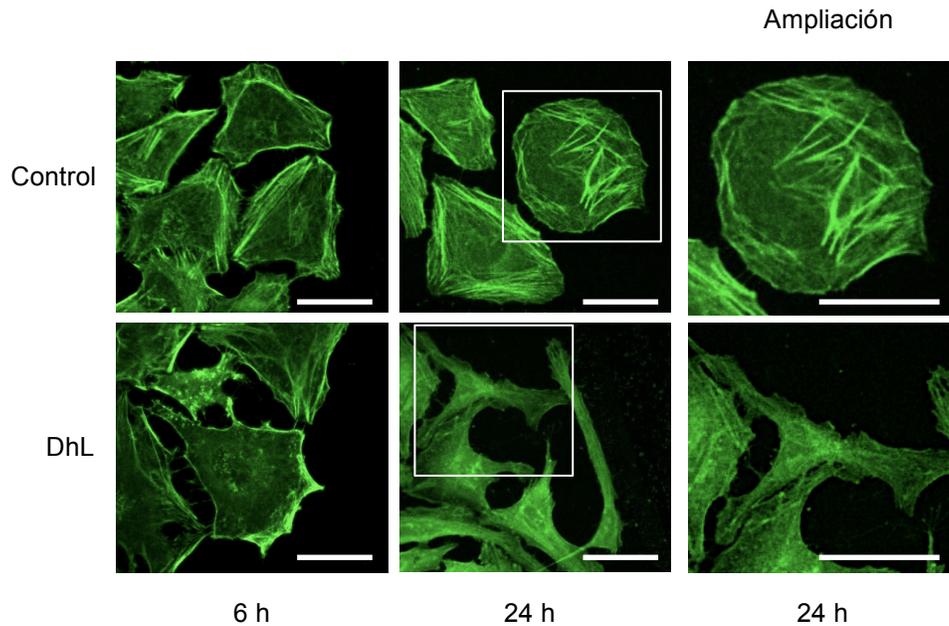
trabajo para evaluar el efecto de DhL en la formación de la red de actina durante la migración celular.

Para el análisis del citoesqueleto de actina mediante microscopia de fluorescencia, se realizó una herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL por 6 y 24 horas. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas y permeabilizadas, y se incubaron con faloidina-FITC a 4°C por 18 horas. Seguido de la incubación y los pasos de lavado, los preparados fueron analizados en un microscopio confocal.

El examen de los filamentos de actina mediante inmunofluorescencia reveló que en las células controles, a las 6 y 24 horas de tratamiento, la mayoría de las células presentaron filamentos de actina en la periferia celular. En cambio, en el tratamiento con DhL en una gran proporción de células no se observaron filamentos de actina. En las células tratadas con DhL por 6 horas, no se observó la típica red de filamentos de actina que presentaban las células controles, en cambio, estos se encontraron intensamente empaquetados en áreas donde normalmente ocurre una rápida polimerización de actina, como son las nuevas protrusiones de la membrana. En las células tratadas con DhL por 24 horas, tampoco se observó la red de filamentos de actina en la periferia celular, en cambio, se formaron pequeños agregados puntuales a través de todo el citoplasma. Los agregados producían una señal difusa en el citoplasma, lo que sugería la formación de filamentos cortos de actina (**Figura 35 A**). La cuantificación del número de células según la distribución de los filamentos de actina reveló que el 87% y 77% de las células controles mostraban una red de filamentos de actina en la periferia celular, a las 6 y 24 horas de tratamiento, respectivamente. En cambio, en las células tratadas con DhL por 6 horas, el número de células con una red de filamentos de actina disminuyó a 42% y a las 24 horas de tratamiento a 33%. (**Figura 35 B**).

Por lo tanto, advertimos que DhL tiene un dramático efecto en la organización del citoesqueleto de actina, sobre todo a las 24 horas de tratamiento, que resulta en la desaparición de la red de actina y en la formación de agregados citoplasmáticos.

A



B

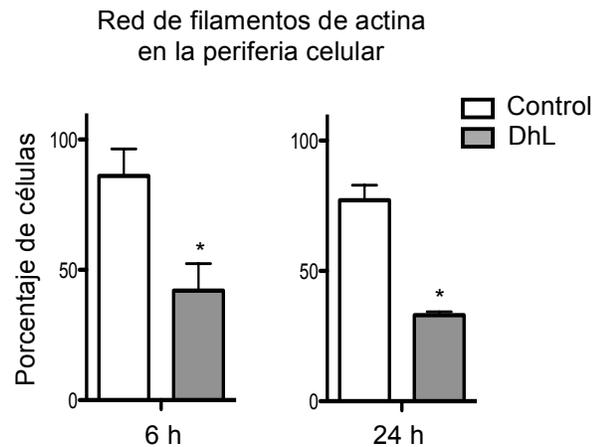


Figura 35. DhL altera el citoesqueleto de actina en las células HeLa. Se realizó la herida en células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL por 6 y 24 horas. A) Las células fueron fijadas y permeabilizadas, y se tiñeron los filamentos de actina con faloidina-FITC. El recuadro blanco indica el área ampliada. Barra 50 μm . B) Porcentaje de células tratadas con 0 y 20 μM DhL por 6 y 24 horas, que presentan una red de filamentos de actina en la periferia celular. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$.

La función del citoesqueleto de actina es fundamental para la protrusión de la membrana durante la migración celular. Debido a que DhL afecta la formación de los filamentos de actina, nos preguntamos si esto se refleja en la dinámica del frente de avance

celular. Para averiguar esto, analizamos mediante video microscopía y la técnica de kimografía, la protrusión de la membrana y la formación de *ruffles*.

Actividad del frente de avance

La kimografía, es una técnica que permite estudiar los movimientos subcelulares en regiones definidas, en el orden de segundos. Generalmente, puede ser aplicada para cualquier tipo de secuencia de imágenes de células en cultivo. Esta técnica es muy adecuada para cuantificar la protrusión de los lamelipodios y la formación de *ruffles*.

Para estudiar el efecto de DhL en la dinámica del frente de avance celular, realizamos el ensayo de la herida y lo grabamos mediante video microscopía. En la secuencia de imágenes obtenidas, se utilizó la kimografía para estudiar la dinámica del perímetro celular.

Se realizó la herida en una monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL por 6 horas. Los lamelipodios (protrusiones anchas y planas del frente de avance celular) fueron identificados con el microscopio óptico de contraste de fase y en éstos se tomaron imágenes cada 3 segundos, por 15 minutos, con objetivo 20x.

El procesamiento de las imágenes producidas se realizó con el programa Image J. Con el objetivo de monitorear la dinámica del frente de avance celular, en la secuencia de imágenes se marcó una región de interés en forma de línea. Esta línea se extendía desde el cuerpo celular y cruzaba transversalmente la lamela hasta una zona fuera de la célula (**Figura 36 A**). Las estructuras morfológicas presentes en la región de interés correspondían a píxeles con valores de grises. Así, quedaron incluidos distintos valores de grises de las estructuras visibles en contraste de fase. Luego, mediante el proceso de digitalización se obtuvo una foto con un ancho de 1 píxel de la región celular incluida y el ordenamiento de esta en una secuencia a través del tiempo produjo una imagen que correspondía a la kimografía (**Figura 36 A**).

En la kimografía, los *ruffles* se observaron con apariencia oscura, de movimiento centrípeto, que comenzaba en el límite de la célula y se introducía hacia la lamela. Por otro lado, el margen de la célula se visualizó como una línea ondulante a través del tiempo. Esta línea ondulante correspondía a la protrusión y retracción del lamelipodio. El comienzo de la protrusión fue marcado donde el margen celular empezaba a crecer. En correspondencia, la

finalización de la protrusión fue localizada en el punto donde el margen celular comenzaba a declinar (**Figura 36 A**).

Para cuantificar la dinámica del frente de avance, la kimografía fue aplicada en cuatro regiones de interés por célula. En ellas, identificamos la protrusión del lamelipodio y la formación de *ruffles* y se calculó la frecuencia de protrusión de los lamelipodios (protrusiones por hora), la frecuencia de formación de *ruffles* (número de *ruffles* por hora) y la vida media de los *ruffles* (tiempo entre su aparición y desaparición).

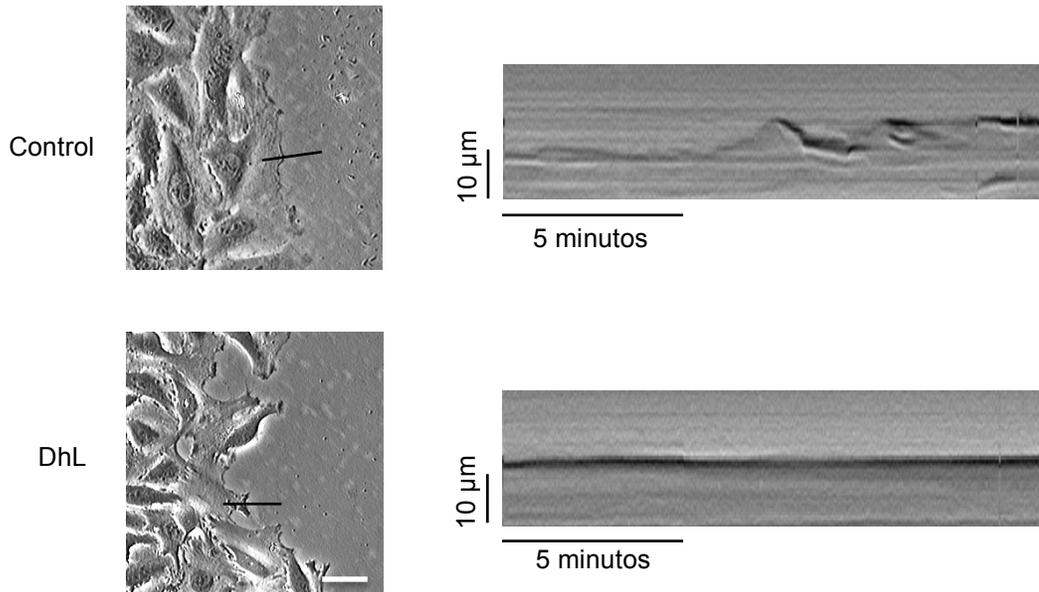
En la kimografía de las células controles, observamos un frente de avance dinámico con frecuentes protrusiones de la membrana y la formación de varios *ruffles*. En cambio, la kimografía de las células tratadas con DhL reveló un frente de avance enlentecido, sin importantes protrusiones de la membrana, formación de pocos *ruffles* y estos se presentaban con mayor duración (**Figura 36 A**). La cuantificación de estas estructuras demostró que en las células controles se produjeron 21 protrusiones/hora y en las células tratadas con DhL 6 protrusiones/hora. En cuanto a los *ruffles*, en las células controles la frecuencia de formación de *ruffles* fue de 21 *ruffles*/hora y en las células tratadas con DhL de 8 *ruffles*/hora. Con respecto a la vida media de los *ruffles*, esta fue de 1,5 minutos en las células controles y de 7,4 minutos en las células tratadas con DhL (**Figura 36 B**).

Por lo tanto, el tratamiento con DhL produjo cambios característicos y significativos en la dinámica del frente de avance de las células HeLa. Luego del tratamiento con DhL, la frecuencia de protrusión de los lamelipodios y la frecuencia de formación de *ruffles* disminuyó, mientras que la vida media de los *ruffles* aumentó. De esta manera, concluimos que DhL afecta la dinámica del frente de avance celular.

De forma complementaria, para estudiar con mayor detalle la formación de los *ruffles*, las células fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido.

Se realizó la herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μM DhL por 6 y 24 horas. Luego, las células se fijaron y deshidrataron, se realizó el punto crítico de secado y metalizado. Posteriormente, se observaron en un microscopio electrónico de barrido.

A



B

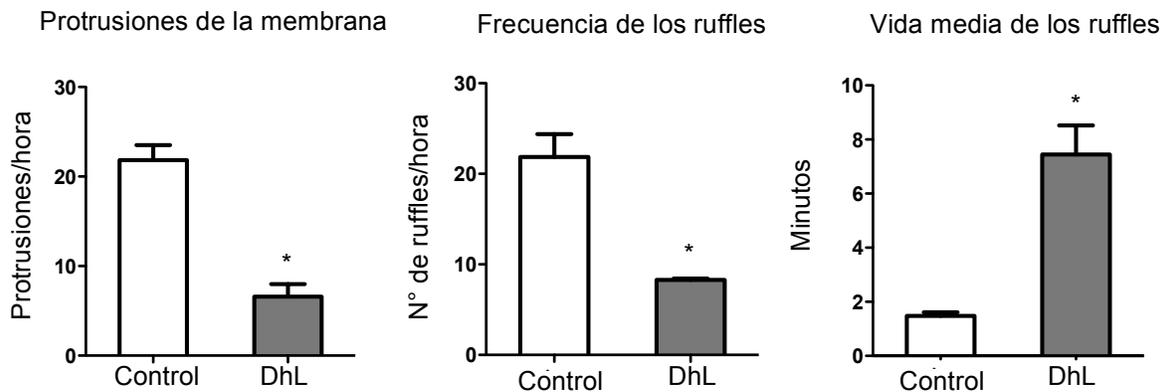


Figura 36. DhL altera la dinámica del frente de avance de las células HeLa. Se realizó la herida en una monocapa de células HeLa, se arretaron con HU y se trataron con 0 ó 20 µM DhL. A las 6 horas, se tomaron imágenes del margen de la herida, cada 3 segundos, durante 15 minutos. A) Imágenes en contraste de fase y kimografía del frente de avance de las células HeLa, a las 6 horas de tratamiento con 0 y 20 µM DhL. La línea negra indica donde se realizó la kimografía. Barra 50 µm. B) Protrusiones de la membrana por hora, frecuencia de *ruffles* y vida media de los *ruffles*, a las 6 horas de tratamiento con 0 y 20 µM DhL. Valor medio ± SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=5$

La observación de las células controles, tanto a las 6 como a las 24 horas de tratamiento, demostró que en el frente de avance la membrana se encuentra plana y

adherida al sustrato. En las células tratadas con DhL por 6 horas, el frente de avance presentó características similares al de las células controles. En cambio, en las células tratadas con DhL por 24 horas, se evidenció claramente en la superficie de las protrusiones de la membrana, la formación de estructuras anulares semejantes a *ruffles* circulares (Figura 37).

Por lo tanto, concluimos que DhL induce la formación de *ruffles* circulares a las 24 horas de tratamiento.

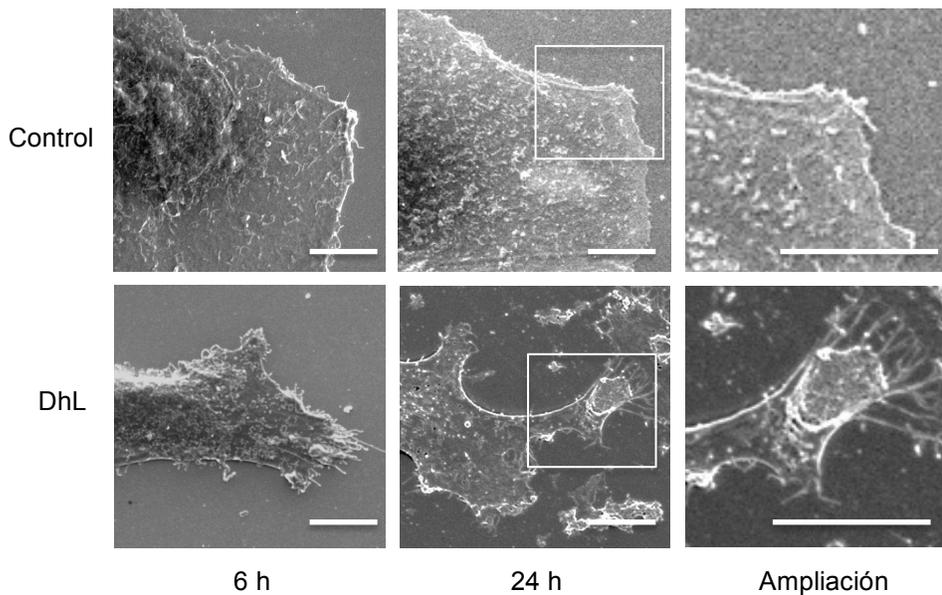


Figura 37. DhL induce la formación de *ruffles* circulares a las 24 horas de tratamiento. Se realizó la herida en las células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL por 6 y 24 horas. A) Las células fueron fijadas, deshidratadas, y se les realizó punto crítico y metalizado para ser observadas con un microscopio electrónico de barrido. Barra 10 μ m.

Debido a que DhL altera la formación del frente de avance celular y como la proteína Rac1 estimula la polimerización de actina y la formación de los lamelipodios, nos preguntamos si el tratamiento con este compuesto afecta la distribución celular de Rac1 y su activación. Para contestar esta pregunta realizamos en las células HeLa inmunofluorescencia y *pull down*.

Distribución de Rac1

Con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual DhL afecta la protrusión de la membrana plasmática, estudiamos mediante inmunofluorescencia la distribución de Rac1 en el frente de avance celular.

Se realizó una herida en la monocapa de células HeLa arrestadas con HU y se las trató con 0 ó 20 μ M DhL por 6 y 24 horas. Luego, las células fueron fijadas, permeabilizadas y se realizó la tinción de Rac1 con el anticuerpo primario anti-Rac1. Como anticuerpo secundario se utilizó el anti IgG-ratón-Cy3 y los preparados se analizaron en un microscopio confocal.

La observación de Rac1 por inmunofluorescencia demostró que en las células controles, a las 6 y 24 horas de tratamiento, esta proteína se encuentra dispersa en el citoplasma y ligeramente concentrada en las protrusiones de la membrana del frente de avance celular. En las células tratadas con DhL por 6 horas, Rac1 se observa en mayor concentración en las protrusiones de la membrana comparado con las células controles. Por otro lado, las células tratadas con DhL por 24 horas mostraron acumulación de Rac1 en forma anular (**Figura 38 A**). La cuantificación demostró que en las células controles solo el 13 y 10% presentaban acumulación de Rac1 en las protrusiones de la membrana a las 6 y 24 horas de tratamiento, respectivamente. En cambio, en las células tratadas con DhL por 6 y 24 horas, el 42 y 60%, respectivamente, mostraron una importante acumulación de Rac1 en las protrusiones de la membrana (**Figura 38 B**).

Por lo tanto, concluimos que DhL afecta la distribución de Rac1 en la célula produciendo su acumulación en las protrusiones de la membrana.

Activación de Rac1

Rac1 es una Rho GTPasa que cicla entre el estado activo unido a GTP y el estado inactivo unido a GDP. Rac1-GTP actúa sobre proteínas efectoras que estimulan la polimerización de actina en una red que da lugar al desarrollo del lamelipodio.

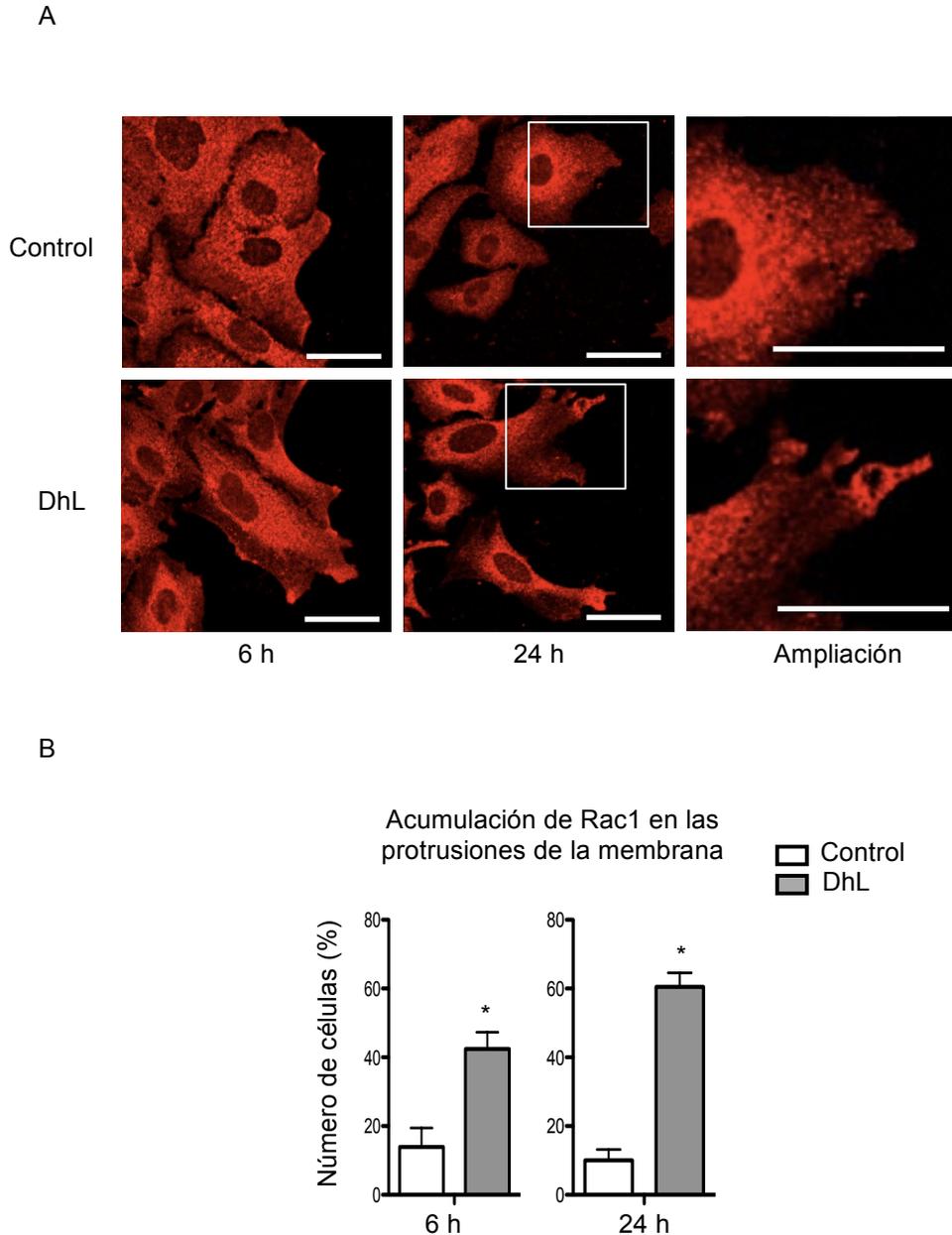


Figura 38. DhL modifica la distribución de Rac1 en las protrusiones de la membrana en las células HeLa. Se realizó la herida en las células HeLa arrestadas con HU y se trataron con 0 ó 20 μ M DhL por 6 y 24 horas. A) Las células fueron fijadas, permeabilizadas y se tiñó la proteína Rac1 con el anticuerpo específico. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón-Cy3. El recuadro blanco indica el área ampliada. Barra 50 μ m. B) Porcentaje de células tratadas con 0 y 20 μ M DhL por 6 y 24 horas, con acumulación de la proteína Rac1 en las protrusiones de la membrana. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=3$.

El *pull down* es una herramienta que nos permite separar Rac1 unida a GTP a partir de los lisados celulares. Luego, mediante Western blot podemos medir la concentración de

esta proteína y de esa manera estimar los niveles de activación de Rac1.

Para realizar el *pull down*, utilizamos partículas de agarosa adheridas a la proteína de fusión GST con el dominio de unión PBD. El dominio GST-PBD tiene la capacidad de unirse a Rac1 cuando esta se encuentra unida a GTP.

Para realizar esta técnica, las células HeLa fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 6 y 24 horas. Luego, las células fueron tratadas con un buffer de lisis. Una pequeña cantidad del lisado celular fue guardado para medir Rac1 total (fracción 1) y el resto fue incubado con las partículas de agarosa-GST-PBD. Posteriormente, las partículas fueron centrifugadas quedando en el sobrenadante Rac1 unido a GDP, y en el precipitado las partículas unidas a Rac1-GTP (Fracción 2). Finalmente, se realizó el Western blot con la fracción 1 y 2. Para el revelado del Western blot se utilizó el anticuerpo primario anti-Rac1 y el anticuerpo secundario acoplado a HRP.

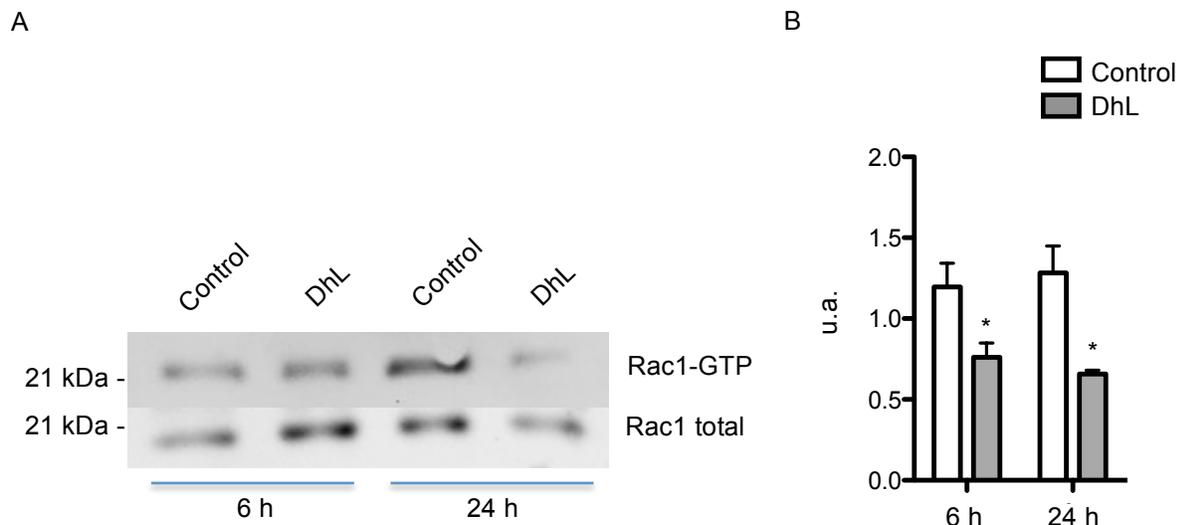


Figura 39. DhL disminuye la activación de Rac1 en las células HeLa. Las células HeLa fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 6 y 24 horas. Luego, las células fueron lisadas y el Rac1-GTP presente en los lisados celulares fue aislado mediante el ensayo de *pull down*, utilizando partículas de agarosa unidas a GST-PBD. El Rac1 total y unido a GTP fue detectado por Western blot. A) Niveles de Rac1-GTP y Rac1 total en las células HeLa tratadas con 0 y 20 μM DhL por 6 y 24 horas. B) Cuantificación de la relación Rac1-GTP/Rac1 total. Valor medio \pm SEM, * diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$ $n=2$

El revelado del Western blot, perteneciente al *pull down* de Rac1-GTP y al lisado total, mostró las bandas de Rac1 a la altura de 21 kDa, correspondientes a Rac1-GTP y Rac1

total respectivamente. En este, observamos que DhL produjo una disminución de los niveles de Rac1-GTP tanto a las 6, como a las 24 horas de tratamiento (**Figura 39 A**). La medición de la densidad óptica de las bandas y la determinación de la relación entre Rac1-GTP y Rac1 total reveló que el tratamiento con DhL produjo una disminución de los niveles de Rac1-GTP de 37% a las 6 horas y de 50% a las 24 horas (**Figura 39 B**). Por lo tanto, consideramos que DhL afecta la activación de Rac1 debido a que con el tratamiento disminuyen significativamente los niveles de Rac1 unido a GTP.

Conclusión

En esta sección hemos analizado el efecto de DhL en la motilidad y morfología celular, y en las proteínas que regulan el citoesqueleto.

La migración celular fue evaluada mediante dos técnicas: el ensayo de la herida y el ensayo de migración *transwell*. El ensayo de la herida se caracteriza porque se produce un estímulo físico de la migración, debido a la pérdida del contacto célula-célula al realizar la herida. En cambio, en el ensayo *transwell* el estímulo migratorio es quimiotáctico, donde las células son atraídas hacia la cámara inferior mediante el SFB. Estos ensayos fueron realizados en células HeLa, B16-F0 y B16-F10 con concentraciones de hasta 20 μM DhL. En el ensayo de la herida, 20 μM DhL produjo una inhibición comparable a la producida por CitB, el cual afecta la polimerización de los filamentos de actina e inhibe la migración celular. Específicamente, 20 μM DhL redujo la migración un 42%, 25% y 46% en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10, respectivamente. En el ensayo de migración *transwell* el efecto inhibitorio de DhL fue más marcado y 20 μM DhL inhibió la migración un 63%, 71% y 43% en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10, respectivamente. En base a estos resultados, consideramos que DhL efectivamente inhibe la migración de las tres líneas celulares.

Luego, para determinar el mecanismo por el cual DhL inhibe la migración, estudiamos la velocidad y direccionalidad celular. Para esto, realizamos la herida como estímulo migratorio y utilizamos las técnicas de video-microscopía y rastreo celular. Como resultado del rastreo de las células HeLa durante 24 horas de tratamiento, DhL no mostró alteraciones en la direccionalidad, pero si disminuyó significativamente un 49% y 53% la velocidad de migración, a las 6 y 12 horas de tratamiento, respectivamente. Por lo tanto,

concluimos que DhL reduce la velocidad de migración en las células HeLa.

Luego, observamos que DhL altera la morfología de las células HeLa. Debido al tratamiento, las células disminuían de tamaño, se alargaban, emitían procesos y se reducían las dimensiones del frente celular. Como la morfología de la célula depende de la organización de los microtúbulos y del citoesqueleto de actina, estudiamos el efecto de DhL en la formación de estas estructuras. El análisis de los microtúbulos por inmunofluorescencia demostró que el tratamiento con DhL altera la típica organización radial de los mismos. Las células tratadas con DhL presentaban zonas del frente celular ausentes de microtúbulos y estos se concentraban en las protrusiones de la membrana.

Además, el análisis por inmunofluorescencia de los filamentos de actina evidenció que DhL también afecta al citoesqueleto de actina en las células HeLa. En las células tratadas con DhL observamos la ausencia de la red de filamentos de actina en la periferia celular, sin embargo, se formaron pequeños agregados citoplasmáticos que podrían corresponder a filamentos cortos de actina. Luego, el estudio del fraccionamiento del citoesqueleto de actina en monómeros, filamentos cortos y filamentos largos, mediante centrifugación y Western blot, reveló que DhL aumenta la proporción de monómeros de actina, mientras disminuye la proporción de filamentos largos. En base a esto, consideramos que los cambios profundos que se producen en la morfología de las células tratadas con DhL, podrían deberse a las alteraciones que presentan los microtúbulos y el citoesqueleto de actina y en consecuencia, producirse una migración deficiente.

Posteriormente, evaluamos la dinámica del frente de avance celular por video-microscopia. Con la técnica de kimografía, analizamos el efecto de DhL en la protrusión de la membrana, la formación de *ruffles* y la vida media de estos últimos. Así, descubrimos que DhL produce un enlentecimiento en la dinámica del frente de avance de las células HeLa. En estas, identificamos que DhL produce inhibición de la protrusión de la membrana, disminución en la frecuencia de los *ruffles* y aumento de la vida media de los *ruffles*. Luego, para analizar con más detalles la formación de los *ruffles*, observamos mediante microscopia electrónica de barrido, el efecto de DhL en el frente de avance de las células HeLa. Así, descubrimos que a las 24 horas de tratamiento, en las protrusiones de la membrana se forman estructuras anulares que parecerían corresponder a *ruffles* circulares. Por lo tanto, consideramos que DhL afecta la dinámica y estructura del frente de avance

celular.

Debido a que la polimerización de actina y la protrusión de la membrana son estimulados por la Rho GTPasa Rac1 y sus efectores, a continuación, estudiamos por inmunofluorescencia la distribución celular de Rac1. Así, evidenciamos que en las células tratadas con DhL, se produce la acumulación de Rac1 en las protrusiones de la membrana y a las 24 horas de tratamiento, la acumulación de Rac1 se produce de manera anular, sugiriendo su localización en *ruffles* circulares. Por último, para determinar si DhL afecta la activación de Rac1, realizamos *pull down* para Rac1-GTP y así descubrimos que DhL significativamente reduce la concentración de Rac1 activo.

Rac1 es una proteína clave de la migración celular porque estimula la polimerización de actina y la protrusión de la membrana. Consideramos que la alteración en la morfología, la afección en el citoesqueleto y el enlentecimiento de la dinámica del frente de avance celular, están relacionados con la disminución de la activación de Rac1, que provoca la inhibición de la polimerización de actina y la protrusión de la membrana y en consecuencia, una sustancial inhibición de la migración celular.

DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad donde las células se dividen de forma incontrolada, y son capaces de invadir localmente y a distancia, otros tejidos. Es la segunda causa de muerte en los países del primer mundo, detrás de la enfermedad cardiovascular [39].

En el hombre, el cáncer de próstata es el más frecuente y en la mujer, el de mama. Pero, debido a que en el cáncer de próstata y mama se llega en muchos casos a un tratamiento satisfactorio, es el cáncer de pulmón el que produce mayor número de muertes en ambos sexos. En niños y adolescentes en cambio, la leucemia es el cáncer más común [140].

La metástasis se produce porque las células tumorales se separan del cáncer primario y migran hacia otras partes del cuerpo donde desarrollan nuevos tumores. Debido a su naturaleza sistémica y a la resistencia de las células diseminadas a los agentes terapéuticos, ésta es la mayoría de las veces, una enfermedad incurable que produce el 90% de las muertes en los pacientes con cáncer [141].

El proceso metastásico se produce porque las células tumorales adquieren un fenotipo con características migratorias e invasivas, lo que les permite alcanzar los tejidos distantes. Es importante recalcar que el proceso de metástasis comienza antes de que las células abandonen el tumor primario. Las células son capaces de modificar a distancia el lugar donde se van a instalar, movilizar factores de crecimiento, modificar el estroma celular y la arquitectura de la MEC, y generar lo que se llama el nicho pre-metastásico [142].

Los clásicos tratamientos para el cáncer, es decir, la radioterapia o la quimioterapia, están dirigidos principalmente a células que proliferan rápidamente, mediante la inhibición de la replicación y reparación del ADN, o del ciclo celular. El problema es que muchos de estos tratamientos también afectan a las células normales, por eso las investigaciones actuales están enfocadas en generar tratamientos específicos para atacar a los mecanismos moleculares del cáncer [143].

Específicamente, la migración celular más que la proliferación, distingue al cáncer metastásico de los tumores benignos. Por eso, los tratamientos dirigidos contra la motilidad de las células tumorales podrían eliminar la amenaza de la enfermedad sistémica. El bloqueo de la motilidad celular en un tumor primario es útil para limitar la invasión local y de esta manera, se ataca al proceso metastásico desde sus comienzos. Por ejemplo, en el cáncer pancreático agresivo, se produce infiltrado en los tejidos adyacentes y esto suele ser

incurable incluso en ausencia de metástasis, sobre todo porque la intervención quirúrgica es inefectiva en este caso. Así, la inhibición de la migración celular promete mejorar la terapia de este tipo de dolencias porque previene la infiltración y expansión tumoral. Además, es necesario considerar las terapias dirigidas a vías moleculares que gobiernan las interacciones tumor-estroma (por ejemplo, atacar el proceso de adhesión de las células tumorales a la MEC), y definir la mejor manera de combinar los distintos agentes oncológicos para lograr el máximo beneficio terapéutico. Así, se disminuye la necesidad de recurrir a agresivas terapias citotóxicas que actualmente se utilizan para reducir el riesgo de diseminación metastásica [144].

Debido a la alta tasa de muerte de pacientes con cáncer y los serios efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia, muchos pacientes buscan tratamientos alternativos y/o complementarios [145]. Varios son los productos de plantas medicinales que han demostrado resultados positivos contra diferentes tipos de tumores. Muchos de estos han resultado ser efectivos no solo en ensayos experimentales en el laboratorio sino también en casos clínicos [146].

Las LSs son metabolitos secundarios activos, derivados de una gran variedad de plantas, que se utilizan en la medicina tradicional. En los últimos años, las propiedades anticancerígenas de varias LSs han generado gran interés y numerosos trabajos de investigación se han realizado con el fin de caracterizar los mecanismos moleculares, para su aplicación en la prevención y tratamiento del cáncer. En general, las LSs tienen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y anticancerígena, lo cual las hace muy interesante para la investigación en el desarrollo de nuevos fármacos. Además, han demostrado cierta selectividad para la células tumorales, lo que las hace más interesantes para los tratamientos oncológicos [71].

DhL es una LS aislada de las hojas de la planta medicinal llamada matico, que crece en Argentina. Popularmente se utiliza la infusión de las hojas del matico por sus propiedades citoprotectoras contra la úlcera péptica y en el tratamiento externo de lesiones en la piel. Numerosas publicaciones han demostrado la acción de DhL como antidiarreica, antiinflamatoria, antiparasitaria, antibacteriana, antiproliferativa y antitumoral [86], [57], [61]–[64]. El efecto antiinflamatorio de DhL parece deberse a una interferencia de la señalización del NFκB y la producción de citoquinas [83]. Como antiproliferativo, se ha

observado que DhL produce en G2, un arresto transiente del ciclo celular [98], [89], [99]. Adicionalmente, se le atribuye a DhL un efecto antitumoral porque inhibe la proliferación celular en varias líneas de células tumorales. Trabajos recientes de nuestro laboratorio han demostrado que DhL induce senescencia o apoptosis en las células HeLa, junto a la acumulación de marcadores de daño del ADN [90].

En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto inhibitorio de DhL en el proceso de adhesión, invasión y migración de las células tumorales en cultivo. Con el fin de demostrar que DhL tiene potencial para ser considerada en el desarrollo de tratamientos oncológicos.

Como modelo de estudio utilizamos líneas de células tumorales en cultivo, arrestadas en la fase G1/S del ciclo celular. Las líneas celulares utilizadas fueron HeLa, B16-F0, B16-F10, MDA-MB-231 y MCF-7. La elección de estas células se basó en la continuación de trabajos de investigación ya realizados en nuestro laboratorio, que demuestran el efecto inhibitorio de DhL en la proliferación celular y el crecimiento de melanomas generados en ratones (Tesis de Valeria Costantino, 2013).

A continuación, realizamos una revisión de los resultados obtenidos en respuesta a cada uno de los objetivos planteados en esta tesis. Posteriormente, en base a los antecedentes presentes en el tema y la discusión de los aspectos más interesantes, proponemos un modelo acerca del mecanismo de acción inhibitorio de DhL en la adhesión, invasión y migración de las células tumorales en cultivo.

Efecto de DhL en la viabilidad de las células arrestadas con HU

Para estudiar el efecto de DhL como antimetastásico, utilizamos células arrestadas en el ciclo celular, para evitar los efectos de la proliferación en los ensayos de migración e invasión. Nuestro objetivo fue arrestar a las células en la fase G1/S, debido a que en esta fase las células presentan mayor velocidad de migración y adherencia [105].

Para el arresto de las líneas celulares utilizamos HU. Esta droga inhibe la enzima ribonucleótido reductasa y así, disminuye la fuente de dNDP disponibles para la síntesis de ADN, por lo que las células quedan arrestadas en la fase G1/S [148]. Para determinar la concentración de HU que arresta el ciclo de las células tumorales, nos basamos en la bibliografía, la cual indica que la inhibición de la proliferación en las células HeLa, B16-F0 y

MDA-231 se logra con 2 mM HU [149], [110], [111], y en las células B16-F10 y MCF-7 con 1 mM HU [150]. A pesar de lo reportado, realizamos experimentos para determinar la concentración de HU que es efectiva para inhibir la proliferación, sin causar efectos en la viabilidad de las células. Esto fue realizado mediante recuento directo y tinción con azul tripán. Como resultado, los ensayos demostraron que 2 mM HU (en las células HeLa, B16-F0 y MDA-231) y 1 mM (en las células B16-F10 y MCF-7) efectivamente inhibe la proliferación de las líneas celulares, manteniendo la viabilidad de las mismas. Además, comprobamos por citometría de flujo que HU arresta a las células HeLa en la fase G1/S.

Una vez establecida la concentración de HU para el arresto de las cinco líneas celulares, analizamos el efecto de DhL en la viabilidad celular. El tratamiento con 20 μ M DhL por 24 horas, mantuvo las células viables en las cinco líneas celulares. También, corroboramos por citometría de flujo, que DhL no modifica el arresto del ciclo celular inducido por HU, manteniendo a las células HeLa en la fase G1/S.

Como la determinación de la viabilidad celular con el colorante azul tripán podría no ser sensible para las células que se encuentran en etapas tempranas de apoptosis, realizamos la tinción con anexina V. Así, verificamos que el tratamiento con 20 μ M DhL en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU, no produce apoptosis.

En un trabajo previo de este laboratorio, observamos que en células HeLa en proliferación, 20 μ M DhL produce senescencia prematura [90]. La senescencia es un fenómeno en el cual las células dejan de dividirse. Las células senescentes si bien no se replican, mantienen un metabolismo activo y presentan actividad de β -galactosidasa a pH 6 (SA- β gal) [151]. En este trabajo, para evaluar si DhL produce senescencia en las células arrestadas con HU, realizamos la determinación de la actividad de SA- β gal mediante tinción citoquímica. Así, verificamos que el tratamiento con 20 μ M DhL por 24 horas no produce senescencia en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 arrestadas con HU.

Hasta aquí, nuestro objetivo fue lograr las mejores condiciones de experimentación para investigar el efecto de DhL en la adhesión, invasión y migración celular. Se sabe que muchas LSs tienen efectos significativos sobre el ciclo celular y específicamente, DhL produce el arresto en G2/M en líneas de células tumorales [90]. En este trabajo, decidimos arrestar a las células en la fase G1/S con HU, para estudiar concretamente las vías de señalización relacionadas con la migración e invasión celular. Con nuestros ensayos, hemos

demostrado que las concentraciones de HU utilizadas, arrestan a las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-231, sin afectar la viabilidad celular. Luego, probamos que en células arrestadas con HU, el tratamiento con concentraciones de hasta 20 μ M DhL, no afecta la viabilidad celular, ni induce senescencia o apoptosis. Por lo tanto, consideramos a la utilización de las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-231 arrestadas con HU, como un modelo adecuado para realizar los experimentos de adhesión, invasión y migración, para estudiar el efecto de DhL como antimetastásico.

Efecto de DhL en la adhesión celular

La adhesión de las células tumorales a la MEC es clave en el estímulo migratorio y las vías de señalización que participan en este proceso representan un importante blanco para la terapia antimetastásica. Las AFs son complejos proteicos que conectan el citoesqueleto de la célula con la MEC, y tienen como función transmitir la fuerza mecánica y señales reguladoras. Están formadas por más de 100 proteínas diferentes y además de anclar la célula al sustrato, sirven como sensores que informan de las condiciones del sustrato [28].

En este trabajo, evaluamos el efecto DhL en la adhesión de las células tumorales a la MEC. Para esto, realizamos experimentos de adhesión, expansión y formación de las AFs en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10, tratadas con 20 μ M DhL por 24 horas. En ensayos funcionales donde utilizamos placas de cultivo recubiertas con FN, comprobamos que DhL produce inhibición de la adhesión celular en las tres líneas celulares. Luego, debido a que la expansión celular se relaciona con la maduración de las AFs, analizamos el efecto de DhL en la expansión de las células HeLa, B16-F0 y B16-F10 sobre FN. Así, percibimos que DhL reduce el área celular y por lo tanto, la expansión de las tres líneas celulares. Posteriormente, analizamos mediante Western blot, el efecto de DhL en la concentración de vinculina en las células HeLa, lo cual arrojó que el tratamiento produce una disminución de la expresión de esta proteína. Por último, evaluamos por inmunofluorescencia la formación de las AFs y observamos que DhL disminuye el número y tamaño de estas en las células HeLa y B16-F10.

La pérdida de vinculina afecta a varias funciones relacionadas con la migración celular: no se produce la maduración de las AFs y se perjudica la adhesión y expansión de la

célula en el sustrato. Especialmente, se ha visto que la ausencia de esta proteína en las células, produce AFs de menor tamaño, alteración en la formación de las fibras de estrés de actina, e inhibición de la extensión del lamelipodio [125], [152]. Además, se sabe que algunas células deficientes en vinculina avanzan lentamente y poseen lamelipodios menos estables, porque se perjudica la polimerización de actina. La acción de vinculina en las AFs, de unir las integrinas al citoesqueleto, parece ser crítico en el control de la mecánica del citoesqueleto, la expansión de la célula y la formación de los lamelipodios [152], [153].

En base a esto, concluimos que DhL inhibe la adhesión y expansión celular porque disminuye la formación de las AFs y esto parecería estar relacionado con la disminución en la concentración de vinculina, que afecta la formación y maduración de las AFs. Por lo tanto, consideramos que DhL posee potencial como antimetastásico, porque inhibe un paso importante en el desarrollo de las metástasis como es la adhesión celular a la MEC.

Efecto de DhL en la invasión celular

La invasión celular es una característica fundamental del proceso metastásico. Comienza desde el momento en el que las células tumorales se separan del tumor primario para invadir los tejidos circundantes y migrar hacia órganos distantes. Las células invasoras tienen la capacidad de abrirse camino mediante la secreción de enzimas que degradan la MEC. Estas enzimas son las MMPs, endopeptidasas zinc dependientes, que clivan el colágeno, la FN y la laminina. En la metástasis, las MMPs -2 y -9 son las que mayoritariamente actúan [154].

En este trabajo, con el fin de investigar el efecto de DhL en el proceso de invasión de las células tumorales, estudiamos la capacidad celular de atravesar una matriz tisular, la actividad de las MMPs liberadas al medio extracelular y la activación de la señalización de las MAPKs.

En primer lugar, para evaluar el proceso invasivo utilizamos las cámaras *transwell* recubiertas con matrigel y líneas celulares de distinta capacidad metastásica. Así, observamos que 20 μ M DhL disminuye la capacidad de invasión de las células HeLa, B16-F0, B16-F10, MCF-7 y MDA-231. En este ensayo, las células B16-F10 y MDA-231 se mostraron más invasivas que su par B16-F0 y MCF-7, respectivamente. Sin embargo, en

todas las líneas celulares el efecto inhibitorio de la invasión por el tratamiento con DhL fue similar y cercano al 50%. Por lo tanto, consideramos que DhL inhibe el proceso invasivo de estas células tumorales, independientemente de la capacidad metastásica de la línea celular.

A continuación, evaluamos mediante zimografía el efecto de 20 μ M DhL en la actividad de las MMPs secretadas al medio extracelular por las células HeLa y B16-F0. En las células HeLa observamos una discreta reducción de la degradación de la gelatina por el tratamiento con DhL y según la movilidad electroforética, las enzimas afectadas parecerían corresponder a las MMP-2 y MMP-9. En las células B16-F0, DhL inhibió por completo la degradación del colágeno, mediante una MMP de movilidad electroforética similar a una proteína de 85 kDa. En definitiva, DhL inhibió la actividad de las MMPs en las células HeLa y B16-F0, enzimas que son clave para la invasión tumoral.

Dentro de las vías de señalización que favorecen la invasión celular, las MAPKs juegan un rol preponderante porque regulan la secreción de las MMPs, la organización del citoesqueleto, la migración e invasión celular. La actividad de ERK, JNK y p38 suele estar aumentada en las células tumorales y se cree que su inhibición puede contribuir a evitar las metástasis [141]. En nuestro trabajo, el ensayo de Western blot para determinar el efecto de 20 μ M DhL en la activación de ERK, JNK y p38, nos permitió comprobar que el tratamiento disminuye la fosforilación de ERK y p38, pero no afecta la de JNK. Por lo tanto, este resultado nos sugiere que DhL inhibe dos MAPKs que poseen una gran influencia en los procesos de migración e invasión tumoral.

Otros autores, también han demostrado que algunas LSs tienen efecto inhibitorio sobre las MAPKs. Es el caso de germacranolide y alantolactona, que deprimen la producción de óxido nítrico en macrófagos, a través de la inhibición de las cascadas de señalización del NF κ B y las MAPKs [155], [156]. Asimismo, se sabe que la inhibición de la secreción de las MMPs -2 y -9 es logrado al impedir la activación de las MAPKs [49], [157], [158]. Por ejemplo, costunolide, isodesoxielefantopina y la LS sintética DL-3, inhiben la migración e invasión de las células tumorales en cultivo, a través de la disminución de la secreción de MMP-9 y la inhibición de la vía del NF κ B [81], [159], [160].

En base a esto, concluimos que DhL posee una significativa acción inhibitoria en el proceso invasivo de las células tumorales. Este tratamiento produjo disminución de la actividad de las MMPs, asociado a que las células mostraron una marcada dificultad para

atravesar el matrigel. Conjuntamente, DhL disminuyó la activación de ERK y p38, las cuales son proteínas que suelen estar sobreexpresadas en los procesos metastásicos. Por lo tanto, a partir de estos resultados consideramos que DhL posee propiedades anti-invasivas.

Efecto de DhL en la migración celular

La migración celular es un proceso central en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares, y los errores durante este proceso generan graves consecuencias, como la formación de metástasis. Por eso, se piensa que el estudio del efecto de compuestos naturales en la migración celular, puede conducir al desarrollo de estrategias terapéuticas para controlar las células que migran desde un tumor invasivo hacia órganos distantes.

En este trabajo, para estudiar el efecto de DhL en la migración de las células tumorales, analizamos la motilidad y morfología celular, la organización del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, la dinámica del frente de avance, y la activación de Rac1.

Inhibición de la migración

Para analizar el efecto de DhL en la motilidad de las células tumorales, realizamos el ensayo de la herida y de migración en cámaras *transwell*, en células HeLa, B16-F0 y B16-F10. En el ensayo de la herida, observamos una inhibición del cierre de esta, de manera concentración dependiente (0 a 20 μ M DhL), en las tres líneas celulares. De igual manera, en las cámaras *transwell* evidenciamos una importante inhibición de la migración. Hay que tener en cuenta que estos ensayos se diferencian entre sí por el estímulo migratorio que se le aplica a la célula. En el ensayo de la herida, el estímulo de migración es físico, y se produce cuando la célula es desprovista de los contactos intercelulares. En cambio, en la cámara *transwell* el estímulo de migración es quimiotáctico, donde la célula es provocada a atravesar por los poros de la membrana, atraída por el SFB [3]. Estos resultados demostraron que más allá de las vías de señalización involucradas en el estímulo migratorio (pérdida de la inhibición por contacto o la estimulación de receptores de factores de

crecimiento), 20 μ M DhL produce una marcada inhibición de la migración en las células HeLa, B16-F0 y B16-F10.

Teniendo en cuenta que la inhibición de la migración suele producirse debido a una disminución de la velocidad o una pérdida de la direccionalidad celular, a continuación analizamos mediante video-microscopia, el efecto de DhL en la velocidad y la trayectoria de las células HeLa, durante 24 horas de tratamiento. Así, observamos que 20 μ M DhL disminuye la velocidad de migración pero no afecta la direccionalidad celular.

La velocidad de migración depende del desarrollo del frente celular, la protrusión de la membrana y la renovación de las AFs [125], [161]. En cambio, la direccionalidad de la migración, depende del mantenimiento de la polaridad celular [162]. En base a esto, especulamos que la reducción de la velocidad de migración por el tratamiento con DhL, podría deberse a una alteración en el citoesqueleto.

Alteración del citoesqueleto

Muchos compuestos que inhiben la migración celular afectan la organización del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, y con esto, la formación del frente celular [2]. Mediante video-microscopia analizamos el efecto de 20 μ M DhL en la morfología y la formación del frente celular en las células HeLa. Durante 24 horas de tratamiento, observamos que las células disminuyen el área total, se vuelven filamentosas, y desarrollan mayor cantidad de procesos, los cuales también son más largos. Concretamente, las células tratadas con DhL parecieron tener problemas con la formación del frente celular, ya que este presentaba menores dimensiones. A partir de estos resultados, concluimos que DhL afecta drásticamente la morfología y la formación del frente celular.

La morfología de la célula se relaciona particularmente con la disposición de los filamentos de actina y los microtúbulos [163][164]. Así, se ha visto que las células con alteraciones en la polimerización de actina y la organización de los microtúbulos, adoptan una morfología alargada y emiten procesos celulares [165]. Dado que el tratamiento con DhL alteró la morfología de las células de manera similar, consideramos que la afección del citoesqueleto de actina y los microtúbulos están implicados en este proceso.

Esto nos llevó a estudiar por inmunofluorescencia, el efecto de DhL en la distribución de los microtúbulos en las células HeLa. De esa manera, observamos que 20 μM DhL produce una alteración de la típica organización radial de los microtúbulos. Concretamente, debido a este tratamiento, se visualizaron zonas vacías de microtúbulos en el cuerpo celular y estos se encontraron acumulados en las protrusiones de la membrana.

Los microtúbulos son indispensables para la migración de ciertas células y recientemente, han demostrado que la familia de Rho GTPasas, las cuales son reguladoras claves de la migración celular, afectan la distribución de los microtúbulos. Así, las Rho GTPasas a través de sus efectores, capturan y estabilizan los microtúbulos en la corteza celular, lo que conduce a un arreglo polarizado de los mismos [166]. Además, en fibroblastos, se ha visto que la organización radial de los microtúbulos provee un transporte efectivo e interacciones dinámicas en la corteza de la célula, lo cual es necesario para mantener su morfología típica. En cambio, la desorganización de los microtúbulos con zonas libres de estos, conduce a una alteración de la distribución intracelular y la morfología. Además, es característico que las células que presentan un su citoplasma zonas libres de microtúbulos migran con la mitad de velocidad y menores distancias, comparado con las células intactas [167]. Esto correlaciona con lo que hemos observado en las células HeLa tratadas con DhL. Es por eso que consideramos que el efecto de DhL en la inhibición de la migración, podría estar relacionado con la afección en la distribución de los microtúbulos y estos a su vez, con una alteración de la señalización de las Rho GTPasas.

A parte de los microtúbulos, el citoesqueleto de actina cumple un papel crucial en la migración celular. Para la protrusión de la membrana y el desarrollo del lamelipodio, se necesita la polimerización de actina en el frente de avance celular. Los filamentos de actina son los que generan la fuerza que empuja la membrana hacia delante. Así, mediante un proceso cíclico, estos se arman en la zona más externa y se desarman en la parte posterior del frente de avance [6]. Con el fin de evaluar el efecto de DhL en la polimerización de los filamentos de actina, analizamos la proporción de monómeros, filamentos cortos y filamentos largos de actina en las células HeLa. Mediante centrifugación de los lisados celulares y Western blot de las fracciones obtenidas, verificamos que a las 24 horas de tratamiento, 20 μM DhL produce un aumento en el contenido celular de actina en forma de monómeros y una disminución de actina en la forma de filamentos largos. Luego, mediante

inmunofluorescencia, analizamos la distribución celular de actina-F. Así, observamos que DhL disminuye drásticamente la formación de la red de filamentos de actina en la periferia celular y se producen pequeños acúmulos citoplasmáticos de actina-F. Esto permite pensar que DhL produce un defecto en la polimerización y formación de la red de filamentos de actina en las células HeLa.

Durante la migración, cortactina es una proteína que estimula la polimerización de actina en forma de red, mediante la activación del complejo Arp2/3 [153]. Se ha visto que la falta de activación de cortactina afecta la formación de la red de actina y la extensión del lamelipodio [165]. En base a estos antecedentes y visto que DhL afectó la polimerización de los filamentos largos de actina y la formación de una red de actina en la periferia celular, especulamos que cortactina estaría implicada en su mecanismo de acción.

Reducción de la dinámica del frente de avance

En respuesta a factores estimulantes de la migración, se produce la protrusión del lamelipodio en el frente de avance celular. Cuando el lamelipodio no se adhiere adecuadamente al sustrato, la membrana se retrae y se forma el *ruffle*. Así, los *ruffles* involucran movimientos dinámicos y rápidos del margen de la membrana plasmática, que se producen mientras esta sufre fluctuaciones irregulares de protrusión y retracción [22], [168]. Con el fin de elucidar si DhL afecta la dinámica de la membrana, analizamos mediante video-microscopía y kimografía, la protrusión de los lamelipodios y la formación de *ruffles* en las células HeLa. Así, descubrimos que el tratamiento con 20 μM DhL disminuye considerablemente la protrusión de los lamelipodios y la frecuencia de los *ruffles* y además, se produce un alargamiento de la vida media de los *ruffles*.

En células de carcinoma de colon se ha reportado que la inhibición de la motilidad celular esta relacionada con la disminución de la protrusión de la membrana y la formación de *ruffles* [169]. Así, estas estructuras han mostrado ser un indicador de la motilidad celular y potencial metastásico, debido a su correspondencia con el poder invasivo de las células tumorales en ensayos *in vivo* [170]. En base a esto, concluimos que DhL produce una reducción en la dinámica del frente de avance celular y en consecuencia, reduce el potencial metastásico de las células HeLa.

Alteración de la localización y activación de Rac1

La familia Rho GTPasa juega un papel crucial en regular los cambios del citoesqueleto necesarios para la migración celular. Rac1 es la Rho GTPasa que estimula el ensamble de los filamentos de actina, la protrusión de la membrana y la migración celular [171]. Mediante inmunofluorescencia, estudiamos el efecto de 20 μM DhL en la localización de la proteína Rac1 en células HeLa y observamos que a las 24 horas de tratamiento, Rac1 se acumula en las protrusiones de la membrana, rodeando estructuras anulares. Estas estructuras fueron luego analizadas mediante microscopia electrónica de barrido y en base a su aspecto, especulamos que corresponden a la formación de CDRs.

Los CDRs son proyecciones de la membrana ricas en actina-F que se forman en la superficie celular apical. Son formaciones transcientes, altamente dinámicas, con una función crítica en la internalización de receptores de la membrana plasmática y en la migración celular [32]. Jin y Wang han demostrado que la acumulación de Rac1-GTP en los CDRs, tiene un efecto negativo sobre el desarrollo del lamelipodio, la expansión y la migración celular. Estos mismos autores demostraron que el proceso está relacionado con la actividad de la proteína no receptor tirosina quinasa (Abl). En respuesta a la adhesión celular y señales de factores de crecimiento, Abl estimula la polimerización de actina y la formación de *ruffles* en la membrana. Particularmente, Abl regula la localización de Rac1-GTP en el frente de avance y en los CDRs. Así, la sobreexpresión de Abl produce la acumulación de Rac1-GTP en estas estructuras [172]. Si bien la proteína Abl ha sido ampliamente estudiada por estar involucrada en procesos hematopoyéticos malignos, como la leucemia mieloide crónica, descubrimientos recientes indican que Abl sobreactivada juega un rol importante en tumores sólidos malignos de pulmón y mama [173].

Rac1 actúa como un interruptor molecular que cicla entre el estado unido a GTP y GDP. La activación de Rac1 es regulada por varios mecanismos que incluyen, el intercambio de nucleótidos y su hidrólisis, la localización subcelular, y los niveles de expresión de la proteína. La iniciación de la señalización de Rac1 requiere al menos dos mecanismos: el ciclo GTP/GDP, y la focalización de la proteína en microdominios de la membrana ricos en colesterol. Así, Rac1 al incorporar un dominio lipídico (palmitato) puede unirse a la membrana plasmática, donde luego es estimulada a unirse a GTP, para actuar sobre

proteínas efectoras que se ocupan del remodelado del citoesqueleto de actina [174]. Aparte de los importantes procesos celulares que regula Rac1, como son la reorganización del citoesqueleto y la migración, esta proteína también tiene un rol importante en la activación de la transcripción mediada por NFkB. Ambos, Rac1 y NFkB regulan muchas propiedades del fenotipo maligno de las células tumorales que incluyen la proliferación, angiogénesis y metástasis. Se ha visto que la inhibición de la activación de Rac1 resulta en la disminución de la proliferación y migración de las células tumorales y por eso se considera un importante blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer [175].

En este trabajo evaluamos el efecto de DhL en la activación de Rac1 mediante la medición de la concentración de Rac1-GTP por *pull down*. Es así como descubrimos que el tratamiento con 20 μ M DhL produce una reducción en la concentración de Rac1-GTP en las células HeLa.

En nuestros experimentos, observamos que DhL produce la disminución en la activación de Rac1, con una aparente acumulación de esta proteína en los CDRs, junto a un efecto negativo de la protrusión de los lamelipodios y de la migración celular. Por lo cual, concluimos que la alteración en la localización y activación de Rac1, están involucradas en el mecanismo de acción de DhL en la inhibición de la migración celular.

Discusión general del mecanismo de acción de DhL

Considerando todos los resultados obtenidos en esta tesis y en base a publicaciones relacionadas con este tema, proponemos un modelo acerca del mecanismo de acción de DhL en la inhibición de la adhesión, invasión y migración de las células tumorales en cultivo (**Figura 40**).

A través de las publicaciones de Rea [176] y Sawai [177], sabemos que FAK estimula la formación de la AF, y cuando la vía de señalización ERK/FAK es inhibida, disminuye la adhesión celular. Específicamente, el efecto de la inhibición de FAK en la AF, es producido por una reducción en los niveles de las proteínas de adhesión como paxilina y talina [178]. Además, la unión de vinculina con FAK tiene como función regular la fuerza contráctil de la AF [179]. Consecuentemente, como esta quinasa también regula la dinámica de los

microtúbulos y la polimerización de los filamentos de actina, su inhibición produce un efecto negativo en la migración celular [176], [180].

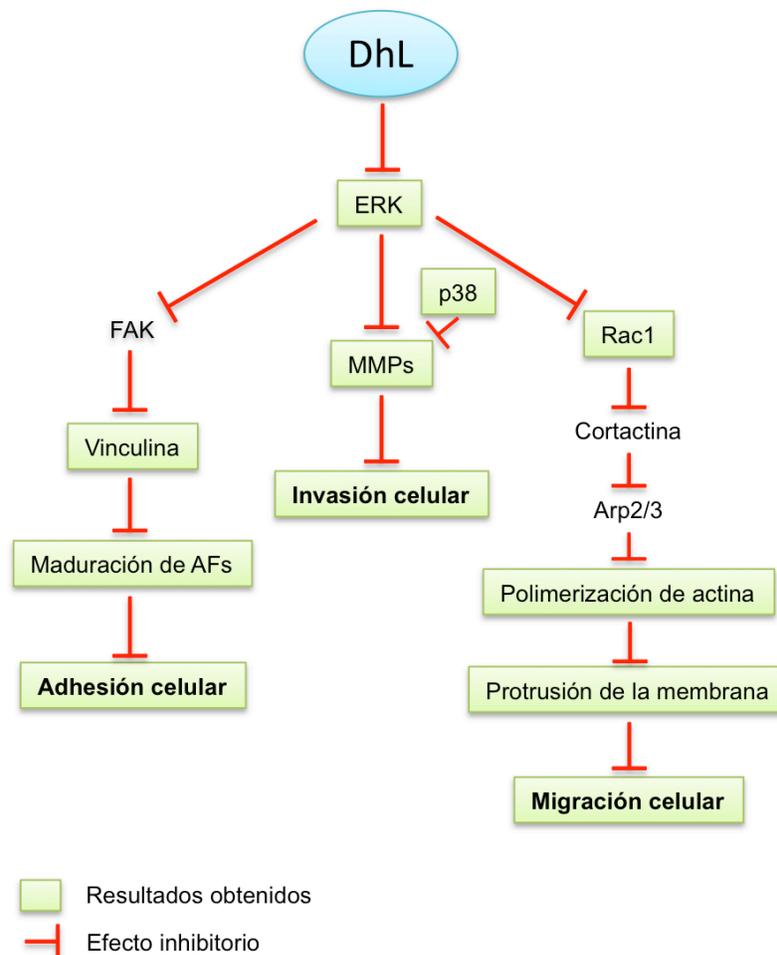


Figura 40. Modelo propuesto del mecanismo de acción de DhL en la inhibición de la adhesión, invasión y migración de las células tumorales en cultivo.

En nuestros experimentos se ha observado que DhL disminuye los niveles de p-ERK^{1/2} y vinculina, y además, se produce una alteración en la formación de las AFs, la polimerización de actina y la distribución de los microtúbulos. Como resultado, disminuyó la adhesión a la MEC y la migración celular.

En base a esto, consideramos que el efecto inhibitorio de DhL en la adhesión y migración celular, se debe a un efecto negativo sobre la activación de ERK^{1/2} y la formación de las AFs, y en este proceso, la inhibición de FAK podría estar involucrada (Figura 40).

En cuanto al proceso de invasión, la inhibición de la actividad de las MMPs es un importante objetivo en la lucha contra el cáncer. Estas enzimas, que son producidas tanto por las células tumorales como por las estromales, son fundamentales para el desarrollo del proceso invasivo. Las señales que estimulan las MAPKs, ERK $\frac{1}{2}$ y p38, incrementan la producción de MMP-2 y MMP-9 por las células tumorales, favoreciendo el proceso invasivo. Muchos compuestos naturales, entre ellos los polifenoles, son muy estudiados por sus propiedades antitumorales relacionadas a las MMPs. Un ejemplo lo representa la curcumina, que ha demostrado disminuir la actividad de MMP-9 en células de cáncer de mama, a través de la inhibición de la señalización de ERK $\frac{1}{2}$ y p38 [181]. De forma similar, mediante la inhibición de estas MAPKs, se ha conseguido disminuir la actividad de MMP-2 en fibroblastos pulmonares [157]. Ginsenoside Rd, es otro compuesto natural, extraído del ginseng, que disminuye la capacidad de invasión de las células tumorales a través de la inhibición de la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$ y p38, y la reducción de la actividad de las MMPs [49].

En nuestros experimentos hemos demostrado que DhL disminuye la activación de ERK $\frac{1}{2}$ y p38, la actividad de las MMPs liberadas al medio extracelular y la capacidad de invasión de las células tumorales (**Figura 40**). Por lo tanto, postulamos que DhL a través de la inhibición de las vías de ERK $\frac{1}{2}$ y p38, disminuye la actividad de las MMPs y la invasión de las células tumorales. Sin embargo, para determinar si las enzimas inhibidas por DhL corresponden a MMP-2 y MMP-9 se requiere realizar Western blot con los anticuerpos específicos para estas proteínas.

Durante la migración, es necesaria la polimerización de actina para que se desarrolle la protrusión de la membrana. Cortactina es una proteína que regula la formación de la red de actina a través de la estimulación de Arp2/3, y juega un papel clave en el cáncer agresivo [182]. Cortactina es sustrato de ERK $\frac{1}{2}$, de modo que la fosforilación de cortactina mediada por esta MAPK promueve la activación de Arp2/3 y la estimulación de la migración celular [183]. Por otro lado, ERK $\frac{1}{2}$ también regula la activación de Rac1 [184], y esta a su vez, produce la redistribución de cortactina desde el citoplasma a la membrana [185], de forma que localiza la acción de esta proteína en el frente de avance [186].

Además de la acción de Rac1 en el citoesqueleto de actina, esta Rho GTPasa es capaz de regular la distribución de los microtúbulos [187]. La activación de Rac1 promueve la orientación de los microtúbulos en el frente de avance y de esta manera, también estimula la migración celular direccional [188].

En nuestro trabajo hemos observado que DhL, disminuye la activación de ERK $\frac{1}{2}$ y Rac1, altera la distribución de los microtúbulos, afecta la polimerización de actina, disminuye la protrusión de la membrana e inhibe la migración celular. Estos resultados nos permiten especular que DhL disminuye la migración celular a través de la inhibición de la vía ERK/Rac1. Si bien los resultados nos hacen pensar que cortactina podría estar inhibida, para corroborarlo debemos analizar el efecto de DhL en la activación y localización de esta proteína en las células tumorales (**Figura 40**).

Los ensayos aquí desarrollados nos muestran que DhL reduce la actividad de ERK $\frac{1}{2}$, la formación de las AFs, la actividad de las MMPs y la protrusión de la membrana. Estos resultados nos permiten sugerir que el mecanismo de acción de DhL involucra la señalización mediada por ERK, cuya inhibición, se relaciona con la disminución de la actividad de proteínas y procesos que regulan la adhesión, invasión y migración de las células tumorales. Por lo tanto, concluimos que el tratamiento con DhL reduce las propiedades metastásicas de las células tumorales en cultivo.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados. Se sabe que con modificaciones en la dieta, un óptimo peso corporal y actividad física regular, las probabilidades de cáncer se pueden reducir un 30%. Los suplementos dietarios, los fitoquímicos y los minerales son intensamente investigados para la prevención del cáncer, debido a su baja toxicidad y propiedades antioxidantes. Así, en la última década se han identificado numerosos compuestos botánicos con potencial antitumoral. El estudio exhaustivo de estos compuestos naturales para determinar su mecanismo molecular, nos permitirá diseñar futuros ensayos clínicos [189].

Muchos compuestos naturales, como los polifenoles presentes en el té verde, la curcumina de las raíces de *Curcuma longa*, el resveratrol que se encuentra en el vino tinto, el licopeno del tomate, el pomegranate presente en la fruta, la luteonina de los vegetales verdes, la genisteína de la soja, los triterpenos de las hierbas y los ácidos grasos poliinsaturados, han mostrado tener un gran potencial en la quimiopreención del cáncer [190].

Las vías de señalización sobre las que actúan los compuestos naturales son numerosas. Normalmente, un mismo compuesto modifica diferentes procesos celulares, dependiendo del tipo de célula sobre la que actúe. Muchos quimiopreventivos inducen arresto del ciclo celular o apoptosis, por activación de p53 y sus genes blanco. También, la vía del NFκB es inhibida por muchos de estos agentes, y así, consiguen suprimir un importante factor de transcripción, de genes que controlan la proliferación y transformación celular, la inflamación, invasión y metástasis. En la carcinogénesis, la acción de los factores de crecimiento también está implicada y numerosos compuestos han demostrado inhibir sus vías de señalización. Por otro lado, se ha visto que el estímulo del sistema inmune ayuda a eliminar las células dañadas antes de que se desarrolle un tumor. Algunos compuestos activan a las células T o la producción de citoquinas y así, contribuyen a la prevención del cáncer. Específicamente en la invasión y metástasis, numerosos compuestos derivados de hierbas han demostrado interrumpir estos procesos, a través de la modulación de las vías de señalización que inducen la adhesión celular, la degradación de la MEC y la angiogénesis.

Las LSs son compuestos naturales activos, presentes en muchas plantas medicinales, que han demostrado tener actividad anticancerígena. Las más conocidas son costunolide, partenolide, helenalina y artemisina, a partir de las cuales se ha reportado que inhiben la proliferación e inducen apoptosis en las células tumorales, alteran la arquitectura de los microtúbulos e inhiben la angiogénesis, la migración y la invasión tumoral.

DhL es una LSs que ha mostrado acción inhibitoria en la activación del NFκB y la proliferación celular, la inducción de apoptosis y el bloqueo del crecimiento tumoral. Además, en este trabajo hemos demostrado que DhL a través de la inhibición de la señalización de ERK^{1/2}, reduce la adhesión, migración e invasión de las células tumorales en cultivo.

Con el fin de desarrollar terapias más específicas para el cáncer y menos agresivas para los pacientes, se buscan entre los compuestos naturales aquellos que posean propiedades antitumorales. Esto, ha motivado el desarrollo de nuestro trabajo en la caracterización del efecto de DhL en el proceso del cáncer. Consideramos que nuestros resultados proporcionan un gran aporte y sientan las bases, del estudio de las propiedades antimetastásicas de DhL.

La seguridad es siempre lo primero a tener en cuenta cuando se desea realizar estudios con humanos y un agente quimiopreventivo ideal debería ser no tóxico, efectivo a bajas dosis, económico y fácil de obtener. DhL, a través de numerosas publicaciones ha demostrado reunir estas características, y por eso esperamos que nuestro trabajo promueva la continua investigación sobre este compuesto para que sea utilizado en futuros ensayos clínicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Para continuar con la caracterización de DhL como antimetastásico, es necesario profundizar el estudio del mecanismo de acción de este compuesto, en la adhesión, invasión y migración celular.

En modelos de líneas celulares en cultivo, proponemos analizar el efecto de DhL en la renovación de las AFs y el reciclado de las integrinas, la degradación de la MEC y la formación del frente de avance. Además, planteamos estudiar en un modelo de ratón, el efecto de DhL en el desarrollo de metástasis experimentales.

De ese modo, los objetivos planteados son:

Estudiar el efecto de DhL en la renovación de AFs y el reciclaje de integrinas: Analizar la velocidad de renovación de las AFs y la activación de quinasas que regulan su ensamble, como FAK, Src y PKC. Determinar el nivel de expresión de integrinas, su unión específica a FN y el tráfico de esta a través del ciclo: protrusión de la membrana, formación de *ruffles* y endocitosis regulada por Ras. Estudiar el reciclaje de integrinas mediado por Rab11.

Analizar el efecto de DhL en la degradación de la MEC: Estudiar la síntesis y transporte de vesículas de secreción de MMP-2 y MMP-9, y la participación de Rab-40b en este proceso. Evaluar la formación de invadopodios y la actividad de la enzima degradativa MT1-MMP presente en la membrana de las células tumorales.

Profundizar sobre el efecto de DhL en la formación del frente de avance celular: Estudiar la activación de la vía de Akt, los niveles de PI3K y PTEN. Analizar la endocitosis de Rac1 mediada por Rab5 y los niveles de Tiam1 (GEF de Rac1). Medir la activación de cortactina. Estudiar la dinámica de los microtúbulos y actividad de mDia1.

Evaluar el efecto de DhL en la formación de metástasis experimentales: Analizar la distribución y tamaño de los tumores. Estudiar la capacidad de angiogénesis. Determinar la viabilidad de las células estromales asociadas al tumor. Analizar la reversión del fenotipo celular mesenquimal al epitelial. Medir la expresión de moléculas de adhesión en las células metastásicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Para este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: células HeLa S3 provenientes de un carcinoma cervical humano, células MCF-7 provenientes de un adenocarcinoma de mama humano metastásico, células MDA-MB-231 derivadas de un adenocarcinoma mamario humano altamente metastásico y células B16-F0 y B16-F10 provenientes de un melanoma murino.

Células HeLa S3

Estas células fueron originalmente aisladas a partir de un carcinoma cervical de una mujer afroamericana de 31 años llamada Henrietta Lacks. La morfología de estas células es de tipo epitelial y tienen incorporado en su genoma secuencias del virus papiloma humano de alto riesgo tipo 18 (HR-HPV18). Son heteroploides, en general aneuploides y tienen como característica principal una alta capacidad de proliferación, lo cual se debe principalmente a que expresan una proteína vírica que degrada p53. Cuando son cultivadas, forman una monocapa y tienen la capacidad de inhibición de la proliferación por contacto célula-célula. Son muy empleadas en los laboratorios de investigación y su uso ha contribuido ampliamente a los avances del conocimiento de importantes vías moleculares de las células humanas tanto normales como tumorales.

Células MCF-7

Originalmente aisladas de un adenocarcinoma de mama metastásico de una mujer de raza blanca de 69 años. Una de las características de estas células es la de expresar p53 sin mutaciones. Exhiben algunas características del epitelio mamario diferenciado. Fueron las primeras células de cáncer de mama humano en ser mantenidas permanentemente en cultivo celular. Estas células poseen receptores para estrógeno y son un modelo ampliamente utilizado para el estudio del cáncer de mama.

Células MDA-MB-231

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue obtenida de una paciente de 51 años, en 1.973, en el Centro del Cáncer M. D. Anderson. Con morfología epitelial, las células MDA-MB-231 adoptan en cultivo una forma ahusada. *In vitro*, estas células tienen un fenotipo muy invasivo. Muestran abundante actividad en ensayos de quimiotaxis y quimioinvasión en cámaras *transwell* y una gran habilidad para formar colonias. No poseen receptores para

estrógeno y se caracterizan por una alta capacidad metastásica en ensayos experimentales *in vivo*.

Células B16-F0 y B16-F10

Las células B16-F0 provienen de un melanoma espontáneo generado por un ratón de la cepa C57BL/6 y tienen la característica de ser pobremente metastásicas. Las células B16-F10 fueron obtenidas a partir de las células B16-F0 que se inyectaron en ratones C57BL/6 sanos. Las células de los tumores formados fueron aisladas, cultivadas *in vitro* e inoculadas nuevamente en ratones. Este ciclo se repitió 10 veces, lo que permitió obtener las células B16-F10 que se caracterizan por ser muy metastásicas.

Cultivos celulares

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en frascos de cultivo T-25 y en placas de 6 pocillos o de 60 mm de diámetro (TPP). Las líneas celulares HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, B16-F0 y B16-F10 fueron cultivadas en medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture, GIBCO), suplementado con 10% SFB (PAA) y conteniendo un coctel de antibióticos 10.000 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomina y 25 µg/ml anfotericina (GIBCO). La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C, con atmosfera de 5% CO₂ y 95% de aire.

Subcultivos celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en los experimentos fueron duplicadas en el laboratorio como máximo 12 veces (12 subcultivos), en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar. Cada subcultivo se realizó cuando las células se encontraron próximas a un 80-90% de confluencia. Para ello, se lavaron 2 veces con PBS, y se desprendieron mediante la incubación con una solución de 0,25% tripsina, 1 mM EDTA en PBS (tripsina-EDTA 10x, GIBCO), durante 2-5 minutos en estufa a 37°C. La tripsina se inactivó añadiendo medio de cultivo suplementado con SFB. A continuación, las células fueron subcultivadas o sembradas en placas, para la realización de los ensayos.

Criopreservación y descongelación de células

Las células se conservaron en nitrógeno líquido. Para ello, las células en cultivo en 80% de confluencia fueron desprendidas con tripsina y 1,5-2 x 10⁶ células fueron centrifugadas a

1.000 rpm durante 7 minutos. El sedimento se resuspendió con 10% dimetilsulfoxido (DMSO) en SFB, (medio de congelamiento) y se cargó en los criotubos, (el DMSO se utilizó como crioprotector porque previene la formación de cristales de hielo intracelulares). Los criotubos fueron incubados en el siguiente orden: 4°C por 30 minutos, -20°C por 1 hora, -70°C por 4 horas y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Deshidroleucodina

La Deshidroleucodina (DhL) fue obtenida en la cátedra de Química Orgánica de la Universidad Nacional de San Luis y producida en nuestro laboratorio por la técnica de cromatografía en columna con solventes orgánicos [191]. Para realizar los experimentos se preparó una solución madre de DhL en DMSO de concentración 0,2 M, que luego se diluyó en medio de cultivo para obtener una concentración de 1 mM, y a partir de esta última se realizaron las diluciones en las placas de cultivo para el tratamiento de las células. Así, las células recibieron una concentración de DMSO menor a 0,005%.

Tratamientos celulares

Antes de comenzar cada experimento las células en proliferación, al 80% de confluencia, fueron mantenidas en medio de cultivo sin suero por 24 horas. Luego, las células fueron incubadas con HU en medio de cultivo con 1,5% SFB, para inhibir la proliferación celular. A esta condición la llamamos “células arrestadas con HU”. A tiempo 0 de incubación con HU, las “células controles” recibieron el vehículo del compuesto (DMSO) y las “células tratadas” recibieron DhL hasta una concentración de 20 μ M. Luego, estas fueron incubadas en estufa a 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, el tiempo indicado en cada experimento.

Ensayo de Proliferación

Se colocaron 30.000 células/p, en placas de 24 pocillos y se incubaron por 2 horas para permitir la adhesión celular a la placa. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de HU (0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 mM) en medio de cultivo con 1,5% SFB. A las 24 horas, las células fueron desprendidas con tripsina/EDTA, resuspendidas en medio con 10% SFB y colocadas en una cámara de Neubauer. Se realizó el recuento celular en los cuatro cuadrantes de la retícula de la cámara, en un microscopio óptico con contraste de fase Nikon Alphaphot-2, con objetivo 10x. El cálculo del número de células/p se realizó con

la siguiente formula: células/p = (células contadas x 10.000 x volumen de dilución) / 4 (Figura 41).

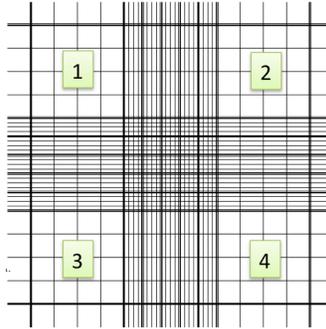


Figura 41. Detalle de la retícula de una cámara de Neubauer. El recuento de células es realizado en los cuatro cuadrantes señalados y posteriormente se aplica la formula células/p = (células contadas x 10.000 x volumen de dilución) / 4 para determinar la concentración celular.

Viabilidad celular

30.000 células/p fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas durante 2 horas para permitir la adhesión celular. Luego, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Posteriormente, las células fueron desprendidas de la placa de cultivo con tripsina/EDTA y se tiñeron con 0,4% azul trypan/PBS a pH 7. Inmediatamente, realizamos el recuento de las células incoloras y teñidas de azul en la cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado de la siguiente manera: número de células viables / número total de células x 100.

Senescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio estériles e incubadas hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación con medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Como control positivo de senescencia se utilizaron células en proliferación, tratadas con 20 μ M DhL por 48 horas. A continuación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con 2% PFA, 0,2% glutaraldehído en PBS por 5 minutos. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con una solución de 1 mg/ml X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactósido, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ y 2mM $MgCl_2$ en PBS, a pH 6), (Promega), a 37°C, por 6 horas. Por último, tras remover la solución de X-gal con PBS, las células fueron visualizadas en un microscopio óptico Nikon 80i, con objetivo 40x.

Apoptosis

La determinación de apoptosis se realizó en base a que en las etapas tempranas de este proceso, los fosfolípidos de la membrana plasmática como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina se redistribuyen desde la capa interna a la capa externa de la bicapa lipídica, donde quedan expuestos en la superficie celular. La detección de estos fosfolípidos externos se lleva a cabo mediante la unión de anexina V. Para esta determinación, las células adheridas a la placa de cultivo fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, fueron lavadas con PBS e incubadas con 1x anexina V-FITC (Invitrogen), en oscuridad, a 37°C, por 15 minutos. A continuación, las células fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia Nikon TE-2000, con objetivo 20x.

Ensayo de adhesión y expansión celular

Preparación de las placas

Las placas de 6 pocillos y cubreobjetos de vidrio fueron recubiertas con 10 μ g/ml fibronectina (BD Biosciences) e incubadas a 37°C por 1 hora. Luego fueron lavados con PBS y para evitar uniones inespecíficas a la fibronectina, estos fueron bloqueados con 0,1% albúmina en PBS, a temperatura ambiente por 1 hora.

Adhesión celular

Las células en 80% de confluencia fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, fueron desprendidas de la placa de cultivo con 1 mM EDTA/PBS, a 37°C, por 10 minutos (en los ensayos de adhesión no utilizamos tripsina para no dañar las proteínas de la superficie de la membrana). Se sembraron 50.000 células/p en las placas recubiertas con fibronectina, y se incubaron en medio con 10% SFB, durante 10, 20 y 60 minutos a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y el número de células adheridas a la placa se determinó con un microscopio óptico con contraste de fase Nikon TE-2000, con objetivo 4x.

Expansión celular

Las células en 80% de confluencia fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, fueron desprendidas de la placa de cultivo con 1 mM EDTA/PBS, a 37°C, por 10 minutos. Se sembraron 50.000 células/p en placas recubiertas con fibronectina y se incubaron durante 1 hora para permitir la adhesión celular. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y las células adheridas a la placa se incubaron

en medio con 10% SBF, durante 3 horas para permitir la expansión celular. Las células se fotografiaron con un microscopio óptico con contraste de fase Nikon TE-2000, con objetivo 20x, y se midió el área celular con el programa Image J (Image J 1.46r, National Institute of Health).

Inmunofluorescencia

Las células cultivadas sobre placas de cultivo o cubreobjetos de vidrio recubiertos con FN, fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL. Al final del tratamiento, las células fueron fijadas con 4% PFA, a 37 °C por 20 minutos, se trataron con 50 mM cloruro de amonio durante 30 minutos y se permeabilizaron con 0,05% saponina, 0,2% albúmina y 0,01% azida sódica en PBS, durante 30 minutos. Para visualizar las AFs se utilizó el anticuerpo anti-vinculina-FITC. Para estudiar los filamentos de actina, los microtúbulos y la proteína Rac1 se realizó la tinción con faloidina-FITC, y los anticuerpos primarios anti-alfa-tubulina y anti-Rac1, respectivamente. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón Cy3 (Tabla 1). Tanto la faloidina como los anticuerpos se incubaron a 4 °C por 18 horas. Por último, los preparados se observaron en un microscopio Confocal Olympus FV-1000 y Confocal Nikon C1, con objetivo 60x.

Especificidad	Dilución	Origen	Marca
Vinculina-FITC	1:200	Ratón	Sigma
Alfa-tubulina	1:50	Ratón	Abcam
Faloidina-FITC	0,25 mM	<i>Amanita phalloides</i>	Sigma
Rac1	1:200	Ratón	Santa Cruz
IgG ratón Cy3	1:400	Cabra	Jackson

Tabla 1. Anticuerpos y reactivos utilizados para realizar la técnica de inmunofluorescencia

Especificidad	Dilución	Origen	Marca
Vinculina	1:1000	Ratón	Sigma
Alfa-tubulina	1:1000	Ratón	Abcam
p-ERK ½	1:500	Conejo	Santa Cruz
ERK ½	1:1500	Ratón	Santa Cruz
p-JNK	1:500	Conejo	Santa Cruz
JNK	1:1000	Ratón	Santa Cruz
p-p38	1:500	Conejo	Santa Cruz
p38	1:1000	Ratón	Santa Cruz
Beta-actina	1:2500	Ratón	Sigma
Rac1	1:500	Ratón	Jackson
IgG-ratón-HRP	1:10.000	Cabra	Jackson
IgG-conejo-HRP	1:10.000	Cabra	Jackson

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para realizar el Western blot

Western Blot

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células fueron levantadas de la placa de cultivo por medios mecánicos y tratadas con buffer de lisis (50 mM HEPES, 1 mM EDTA,

150 mM NaCl, 10 mM beta-glicerofosfato, 1 mM NaF, 0,1% Tritón X-100 y 10% glicerol, pH 7,4) con inhibidores de proteasas. El lisado celular se centrifugó a 4.000g por 10 minutos y en el sobrenadante se cuantificaron las proteínas por la técnica de Bradford. En un gel de poliacrilamida al 12,5% se sembraron 40 µg de proteínas de cada muestra y la corrida electroforética se realizó a 100V y 20mA por 3 horas. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y ésta se incubó, por 20 minutos, con una solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS-tween). Luego la membrana se incubó con los anticuerpos primarios específicos, a 4°C, durante 18 horas. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) a 22°C por 2 horas, y las proteínas fueron reveladas con el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce/ThermoFisher Scientific Inc) y analizadas con el programa Image J (**Tabla 2**).

Zimografía

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 µM DhL por 24 horas. El medio de cultivo de las células fue recuperado y se le agregó 1x buffer Laemmli (sin beta-mercapto-etanol). Con iguales volúmenes de muestra se realizó la electroforesis en condiciones reductoras, no desnaturizantes, en un gel al 8% poliacrilamida y 1% gelatina. Luego, el gel se lavó durante 45 minutos con 2% tritón y 15 minutos con agua destilada, y posteriormente se incubó durante 48 horas en un buffer renaturalizante (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM ZnCl₂ a pH 7,4). Por último, se realizó la tinción del gel con solución azul coomasie y las bandas claras, correspondientes a la actividad gelatinolítica de las proteínas, se cuantificaron con el programa Image J.

Migración e invasión en cámaras *transwell*

La cámara *transwell* (BD Biosciences) es un inserto que se coloca en una placa de cultivo de 24 pocillos y así, forma una cámara superior e inferior separadas por una membrana con poros de 8 µm. Para el ensayo de migración, en la cámara inferior se colocó medio de cultivo con 10% SFB y en la cámara superior una suspensión de 5.000 células en medio de cultivo con 1,5% SFB, y se incubaron durante 2 horas para permitir la adhesión celular. Luego, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 µM DhL por 24 horas. Posteriormente, las células que quedaron en la cámara superior fueron eliminadas con un algodón y las células que llegaron a la cámara inferior fueron teñidas con cristal violeta y contadas en el microscopio óptico Nikon TE-2000, con objetivo 20x. Para realizar el ensayo

de invasión se utilizó el mismo procedimiento con la única diferencia que las cámaras *transwell* se encuentran recubiertas con matrigel.

Ensayo de la herida

Las células fueron incubadas en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 80%. Luego de 24 horas de incubación con medio de cultivo sin SFB, se realizó la herida con una punta de pipeta P200 y las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0, 5, 10 y 20 μM DhL por 24 horas. Como inhibidor de la migración se utilizó 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Citocalasina B. Se tomaron fotografías de la herida con un microscopio óptico Nikon TE-2000, con objetivo 4x, a las 0 y 24 horas de tratamiento y se cuantificó el número de células que cubrían la herida. Expresamos el resultado como porcentaje de células que cierran la herida tomando al control como 100%.

Video-microscopía en células vivas

Para la realización de secuencias de imágenes en células vivas, se tomaron fotografías con una cámara CCD Hamamatsu Orca 100, adosada a un microscopio de contraste de fase Nikon TE-2000, con una platina termostaticada a 37 °C y objetivo 20x. Para el análisis de la velocidad, direccionalidad y morfología celular se obtuvieron imágenes cada 15 minutos, durante 24 horas. Para el análisis de la dinámica de la membrana plasmática, a las 6 horas de tratamiento se tomaron imágenes cada 3 segundos, durante 15 minutos. Luego, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J mediante la aplicación “*Manual tracking*” y “*Kymography*” para realizar el rastreo celular y la kimgografía, respectivamente.

Morfología celular

El análisis de la morfología celular se realizó sobre fotografías de las células, tomadas con un microscopio óptico de contraste de fase Nikon TE-2000, con objetivo 20x. Con el programa Image J, medimos el área total, largo, ancho, perímetro y casco convexo de las células, y con estos datos calculamos los siguientes parámetros morfológicos: factor forma [$4\pi \times \text{área celular}/\text{perímetro}^2$], índice de bipolaridad [largo celular/ancho celular], índice de expansión [$\pi(\text{largo del casco convexo})^2/4(\text{área del casco convexo})$] e índice de procesos [área del casco convexo - área celular], [192]. Para medir las dimensiones del frente celular, consideramos como “frente celular”, a la parte anterior del cuerpo, que se extiende desde la mitad del núcleo hasta el margen anterior de la célula (Figura 42).

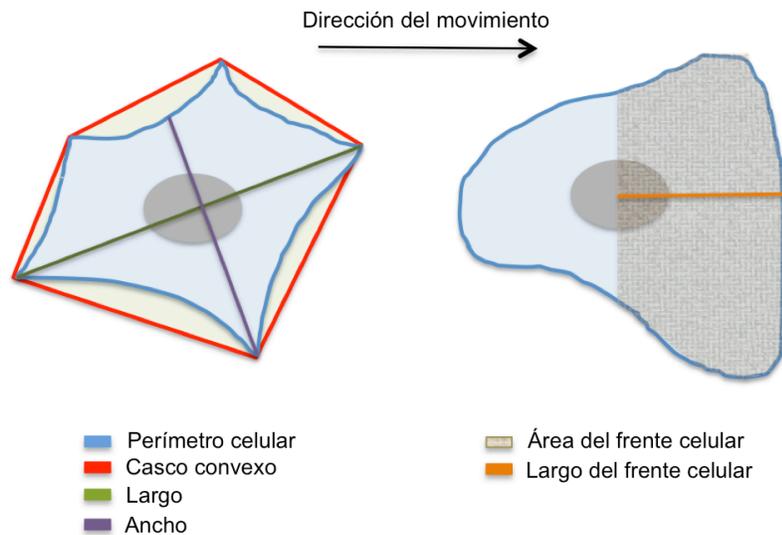


Figura 42. Parámetros morfológicos de la célula

Fraccionamiento del citoesqueleto de actina

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Las células fueron lavadas con el buffer de lavado (125 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM NaHCO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 10 mM glucosa, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 20 mM HEPES a pH 7,4) y luego se les agregó 200 μl de buffer de lisis (0,5% Tritón X-100, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA y 25 mM Tris, pH 7,5) con inhibidores de proteasas. Luego de incubar a 4°C por 10 minutos, el lisado celular fue recuperado y centrifugado, a 10.000g por 10 minutos, para separar el precipitado (descarte) y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100.000g, a 4°C, por 30 minutos, para separar el precipitado (filamentos cortos de actina) y el sobrenadante (monómeros de actina). Los filamentos cortos de actina fueron disueltos en 30 μl de buffer urea (8 M urea, 7 mM CaCl_2 y 2 mM ATP). El material que anteriormente quedó adherido a la placa (filamentos largos de actina) se lavó con el buffer de lavado y fue disuelto en 200 μl de buffer urea (Figura 43). Luego, se utilizaron iguales volúmenes de las fracciones de monómeros, filamentos cortos y filamentos largos de actina para realizar el Western blot. La cantidad de actina en cada fracción fue determinada con el anticuerpo primario anti-beta-actina y con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. El análisis de las bandas de actina se realizó con el programa Image J.

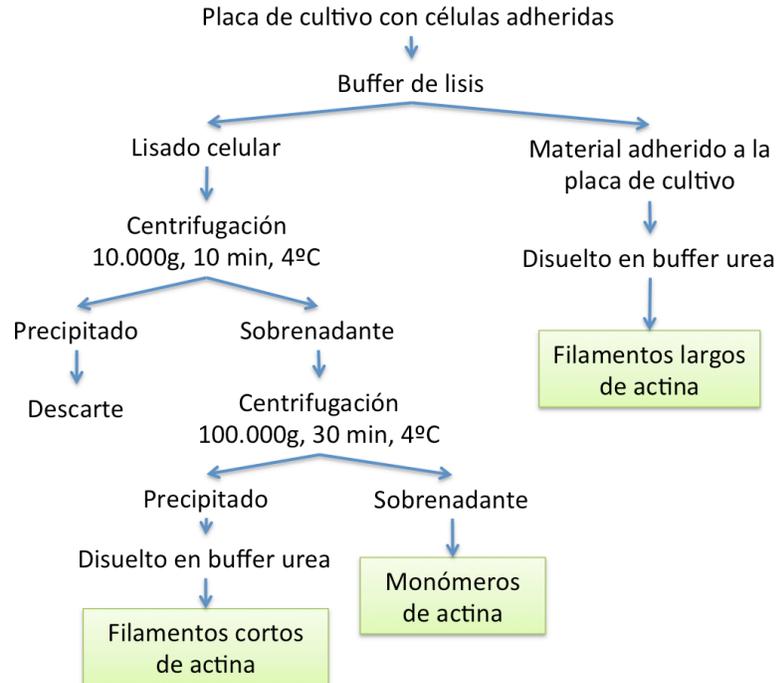


Figura 43. Esquema de trabajo para el fraccionamiento del citoesqueleto de actina

Pull down para Rac1

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μM DhL por 24 horas. Luego, las células fueron lavadas con PBS, recuperadas por medios mecánicos y lisadas con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina y aprotinina, 0,1 mM PMSF a pH 7,4). Los lisados celulares fueron clarificados por centrifugación a 10.000g, a 4°C por 30 min. Una fracción del lisado fue separada para realizar el Western blot y el resto fue incubado con partículas de agarosa-glutatión (Millipore) unidas al dominio GST-PBD, a 4°C por 1 hora. Posteriormente, las partículas fueron lavadas tres veces con buffer de lavado (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y aprotinina, 0,1 mM PMSF a pH 7,4) y centrifugadas a 2.000g, a 4°C, por 5 min. Se realizó el Western blot con la fracción del lisado total y la fracción de partículas de agarosa. Por último, la cantidad de proteína Rac1 en el lisado celular y unida a las partículas de agarosa fue detectada utilizando el anticuerpo específico anti-Rac1.

Microscopía electrónica de barrido

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio recubiertos con FN, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron arrestadas con HU y tratadas con 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego, las células fueron lavadas con buffer 0,1 M cacodilato a pH 7,4 y fijadas con 2,5% glutaraldehído en cacodilato. La deshidratación de las muestras se realizó con concentraciones crecientes de acetona. Se realizaron dos cambios de 50% y 70% acetona y tres cambios de 90% y 100% acetona, 5 minutos por cambio. El punto crítico de secado se realizó en un aparato manual Sorvall (USA) que consta de una cámara donde se colocó el último cambio de 100% acetona y las muestras. Este aparato tiene adosado un tubo de CO₂ mediante el cual se realizó el intercambio del líquido (acetona) por el gas (CO₂) mediante 10 ciclos frío/calor. Las muestras secas se adhirieron con cinta doble faz a un portamuestras metálico y fueron recubiertas con oro mediante un metalizador Balzers Union (Alemania). El análisis de las muestras se desarrolló en un microscopio electrónico de barrido LEO EVO 40-XVP, equipado con un detector de electrones secundarios y con una aceleración de voltaje de 3 kV.

Citometría de flujo

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, hasta un 80% de confluencia. Luego de la incubación en medio de cultivo sin SFB por 24 horas, las células fueron tratadas 1,5% SFB, 0 ó 20 mM HU y 0 ó 20 μ M DhL por 24 horas. Luego del tratamiento, estas fueron lavadas con PBS, desprendidas con tripsina y centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. Luego, las células fueron fijadas con 70% etanol, e incubadas con 50 mg/ml yoduro de propidio y 0,1 mg/ml RNasa. Posteriormente, el contenido de ADN fue determinado con un citómetro de flujo BD FACSAria III. Un total de 10.000 eventos por condición fueron analizados mediante el programa FlowJo 7.6.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de todas las variables se realizó utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software Inc.). Se seleccionaron como estadísticos descriptivos de cada muestra la media como medida de tendencia central, y el error estándar de la media como medida de dispersión. El nivel de significancia estadística se situó en todos los casos en $p < 0,05$. Cuando las variables siguieron una distribución normal las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante un test de T-Student. Las comparaciones entre más de dos grupos fueron analizadas mediante ANOVA de un factor y post-test de Bonferroni.

REFERENCIAS

- [1] S. Etienne-Manneville, "Polarity proteins in migration and invasion.," *Oncogene*, vol. 27, pp. 6970–6980, 2008.
- [2] C. R. Mackay, "Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, pp. 988–998, 2008.
- [3] C. Decaestecker, O. Debeir, P. Van Ham, and R. Kiss, "Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration.," *Med. Res. Rev.*, vol. 27, pp. 149–176, 2007.
- [4] M. S. Bretscher, "On the shape of migrating cells--a 'front-to-back' model.," *J. Cell Sci.*, vol. 121, pp. 2625–2628, 2008.
- [5] A. Mogilner and K. Keren, "The shape of motile cells.," *Curr. Biol.*, vol. 19, pp. R762–R771, 2009.
- [6] T. D. Pollard and G. G. Borisy, "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.," *Cell*, vol. 112, pp. 453–465, 2003.
- [7] T. D. Pollard and J. A. Cooper, "Actin, a central player in cell shape and movement.," *Science*, vol. 326, pp. 1208–1212, 2009.
- [8] C. Le Clainche and M.-F. Carrier, "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration.," *Physiol. Rev.*, vol. 88, pp. 489–513, 2008.
- [9] E. H. Kislaukis, X. Zhu, and R. H. Singer, "beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility.," *J. Cell Biol.*, vol. 136, pp. 1263–1270, 1997.
- [10] J. J. Bravo-Cordero, M. A. O. Magalhaes, R. J. Eddy, L. Hodgson, and J. Condeelis, "Functions of cofilin in cell locomotion and invasion.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 7, pp. 405–15, Jul. 2013.
- [11] M. J. Dayel and R. D. Mullins, "Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2.," *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 4, p. E91, Apr. 2004.
- [12] M. Vicente-Manzanares, D. J. Webb, and A. R. Horwitz, "Cell migration at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 21, pp. 4917–9, Nov. 2005.
- [13] M. J. Dayel, E. A. Holleran, and R. D. Mullins, "Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 14871–6, Dec. 2001.
- [14] A. J. Ridley, "Life at the leading edge.," *Cell*, vol. 145, no. 7, pp. 1012–22, Jun. 2011.
- [15] E. S. Chhabra and H. N. Higgs, "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, pp. 1110–1121, 2007.

- [16] R. Ananthakrishnan and A. Ehrlicher, "The forces behind cell movement.," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 3, pp. 303–317, 2007.
- [17] K. F. Swaney, C.-H. Huang, and P. N. Devreotes, "Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity.," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, pp. 265–289, 2010.
- [18] P. J. M. Van Haastert and P. N. Devreotes, "Chemotaxis: signalling the way forward.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, pp. 626–634, 2004.
- [19] S. Etienne-Manneville and A. Hall, "Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, pp. 67–72, 2003.
- [20] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz, "Cell migration: integrating signals from front to back.," *Science*, vol. 302, pp. 1704–1709, 2003.
- [21] R. J. Petrie, A. D. Doyle, and K. M. Yamada, "Random versus directionally persistent cell migration.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, pp. 538–549, 2009.
- [22] B. Borm, R. P. Requardt, V. Herzog, and G. Kirfel, "Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization.," *Exp. Cell Res.*, vol. 302, pp. 83–95, 2005.
- [23] J. J. Bravo-Cordero, J. Condeelis, and L. Hodgson, "Directed cell invasion and migration during metastasis," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 24, no. 2. pp. 277–283, 2012.
- [24] M. Vicente-Manzanares, C. K. Choi, and A. R. Horwitz, "Integrins in cell migration--the actin connection.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, pp. 199–206, 2009.
- [25] A. Palamidessi, E. Frittoli, M. Garré, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita, and P. P. Di Fiore, "Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration," *Cell*, vol. 134, pp. 135–147, 2008.
- [26] G. Charras and E. Paluch, "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, pp. 730–736, 2008.
- [27] R. O. Hynes, "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.," *Cell*, vol. 110, pp. 673–687, 2002.
- [28] J. A. Broussard, D. J. Webb, and I. Kaverina, "Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, pp. 85–90, 2008.
- [29] J. T. Parsons, A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz, "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, pp. 633–643, 2010.

- [30] M. Chrzanowska-Wodnicka and K. Burridge, "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions.," *J. Cell Biol.*, vol. 133, pp. 1403–1415, 1996.
- [31] S. J. Franco, M. A. Rodgers, B. J. Perrin, J. Han, D. A. Bennin, D. R. Critchley, and A. Huttenlocher, "Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, pp. 977–983, 2004.
- [32] C.-G. Koh, W.-K. Wong, and J.-L. Hoon, "Functions and Regulation of Circular Dorsal Ruffles," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32. pp. 4246–4257, 2012.
- [33] Z. Gu, E. H. Noss, V. W. Hsu, and M. B. Brenner, "Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration.," *J. Cell Biol.*, vol. 193, no. 1, pp. 61–70, 2011.
- [34] K. L. Rossman, C. J. Der, and J. Sondek, "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, pp. 167–180, 2005.
- [35] M. Raftopoulou and A. Hall, "Cell migration: Rho GTPases lead the way," *Dev Biol*, vol. 265. pp. 23–32, 2004.
- [36] "Cell Migration Gateway." [Online]. Available: <https://www.cellmigration.org/science/#patho>. [Accessed: 18-Mar-2014].
- [37] J. Peto and R. S. Houlston, "Genetics and the common cancers.," *Eur. J. Cancer*, vol. 37 Suppl 8, pp. S88–S96, 2001.
- [38] C. R. UK, "Prostate Cancer Incidence Statistics," *Cancer Research UK*, 2013. [Online]. Available: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/prostate/incidence/uk-prostate-cancer-incidence-statistics>.
- [39] A. F. Chambers, A. C. Groom, and I. C. MacDonald, "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, pp. 563–572, 2002.
- [40] I. Fidler, "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, pp. 1–6, 2003.
- [41] R. Kapoor, R. Jinka, P. G. Sistla, T. A. Raj, and G. Pande, "Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012. pp. 1–8, 2012.
- [42] J. A. Joyce and J. W. Pollard, "Microenvironmental regulation of metastasis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, pp. 239–252, 2009.
- [43] P. Friedl and K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, pp. 362–374, 2003.

- [44] L. a Shuman Moss, S. Jensen-Taubman, and W. G. Stetler-Stevenson, "Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 181, pp. 1895–9, 2012.
- [45] E. I. Deryugina and J. P. Quigley, "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 25, pp. 9–34, 2006.
- [46] H. Yamaguchi, J. Wyckoff, and J. Condeelis, "Cell migration in tumors.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, pp. 559–564, 2005.
- [47] W. G. Stetler-Stevenson, "The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis.," *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, vol. 10, pp. 383–392, x, 2001.
- [48] E. Roeb and S. Matern, "Matrix metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis - A review with focus on gastrointestinal tumors," *Z. Gastroenterol.*, vol. 39, pp. 807–813, 2001.
- [49] J.-H. Yoon, Y.-J. Choi, S.-W. Cha, and S.-G. Lee, "Anti-metastatic effects of ginsenoside Rd via inactivation of MAPK signaling and induction of focal adhesion formation.," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 3–4, pp. 284–92, Feb. 2012.
- [50] J. B. Wyckoff, Y. Wang, E. Y. Lin, J. Li, S. Goswami, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. W. Pollard, and J. Condeelis, "Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors.," *Cancer Res.*, vol. 67, pp. 2649–2656, 2007.
- [51] W. Guo and F. G. Giancotti, "Integrin signalling during tumour progression.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, pp. 816–826, 2004.
- [52] K. J. Luzzi, I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, V. L. Morris, A. F. Chambers, and A. C. Groom, "Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.," *Am. J. Pathol.*, vol. 153, pp. 865–873, 1998.
- [53] B. Psaila, D. Lyden, and I. Roberts, "Megakaryocytes, malignancy and bone marrow vascular niches.," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 10, pp. 177–88, 2012.
- [54] C. W. Wong, A. Lee, L. Shientag, J. Yu, Y. Dong, G. Kao, A. B. Al-Mehdi, E. J. Bernhard, and R. J. Muschel, "Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency.," *Cancer Res.*, vol. 61, pp. 333–338, 2001.
- [55] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation.," *Cell*, vol. 144, pp. 646–674, 2011.
- [56] J. W. Hodge, A. Ardiani, B. Farsaci, A. R. Kwilas, and S. R. Gameiro, "The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors.," *Semin. Oncol.*, vol. 39, pp. 323–39, 2012.
- [57] T. Boulikas, N. Alevizopoulos, A. Ladopoulou, M. Belimezi, A. Pantos, P. Christofis, and M. Roberts, "Anticancer therapeutics.," in *Cancer Clock*, 2007, pp. 173–218.

- [58] M. A. Jordan, D. Thrower, and L. Wilson, "Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids.," *Cancer Res.*, vol. 51, pp. 2212–22, 1991.
- [59] B. T. McGrogan, B. Gilmartin, D. N. Carney, and A. McCann, "Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1785, pp. 96–132, 2008.
- [60] O. Of, H. J. Long, B. N. Bundy, E. C. Grendys, J. A. Benda, D. S. McMeekin, J. Sorosky, D. S. Miller, L. a Eaton, and J. V Fiorica, "Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, pp. 4626–33, 2005.
- [61] G. Makin, C. Dive, and C. Dive, "Apoptosis and cancer chemotherapy," *Trends Cell Biol.*, vol. 2001, p. 0, 2001.
- [62] "Targeted Cancer Therapies - National Cancer Institute." [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>. [Accessed: 04-Mar-2014].
- [63] T. D. Palmer, W. J. Ashby, J. D. Lewis, and A. Zijlstra, "Targeting tumor cell motility to prevent metastasis," *Target Cell Mov. Tumor Cardiovasc. Dis.*, vol. 63, pp. 568–581, 2011.
- [64] D. Siu, "Natural products and their role in cancer therapy.," *Med. Oncol.*, 2010.
- [65] K. Aravindaram and N.-S. Yang, "Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy.," *Planta Med.*, vol. 76, no. 11, pp. 1103–1117, 2010.
- [66] M. Huang, J.-J. Lu, M.-Q. Huang, J.-L. Bao, X.-P. Chen, and Y.-T. Wang, "Terpenoids: natural products for cancer therapy," *Expert Opinion on Investigational Drugs*. pp. 1–18, 2012.
- [67] A. J. C. Brant, C. C. Campos, M. Zambon, J. S. L. T. Militão, V. P. Emerenciano, P. Romoff, and M. A. C. Kaplan, "Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 29. pp. 947–957, 2001.
- [68] A. Ghantous, H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N. A. Saliba, and N. Darwiche, "What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?," *Drug Discov. Today*, vol. 15, pp. 668–678, 2010.
- [69] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, and C. Wagstaff, "Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 12780–805, Jan. 2013.
- [70] E. Rodriguez, G. H. N. Towers, and J. C. Mitchell, "Biological activities of sesquiterpene lactones," *Phytochemistry*, vol. 15. pp. 1573–1580, 1976.
- [71] D. Chaturvedi, A. Goswami, P. P. Saikia, N. C. Barua, and P. G. Rao, "Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 435–454, 2010.

- [72] M. R. O. Kreuger, S. Grootjans, M. W. Biavatti, P. Vandenabeele, and K. D'Herde, "Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide.," *Anticancer Drugs*, vol. 23, pp. 883–96, 2012.
- [73] E. S. Dremina, V. S. Sharov, K. Kumar, A. Zaidi, E. K. Michaelis, and C. Schöneich, "Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA).," *Biochem. J.*, vol. 383, pp. 361–370, 2004.
- [74] J. Wang, L. Huang, J. Li, Q. Fan, Y. Long, Y. Li, and B. Zhou, "Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation.," *PLoS One*, vol. 5, p. e9582, 2010.
- [75] S. R. Meshnick, "Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity.," *Int. J. Parasitol.*, vol. 32, pp. 1655–1660, 2002.
- [76] C. Ye, A. Beeghly-Fadiel, W. Lu, J. Long, X. O. Shu, Y.-T. Gao, W. Zheng, and Q. Cai, "Two-stage case-control study of DNMT-1 and DNMT-3B gene variants and breast cancer risk.," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 121, pp. 765–769, 2010.
- [77] Y. Zhao, C. Lim, J. Li, H. Zhu, N. Ky, M. Hamza, P. Fu, X. Feng, and K. Srinivasan, "NF- κ B p65 repression by the sesquiterpene lactone, Helenalin, contributes to the induction of autophagy cell death," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, p. 93, 2012.
- [78] S. J. Jeong, T. Itokawa, M. Shibuya, M. Kuwano, M. Ono, R. Higuchi, and T. Miyamoto, "Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway," *Cancer Lett.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 129–133, 2002.
- [79] S. H. Kim, S. N. Kang, H. J. Kim, and T. S. Kim, "Potentiation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 64, no. 8, pp. 1233–1242, 2002.
- [80] C. Bocca, L. Gabriel, F. Bozzo, and A. Miglietta, "A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 147, no. 1, pp. 79–86, Jan. 2004.
- [81] A. Wyrębska, K. Gach, U. Lewandowska, K. Szewczyk, E. Hrabec, J. Modranka, R. Jakubowski, T. Janecki, J. Szymański, and A. Janecka, "Anticancer Activity of New Synthetic α -Methylene- δ -Lactones on Two Breast Cancer Cell Lines.," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2013.
- [82] C.-C. Huang, C.-P. Lo, C.-Y. Chiu, and L.-F. Shyur, "Deoxyelephantopin, a novel multifunctional agent, suppresses mammary tumour growth and lung metastasis and doubles survival time in mice.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 159, no. 4, pp. 856–71, Feb. 2010.
- [83] T. Guardia, A. O. Juarez, E. Guerreiro, J. A. Guzmán, and L. Pelzer, "Anti-inflammatory activity and effect on gastric acid secretion of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 88, pp. 195–198, 2003.

- [84] A. Penissi, I. Rudolph, T. Fogal, and R. Piezzi, "Changes in duodenal mast cells in response to dehydroleucodine.," *Cells. Tissues. Organs*, vol. 173, pp. 234–241, 2003.
- [85] O. S. Giordano, M. J. Pestchanker, E. Guerreiro, J. R. Saad, R. D. Enriz, A. M. Rodríguez, E. A. Jáuregui, J. Guzmán, A. O. María, and G. H. Wendel, "Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones.," *J. Med. Chem.*, vol. 35, pp. 2452–2458, 1992.
- [86] G. H. Wendel, A. O. M. María, J. A. Guzmán, O. Giordano, and L. E. Pelzer, "Antidiarrheal activity of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*.," *Fitoterapia*, vol. 79, pp. 1–5, 2008.
- [87] S. D. Brengio, S. A. Belmonte, E. Guerreiro, O. S. Giordano, E. O. Pietrobon, and M. A. Sosa, "The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*.," *J. Parasitol.*, vol. 86, pp. 407–412, 2000.
- [88] A. E. Vega, G. H. Wendel, A. O. M. Maria, and L. Pelzer, "Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* and dehydroleucodine against *Helicobacter pylori*.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 124, pp. 653–655, 2009.
- [89] M. Cruzado, C. Castro, D. Fernandez, L. Gomez, M. Roque, O. E. Giordano, and L. A. Lopez, "Dehydroleucodine inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in G2 phase.," *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, vol. 51, pp. 525–530, 2005.
- [90] V. V Costantino, S. F. Mansilla, J. Speroni, C. Amaya, D. Cuello-Carrión, D. R. Ciocca, H. A. Priestap, M. A. Barbieri, V. Gottifredi, and L. A. Lopez, "The sesquiterpene lactone dehydroleucodine triggers senescence and apoptosis in association with accumulation of DNA damage markers.," *PLoS One*, vol. 8, p. e53168, 2013.
- [91] A. B. Penissi, M. E. Vera, M. L. Mariani, M. I. Rudolph, J. P. Ceñal, J. C. de Rosas, T. H. Fogal, C. E. Tonn, L. S. Favier, O. S. Giordano, and R. S. Piezzi, "Novel anti-ulcer alpha,beta-unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 612, pp. 122–130, 2009.
- [92] A. Marcano, N. Villaverde, A. Galvis, L. A. Lopez, C. Stefancin, H. A. Priestap, C. E. Tonn, and M. A. Barbieri, "The effect of dehydroleucodine in adipocyte differentiation.," *European Journal of Pharmacology*, vol. 671, pp. 18–25, 2011.
- [93] M. G. Repetto and S. F. Llesuy, "Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 35, pp. 523–534, 2002.
- [94] M. G. Repetto and A. Boveris, "Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 10, pp. 615–623, 2010.
- [95] G. H. Wendel, A. O. María, C. F. Aguilar, and L. E. Pelzer, "Effect of dehydroleucodine on intestinal transit: structural basis of the interaction with the $\alpha(2)$ -adrenergic receptor.," *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, pp. 981–986, 2011.

- [96] R. A. Mortara, I. Vega, C. Tonn, P. Barrera, U. Kemmerling, M. Nieto, M. A. Sosa, E. Lozano, and R. Salinas, "Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*," *Parasitology International*, vol. 61, pp. 628–633, 2012.
- [97] P. E. Ordóñez, C. L. Quave, W. F. Reynolds, K. I. Varughese, B. Berry, P. J. Breen, O. Malagón, M. S. Smeltzer, and C. M. Compadre, "Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, pp. 1055–1059, 2011.
- [98] M. E. López, O. S. Giordano, and L. A. López, "Sesquiterpene lactone dehydroleucodine selectively induces transient arrest in G2 in *Allium cepa* root meristematic cells.," *Protoplasma*, vol. 219, pp. 82–88, 2002.
- [99] L. M. Polo, C. M. Castro, M. C. Cruzado, C. J. G. Collino, F. D. Cuello-Carrión, D. R. Ciocca, O. S. Giordano, M. Ferrari, and L. A. López, "11,13-dihydro-dehydroleucodine, a derivative of dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 556, pp. 19–26, 2007.
- [100] Y. T. Zeng, S. Z. Huang, Z. R. Ren, Z. H. Lu, F. Y. Zeng, A. N. Schechter, and G. P. Rodgers, "Hydroxyurea therapy in beta-thalassaemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced beta-globin synthesis.," *British journal of haematology*, vol. 90, pp. 557–563, 1995.
- [101] R. Sarkar, E. G. Meinberg, J. C. Stanley, D. Gordon, and R. C. Webb, "Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells," *Circ Res*, vol. 78, pp. 225–230, 1996.
- [102] I. L. Zungu, A. B. Mbene, D. H. Hawkins Evans, N. N. Houreld, and H. Abrahamse, "Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea.," *Lasers Med. Sci.*, vol. 24, pp. 144–150, 2009.
- [103] J. Timson, "Hydroxyurea.," *Mutat. Res.*, vol. 32, pp. 115–132, 1975.
- [104] T. Ashihara and R. Baserga, "[20] Cell synchronization," *Methods Enzymol.*, vol. 58, pp. 248–262, 1979.
- [105] P. S. Walmod, R. Hartmann-Petersen, S. Prag, E. L. Lepekkin, C. Röpke, V. Berezin, and E. Bock, "Cell-cycle-dependent regulation of cell motility and determination of the role of Rac1.," *Exp. Cell Res.*, vol. 295, pp. 407–420, 2004.
- [106] Z. Lou and J. Chen, "Cellular senescence and DNA repair.," *Exp Cell Res*, vol. 312, pp. 2641–2646, 2006.
- [107] T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, "The essence of senescence.," *Genes Dev.*, vol. 24, pp. 2463–2479, 2010.
- [108] M. V Blagosklonny, "Cell cycle arrest is not senescence," *Aging (Albany. NY).*, vol. 3, pp. 94–101, 2011.

- [109] V. Huang, X. Lu, Y. Jiang, and J. Y. J. Wang, "Effect of hydroxyurea on the promoter occupancy profiles of tumor suppressor p53 and p73.," *BMC Biol.*, vol. 7, p. 35, 2009.
- [110] S. E. Pfeiffer and L. J. Tolmach, "Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea," *Cancer Res*, vol. 27, pp. 124–129, 1967.
- [111] L. Heinemann, G. R. Simpson, N. E. Annels, R. Vile, A. Melcher, R. Prestwich, K. J. Harrington, and H. S. Pandha, "The effect of cell cycle synchronization on tumor sensitivity to reovirus oncolysis.," *Mol. Ther.*, vol. 18, pp. 2085–2093, 2010.
- [112] A. Eastman, R. Montano, D. Parry, K. M. Garner, and I. Chung, "Preclinical Development of the Novel Chk1 Inhibitor SCH900776 in Combination with DNA-Damaging Agents and Antimetabolites," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11, pp. 427–438, 2012.
- [113] Z. Werb, V. M. Weaver, and P. Lu, "The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, pp. i1–i1, 2012.
- [114] R. O. Hynes, "The extracellular matrix: not just pretty fibrils.," *Science*, vol. 326, pp. 1216–1219, 2009.
- [115] J. E. Schwarzbauer and D. W. DeSimone, "Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 7, Jul. 2011.
- [116] J. Sottile and D. C. Hocking, "Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 10, pp. 3546–59, Oct. 2002.
- [117] K. Sugihara, T. Saito, M. Okadome, K. Sonoda, H. Kobayashi, T. Kamura, N. Tsukamoto, and H. Nakano, "The promotion of invasion through the basement membrane of cervical carcinoma cells by fibronectin as a chemoattractant.," *Cancer Lett.*, vol. 79, no. 2, pp. 167–173, 1994.
- [118] F. Schaffner, A. M. Ray, and M. Dontenwill, "Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors.," *Cancers (Basel)*, vol. 5, no. 1, pp. 27–47, Jan. 2013.
- [119] S. K. Akiyama, K. Olden, and K. M. Yamada, "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 14, pp. 173–189, 1995.
- [120] C. E. Morris and U. Homann, "Cell surface area regulation and membrane tension.," *J. Membr. Biol.*, vol. 179, no. 2, pp. 79–102, Jan. 2001.
- [121] D. Raucher and M. P. Sheetz, "Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension.," *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 1, pp. 127–36, Jan. 2000.
- [122] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K. M. Yamada, and B. G. Correspondence, "Transmembrane extracellular matrix– cytoskeleton crosstalk," *Nat. Rev. |MOLECULAR CELL Biol.*, vol. 2, pp. 793–805, 2001.

- [123] M. Nagano, D. Hoshino, N. Koshikawa, T. Akizawa, and M. Seiki, "Turnover of focal adhesions and cancer cell migration.," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2012, p. 310616, 2012.
- [124] W. H. Ziegler, R. C. Liddington, and D. R. Critchley, "The structure and regulation of vinculin.," *Trends Cell Biol.*, vol. 16, pp. 453–460, 2006.
- [125] J. D. Humphries, P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M. J. Humphries, and C. Ballestrem, "Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin.," *J. Cell Biol.*, vol. 179, pp. 1043–1057, 2007.
- [126] W. H. Goldmann, V. Auernheimer, I. Thievensen, and B. Fabry, "Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion.," *Cell Biol. Int.*, vol. 37, pp. 397–405, 2013.
- [127] S. Alexander and P. Friedl, "Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity," *Cell*, vol. 147. pp. 992–1009, 2011.
- [128] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, pp. 4195–4200, 2010.
- [129] P. Roberts and C. Der, "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.," *Oncogene*, vol. 26. pp. 3291–3310, 2007.
- [130] a S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch, "MAP kinase signalling pathways in cancer.," *Oncogene*, vol. 26, pp. 3279–90, 2007.
- [131] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. T. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli, and R. A. Franklin, "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, pp. 1263–1284, 2007.
- [132] C. Huang, K. Jacobson, and M. D. Schaller, "MAP kinases and cell migration.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 20, pp. 4619–4628, 2004.
- [133] B. Kumar, S. Koul, J. Petersen, L. Khandrika, J. S. Hwa, R. B. Meacham, S. Wilson, and H. K. Koul, "p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity.," *Cancer Res.*, vol. 70, pp. 832–841, 2010.
- [134] E. Pozo-Guisado, A. Alvarez-Barrientos, S. Mulero-Navarro, B. Santiago-Josefat, and P. M. Fernandez-Salguero, "The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 64, pp. 1375–1386, 2002.
- [135] C. H. Yang, J. Yue, S. R. Pfeffer, C. R. Handorf, and L. M. Pfeffer, "MicroRNA miR-21 Regulates the Metastatic Behavior of B16 Melanoma Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286. pp. 39172–39178, 2011.

- [136] P. Friedl and D. Gilmour, "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, pp. 445–457, 2009.
- [137] Y.-J. Lee and P. C. Keng, "Studying the effects of actin cytoskeletal destabilization on cell cycle by cofilin overexpression.," *Mol. Biotechnol.*, vol. 31, pp. 1–10, 2005.
- [138] R. H. Gavin, *Cytoskeleton Methods and Protocols*, vol. 161. New Jersey: Humana Press, 2000.
- [139] V. Berezin, G. Skladchikova, and E. Bock, "Evaluation of cell morphology by video recording and computer-assisted image analysis.," *Cytometry*, vol. 27, no. 2, pp. 106–16, Feb. 1997.
- [140] A. Jemal, E. Ward, and M. Thun, "Declining death rates reflect progress against cancer.," *PLoS One*, vol. 5, p. e9584, 2010.
- [141] R. A. Weinberg and S. Valastyan, "Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms," *Cell*, vol. 147. pp. 275–292, 2011.
- [142] E. Sahai, "Illuminating the metastatic process.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, pp. 737–749, 2007.
- [143] S. Nobili, D. Lippi, E. Witort, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini, and S. Capaccioli, "Natural compounds for cancer treatment and prevention.," *Pharmacol. Res.*, vol. 59, pp. 365–378, 2009.
- [144] and A. Z. Trenis D. Palmer*, William J. Ashby*, John D. Lewis^, "Targeting tumor cell motility to prevent metastasis," *Adv Drug Deliv Rev.*, vol. 63, pp. 568–581, 2012.
- [145] A. R. M. R. Amin, O. Kucuk, F. R. Khuri, and D. M. Shin, "Perspectives for cancer prevention with natural compounds.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, pp. 2712–2725, 2009.
- [146] M. Dicato, M. Schumacher, M. Diederich, W. R. Sawadogo, and M.-H. Teiten, "Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy," *Biochemical Pharmacology*, vol. 84. pp. 1225–1240, 2012.
- [147] A. O. María, M. Repetto, S. Llesuy, O. Giordano, J. Guzmán, and E. Guerreiro, "Antioxidant activity of Artemisia douglasiana besser extract and dehydroleucodine.," *Phytother. Res.*, vol. 14, pp. 558–560, 2000.
- [148] I. H. Krakoff, N. C. Brown, and P. Reichard, "Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea.," *Cancer Res.*, vol. 28, pp. 1559–1565, 1968.
- [149] G. Pedrali-Noy, S. Spadari, A. Miller-Faurès, A. O. Miller, J. Kruppa, and G. Koch, "Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, pp. 377–87, 2009.
- [150] J. P. Alao, S. C. Gamble, A. V Stavropoulou, K. M. Pomeranz, E. W.-F. Lam, R. C. Coombes, and D. M. Vigushin, "The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines.," *Mol. Cancer*, vol. 5, p. 7, 2006.

- [151] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence.," *J. Cell Biol.*, vol. 192, pp. 547–556, 2011.
- [152] W. H. Goldmann and D. E. Ingber, "Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 290, pp. 749–755, 2002.
- [153] S. W. Craig and H. Chen, "Lamellipodia protrusion: moving interactions of vinculin and Arp2/3.," *Curr. Biol.*, vol. 13, pp. R236–R238, 2003.
- [154] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, pp. 15–33, 2009.
- [155] H. J. Lee, H. Jung, J. Kwon, H. Li, D. Y. Lee, H. J. Lim, M. R. Kim, D. C. Moon, and J. H. Ryu, "A germacranolide sesquiterpene lactone suppressed inducible nitric oxide synthase by downregulating NF-kappa B activity," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 89, pp. 232–237, 2011.
- [156] J. Chun, R. J. Choi, S. Khan, D.-S. Lee, Y.-C. Kim, Y.-J. Nam, D.-U. Lee, and Y. S. Kim, "Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by down-regulating NF-κB, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells," *International Immunopharmacology*, vol. 14, pp. 375–383, 2012.
- [157] Y. Hu, Y. Zong, D. Feng, Z. Jin, H. Jiang, and J. Peng, "[p38/ERK signal pathways regulating the expression of type I collagen and activity of MMP-2 in TGF-beta1-stimulated HLF-02 cells].," *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, vol. 24, no. 2, pp. 77–80, Feb. 2006.
- [158] W. Deng, H. Sui, Q. Wang, N. He, C. Duan, L. Han, Q. Li, M. Lu, and S. Lv, "A Chinese herbal formula, Yi-Qi-Fu-Sheng, inhibits migration/invasion of colorectal cancer by down-regulating MMP-2/9 via inhibiting the activation of ERK/MAPK signaling pathways," *BMC Complement Altern Med*, vol. 13, p. 65, 2013.
- [159] Y. K. Choi, S.-G. Cho, S.-M. Woo, Y. J. Yun, J. Jo, W. Kim, Y. C. Shin, and S.-G. Ko, "Saussurea lappa Clarke-Derived Costunolide Prevents TNF α -Induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion by Inhibiting NF- κ B Activity.," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2013, p. 936257, 2013.
- [160] H. Ichikawa, M. S. Nair, Y. Takada, D. B. A. Sheeja, M. A. S. Kumar, O. V Oommen, and B. B. Aggarwal, "Isodeoxyelephantopin, a novel sesquiterpene lactone, potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor-kappaB (nf-kappaB) activation and nf-kappaB-regulated gene expression.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, pp. 5910–5918, 2006.
- [161] C. M. Waterman-Storer, R. A. Worthylake, B. P. Liu, K. Burridge, and E. D. Salmon, "Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, pp. 45–50, 1999.
- [162] A. Ganguly, H. Yang, R. Sharma, K. D. Patel, and F. Cabral, "The role of microtubules and their dynamics in cell migration.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 52, pp. 43359–69, Dec. 2012.

- [163] K. Kamath, G. Smiyun, L. Wilson, and M. A. Jordan, "Mechanisms of inhibition of endothelial cell migration by taxanes.," *Cytoskeleton (Hoboken)*, Oct. 2013.
- [164] D. Raucher and M. P. Sheetz, "Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension.," *J. Cell Biol.*, vol. 148, pp. 127–136, 2000.
- [165] E. Meiler, E. Nieto-Pelegrín, and N. Martínez-Quiles, "Cortactin Tyrosine Phosphorylation Promotes Its Deacetylation and Inhibits Cell Spreading," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3. p. e33662, 2012.
- [166] T. Watanabe, J. Noritake, and K. Kaibuchi, "Regulation of microtubules in cell migration.," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 76–83, 2005.
- [167] O. A. Chernobel'skaia, I. B. Alieva, and I. A. Vorob'ev, "Radial-organized microtubules provide maintenance of the cell shape and more effective intercellular transport than in the case of free microtubules," *Tsitologija*, vol. 51, no. 6, pp. 475–483, 2009.
- [168] A. J. Ridley, "Membrane ruffling and signal transduction.," *Bioessays*, vol. 16, no. 5, pp. 321–327, 1994.
- [169] W. G. Jiang, S. Hiscox, S. K. Singhrao, T. Nakamura, M. C. Puntis, and M. B. Hallett, "Inhibition of HGF/SF-induced membrane ruffling and cell motility by transient elevation of cytosolic free Ca²⁺.," *Exp. Cell Res.*, vol. 220, no. 2, pp. 424–433, 1995.
- [170] W. G. Jiang, "Membrane ruffling of cancer cells: a parameter of tumour cell motility and invasion.," *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 21, pp. 307–309, 1995.
- [171] M. Parri and P. Chiarugi, "Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control.," *Cell Commun. Signal.*, vol. 8, p. 23, 2010.
- [172] H. Jin and J. Y. J. Wang, "Abl tyrosine kinase promotes dorsal ruffles but restrains lamellipodia extension during cell spreading on fibronectin.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 10, pp. 4143–4154, 2007.
- [173] J. Lin and R. Arlinghaus, "Activated c-Abl tyrosine kinase in malignant solid tumors.," *Oncogene*, vol. 27, no. 32, pp. 4385–4391, 2008.
- [174] M. A. Del Pozo, I. Navarro-Lérida, S. Sánchez-Perales, Y. Zheng, C. Rentero, M. Calvo, and C. Enrich, "A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization," *The EMBO Journal*, vol. 31, no. 3. pp. 534–551, 2011.
- [175] A. Gastonguay, T. Berg, A. D. Hauser, N. Schuld, E. Lorimer, and C. L. Williams, "The role of Rac1 in the regulation of NF- κ B activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 13, no. 8, pp. 647–56, 2012.
- [176] K. Rea, M. Sensi, A. Anichini, S. Canevari, and A. Tomassetti, "EGFR/MEK/ERK/CDK5-dependent integrin-independent FAK phosphorylated on serine 732 contributes to microtubule depolymerization and mitosis in tumor cells.," *Cell Death Dis.*, vol. 4, p. e815, Jan. 2013.

- [177] H. Sawai, Y. Okada, H. Funahashi, Y. Matsuo, H. Takahashi, H. Takeyama, and T. Manabe, "Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation.," *Mol. Cancer*, vol. 4, p. 37, Jan. 2005.
- [178] M. Gao, X. Liu, H. Sun, H. Ren, L. Wang, and Y. Shen, "[Study on FAK regulation of migration of vascular endothelial cells depending upon focal adhesion proteins].," *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, vol. 30, no. 3, pp. 567–71, Jun. 2013.
- [179] C. T. Mierke, "The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells.," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 53, pp. 115–126, 2009.
- [180] W. Wang, Y. Liu, and K. Liao, "Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility," *BMC Cell Biology*, vol. 12, no. 1. p. 49, 2011.
- [181] N. Mo, Z.-Q. Li, J. Li, and Y.-D. Cao, "Curcumin inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells.," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 13, no. 11, pp. 5709–14, Jan. 2012.
- [182] S. M. MacGrath and A. J. Koleske, "Cortactin in cell migration and cancer at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 7, pp. 1621–6, Apr. 2012.
- [183] L. C. Kelley, K. E. Hayes, A. G. Ammer, K. H. Martin, and S. A. Weed, "Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence.," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e13847, 2010.
- [184] J. S. Tushir and C. D'Souza-Schorey, "ARF6-dependent activation of ERK and Rac1 modulates epithelial tubule development.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 7, pp. 1806–19, Apr. 2007.
- [185] S. A. Weed, Y. Du, and J. T. Parsons, "Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1.," *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 1, pp. 2433–43, Aug. 1998.
- [186] S. Majumder, M. P. Sowden, S. A. Gerber, T. Thomas, C. K. Christie, A. Mohan, G. Yin, E. M. Lord, B. C. Berk, and J. Pang, "G-Protein-Coupled Receptor-2-Interacting Protein-1 Is Required for Endothelial Cell Directional Migration and Tumor Angiogenesis via Cortactin-Dependent Lamellipodia Formation.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Nov. 2013.
- [187] I. Pleines, S. Dütting, D. Cherpokova, A. Eckly, I. Meyer, M. Morowski, G. Krohne, H. Schulze, C. Gachet, N. Debili, C. Brakebusch, and B. Nieswandt, "Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42.," *Blood*, vol. 122, no. 18, pp. 3178–87, Oct. 2013.
- [188] Y. Nishimura, K. Applegate, M. W. Davidson, G. Danuser, and C. M. Waterman, "Automated screening of microtubule growth dynamics identifies MARK2 as a regulator of leading edge microtubules downstream of Rac1 in migrating cells.," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e41413, Jan. 2012.

- [189] C.-Z. Wang, C.-S. Yuan, and T. Calway, "Herbal Medicines as Adjuvants for Cancer Therapeutics," *The American Journal of Chinese Medicine*, vol. 40, no. 04. pp. 657–669, 2012.
- [190] E. J. Park and J. M. Pezzuto, "Botanicals in cancer chemoprevention.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 21, no. 3–4, pp. 231–255, 2002.
- [191] H. A. Priestap, K. A. Abboud, A. E. Velandia, L. A. Lopez, and M. A. Barbieri, "Dehydro-leucodin: a guaiane-type sesquiterpene lactone.," *Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online*, vol. 67, no. Pt 12, p. o3470, Dec. 2011.
- [192] E. A. Lepekhin, P. S. Walmod, A. Berezin, V. Berezin, and E. Bock, "Evaluation of cell morphology.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 161, pp. 85–100, Jan. 2001.