

EFECTOS DEL MAQUI (*ARISTOTELIA CHILENSIS*) SOBRE LA BIOGÉNESIS LISOSOMAL EN CÉLULAS H4 DE NEUROGLIOMA HUMANO*

EFFECTS OF THE MAQUI (*ARISTOTELIA CHILENSIS*) ON LYSOSOMAL BIOGENESIS IN H4 HUMAN NEUROGLIOMA CELLS

Camila Urrutia • Evelyn Vergara
 Profesor Guía: Carolina Leiva
 Investigadora: Dra. Patricia Burgos
 Asesores Científicos: Hianara Bustamante • Cristóbal Cerda
 Liceo Bicentenario de Excelencia Altamira • Panguipulli
 carolina.leiva.y@gmail.com

Resumen

El maqui (*Aristotelia chilensis*) es una especie nativa de Chile que produce unas bayas pequeñas con compuestos polifenólicos que han demostrado poseer efectos antioxidantes *in vitro*. Los antioxidantes tienen la facultad de retardar o prevenir el estrés oxidativo de las células. Los lisosomas son organelos que contienen enzimas hidrolíticas claves en la digestión del material intracelular, cuya disfunción se asocia al cáncer, neurodegeneración y envejecimiento, entre otras. Este proyecto se centra en estudiar los efectos del maqui sobre la biogénesis lisosomal en células H4 de neuroglioma humano. Mediante microscopía de fluorescencia se evaluó la distribución subcelular de la proteína lisosomal LAMP1, proteína marcadora de los lisosomas, expuesta a las siguientes concentraciones de extracto de Maqui: 30 mg/ml, 40 mg/ml y 50 mg/ml. A mayor dosis de extracto de maqui, se observa un incremento en la marca de LAMP1 en células H4 de neuroglioma humano. Estos resultados sugieren que el extracto de maqui puede ser un potencial inductor de la biogénesis lisosomal en células H4.

Palabras claves: Biogénesis lisosomal; Células H4; Lisosomas; Maqui.

Abstract

The maqui (*Aristotelia chilensis*) is a species native to Chile that produces small berries with polyphenolic compounds that have been shown to have antioxidant effects *in vitro*. Antioxidants can slow or prevent oxidative stress in cells. Lysosomes are organelles that contain key hydrolytic enzymes in the digestion of intracellular material, whose dysfunction is associated with cancer, neurodegeneration, and aging, among others. This project focuses on studying the effects of maqui on lysosomal biogenesis in H4 human neuroglioma cells. Fluorescence microscopy was used to evaluate the subcellular distribution of the lysosomal protein LAMP1 -a lysosome marker protein- exposed to the following concentrations of Maqui extract: 30, 40 and 50 mg/ml, respectively. At higher doses of maqui extract, an increase in the LAMP1 label was observed in H4 human neuroglioma cells. These results suggest that maqui extract may be a potential inducer of lysosomal biogenesis in H4 human neuroglioma cells.

Keywords: Lysosomal biogenesis; H4 Human neuroglioma cells; Lysosomes; Maqui.

El proyecto participó en:

- * Primer lugar en IV Feria Provincial de Investigación Científica (Lanco).
- * XIII Congreso Regional (Valdivia).
- * XXX Congreso de la Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas).



Introducción

Todas las células eucariotas contienen lisosomas que son organelos intracelulares, cuya función principal es la digestión de material intracelular o proveniente del medio extracelular (Alberts, 2012). Específicas vacuolas autofágicas tienen la capacidad de englobar partículas del citosol, luego se fusionan con membranas lisosomales y su contenido finalmente es degradado por las enzimas hidrolíticas contenidas en los lisosomas por un mecanismo denominado autofagia. La autofagia es una ruta degradativa de proteínas, e incluso para los organelos que deben renovarse. En la célula hay un nivel basal de autofagia y es clave para mantener el “control de calidad” intracelular participando en la renovación de materias primas que la célula usa para la síntesis de nuevas moléculas, lo que es importante en muchos procesos del desarrollo.

Una vez culminado el proceso de autofagia, la biogénesis de nuevos lisosomas y la reposición de componentes sintetizados de nuevo (Jimenez, 2003). Tanto los componentes solubles como los de membrana de los lisosomas son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, transportados al aparato de Golgi, e incorporados en lisosomas en formación. Las disfunciones en estos procesos celulares se asocian al cáncer, neurodegeneración y envejecimiento, entre otras. Recientes estudios revelan que el resveratrol, un antioxidante que se encuentra en uvas rojas, tiene un efecto potenciador de la autofagia (Dong y Wang, 2016). Es por esto importante conocer otros potenciadores naturales de la autofagia.

El maqui (*Aristotelia chilensis*) es una especie nativa del sur de Chile que produce unas bayas pequeñas que se recolectan principalmente de individuos silvestres. En sus frutos se ha detectado la presencia de flavonoides con capacidad antioxidativa (Valdebenito *et al.*, 2006). Medicinalmente, se ha empleado por su capacidad analgésica, antiinflamatoria y antibacteriana.

Estas bayas son comestibles, y además de tener funciones nutricionales y energéticas poseen cualidades benéficas para la prevención de muchas dolencias (Alonso, 2012). Sin embargo hasta el momento no hay estudios de su efecto a nivel de organelos intracelulares. Este proyecto evalúa el efecto del maqui sobre la biogénesis lisosomal, dado que este es el organelo que por excelencia mantiene el control de calidad en las células.

De acuerdo a los resultados preliminares, se sugiere que el maqui se puede emplear como nutracéutico y potenciador de la maquinaria degradativa de la célula. Este hallazgo abre una línea de investigación enfocada al estudio del maqui en patologías y envejecimiento.

Hipótesis

El extracto de maqui (*Aristotelia chilensis*) potencia la ruta degradativa lisosomal en células H4 de neuroglioma humano.



Objetivo General

Comprobar los efectos de maqui (*Aristotelia chilensis*) sobre la biogénesis lisosomal en células H4 de neuroglioma humano.

Objetivos Específicos

Preparar un extracto acuoso de maqui (*Aristotelia chilensis*) en diferentes concentraciones.

Incubar células H4 de neuroglioma con diferentes concentraciones del extracto acuoso de maqui.

Analizar por microscopía de fluorescencia la distribución de LAMP1 como marcador lisosomal.

Metodología

Tratamiento de células H4 de neuroglioma humano

Las líneas celulares H4 fueron obtenidas de ATCC (número HTB-148 TM). Estas células son adherentes, de morfología epitelial, derivadas de neurogliomas de cerebro humano.

1. En DMSO se disolvió el extracto de maqui, el cual fue obtenido del Instituto de Farmacología y Morfofisiología de la Universidad Austral de Chile. El extracto de Maqui se encuentra dentro de un tubo ámbar, para cautelar la exposición de luz que recibiera la sustancia.
2. Las células se sembraron sobre pocillos de placa de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de 12 mm de diámetro y fueron mantenidas con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % v/v SFB (previamente inactivado por calor y filtrado) y Penicilina y Estreptomicina 1X (para evitar la contaminación de microorganismos); a 37 °C con atmósfera húmeda y 5% de CO2 hasta alcanzar una densidad que permita observar con claridad las células.
3. Para observar el estado de las células en cultivo se ocupó un microscopio óptico invertido.
4. Una vez que se alcanzó la densidad celular deseada, se realizó el siguiente tratamiento a las células por separado durante 16 horas.

- Maqui 30 mg/ml (en DMSO).
- Maqui 40 mg/ml (en DMSO).
- Maqui 50 mg/ml (en DMSO).
- Control DMSO (vehículo).

Inmunofluorescencia Indirecta

1. Se centrifugó la solución de PFA 4% a 3000 g por 10 min a temperatura ambiente. Previamente se equilibran las masas de las soluciones a centrifugar.
2. Los pocillos con células se lavan 3 veces con 1 mL de PBS-CMA para quitar el medio de cultivo a las células.
3. Luego se retira todo el volumen de PBS CMA y se agrega 1 mL PFA 4% para fijar las células y se incuba 30 min a temperatura ambiente, protegido de la luz.
4. Se lavan los pocillos con células, se lavan 3 veces con 1 mL de PBS-CMA para quitar el PFA.
5. Sobre una superficie hidrofóbica (Parafilm) se deja una gota de 20 µL de anticuerpo anti Lamp1 hecho en ratón de una dilución 1 µL de anticuerpo en 3000 µL de buffer saponina; por cada cubre objeto con células.
6. Los cubre objeto se dejan sobre la gota de anticuerpo, con las células orientadas hacia la gota y se incuba 40 minutos a 37°C en cámara húmeda.
7. Posterior a la incubación del anticuerpo, los cubre objetos se dejan en coplin de porcelana contenido en recipiente plástico con 100 mL de PBS-A y se lavan por 5 min.
8. Nuevamente sobre una superficie hidrofóbica, se agrega una gota de 20 µL de un segundo anticuerpo que reconoce al primero (Anti Lamp1) Anti-Ratón Alexa 594 (que se observa en rojo bajo microscopio de epifluorescencia) en una dilución 1 µL de anticuerpo en 1000 µL de buffer saponina; por cada cubre objeto con células.
9. Los cubre objeto se dejan sobre la gota de anticuerpo, con las células orientadas hacia la gota y se incuba 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
10. Posterior a la incubación del anticuerpo, los cubre objetos se dejan en coplin de porcelana contenido en un recipiente plástico con 100 ml de PBS-A y se lavan por 5 min.



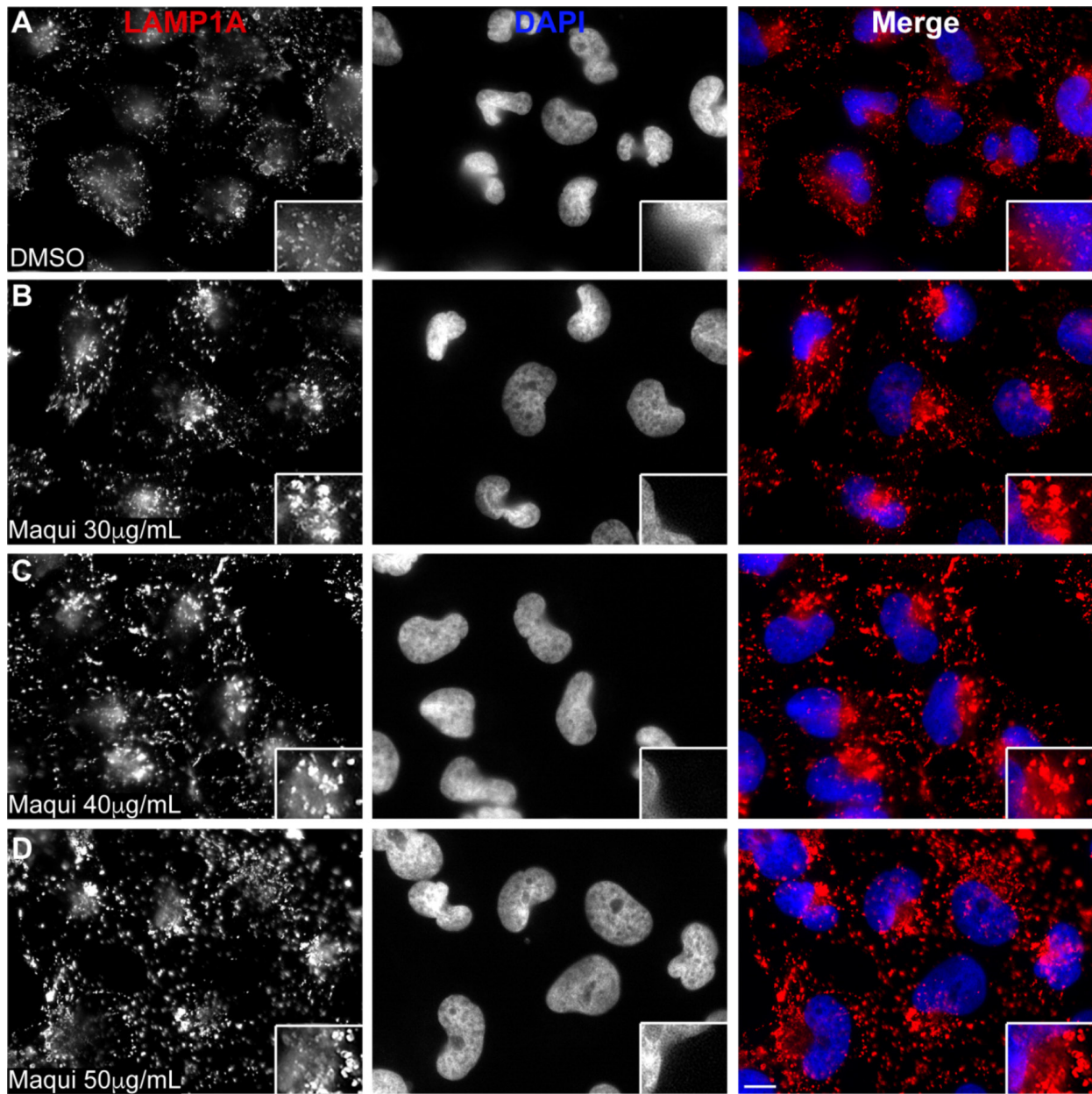


Figura N°1. Fluorescencia de cultivo de células H4 de neuroglioma humano, con 30ug/ml, 40ug/ml y 50ug/ml de concentración de maqui, mostrando la distribución de LAMP1 (rojo) como marcador lisosomal, además del núcleo (azul) marcado con DAPI. Se observa que la distribución de la marca es perinuclear.

11. Sobre una superficie hidrofóbica se agrega una gota de 20 μL de DAPI de una dilución 1 μL en 20.000 μL de PBS-CM.
12. Los cubre objeto se dejan sobre la gota de DAPI, con las células orientadas hacia la gota y se incuban 10 minutos a 37°C en cámara húmeda.
13. Los cubre objetos se dejan en coplin de porcelana contenido en recipiente plástico con 100 mL de PBS-A y se lavan por 5 min.
14. Sobre un porta objeto se agregan 12 μL de medio de montaje Fluoromont y los cubre objetos se dejan sobre la gota de Fluoromont, con las células orientadas hacia la gota. Se deja secando los porta objetos con los cubre objetos en estufa a 67 °C por 15 min.



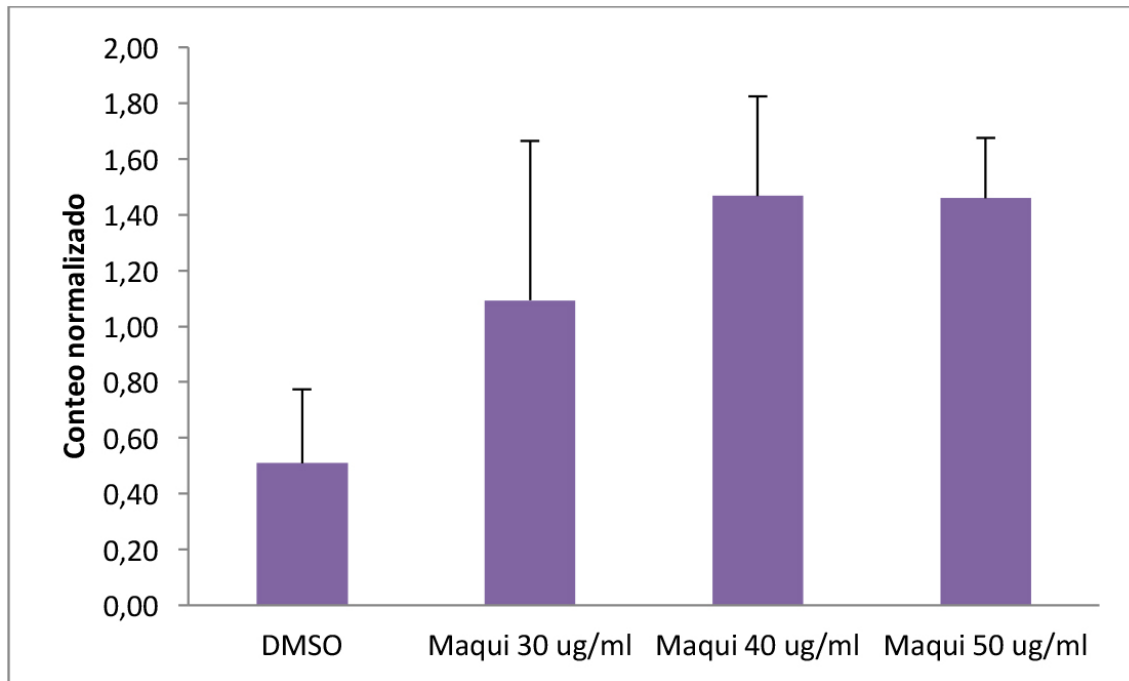


Figura N° 2. Cuantificación de la Inmunofluorescencia del cultivo de células H4 de neuroglioma humano, con 30ug/ml, 40ug/ml y 50ug/ml de concentración de maqui. Se graficaron los resultados obtenidos por cada célula observada y normalizada según el área.

Cuantificación de inmunofluorescencia LAMP1A

1. De las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia se hizo un análisis de imagen utilizando el software Icy "Open source community platform for bioimage" versión 1.9.1.0.
2. Se utilizó como detector la opción "Detected bright spot over dark background", además se utilizó una sensibilidad del 100% y una escala de detección de 7 pixeles sobre la imagen.
3. Se hizo el conteo en cada célula por separado utilizando la marca nuclear como guía.
4. Los resultados fueron trasladados a Microsoft Office Excel 2010 donde se graficaron los resultados.

Resultados

La metodología anteriormente mencionada se logró obtener imágenes de inmunofluorescencia ilustradas en la Figura N°1.

En el control de DMSO podemos ver que no existe cambio en la morfología celular en comparación con las muestras tratadas. En la concentración de 30 ug/ml

se muestran los lisosomas distribuidos de manera perinuclear, en la concentración de 40ug/ml se puede evidenciar un claro aumento de la marca de LAMP1 y finalmente en la concentración de 50 ug/ml el marcador lisosomal se encuentra disperso por toda la célula. Si bien los resultados del ensayo de inmunofluorescencia se asocian con un aumento de la marca lisosomal LAMP1, no se puede descartar que el aumento de la fluorescencia sea debido a algún producto de maqui que sea fluorescente.

En el análisis de imagen, se realizó un conteo de cada marca superior a 7 pixeles dentro de una celular y se normalizó según el tamaño de dicha célula. Podemos observar un incremento del conteo en relación a las concentraciones de maqui trabajadas en comparación con DMSO, este incremento no es estadísticamente significativo dado que es solo una corrida experimental analizada. Sin embargo, si comparamos el conteo normalizado entre la muestra de maqui 50 ug/mL con el DMSO podemos observar un importante incremento del marcador lisosomal que indicaría que existe un aumento de este organelo en presencia de maqui. El resultado anterior es un nuevo hallazgo ya que no existían investigaciones anteriores sobre los efectos del maqui en lisosomas de células H4.



Conclusiones

Se observó que las células tratadas con las tres concentraciones del extracto de maqui por separado presentaron un aumento en el marcador lisosomal LAMP1. La muestra que contenía 50 mg/ml fue la que mayor cantidad de marcador lisosomal evidenció. Aun así creemos necesario evaluar el efecto del Maqui sobre la viabilidad de la célula.

Proyecciones

Probar que la biogénesis lisosomal potenciada por el maqui tiene un efecto en la autofagia en células H4.

Realizar estudios similares a éste con líneas celulares de cáncer, y analizar el estado de sus lisosomas en presencia de extracto de maqui.

Comprobar mediante repeticiones del experimento que no existe ningún cambio morfológico en las células H4.

Realizar cuantificación del número de lisosomas por célula, y/o intensidad del marcador LAMP1 mediante densitometría y/o cuantificación computarizada.

Bibliografía

Alberts B. 2012. Biología Molecular de la Célula. Omega Ed, Barcelona, España.

Alonso JR 2012. Maqui (*Aristotelia chilensis*): Un nutraceutico chileno de relevancia medicinal. Rev Farmacol Chile 5: 95-100.

Dong W, Wang R. 2016. Effects of resveratrol induced cellular autophagy in control of neurodegenerative diseases. Acta Pharm Sin 51: 18-22.

Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Gómez M, Robert P. 2012. Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz)) during fruit development and maturation in Central Chile. Chil J Agric Res 72: 582-589.

Jiménez LF, Merchant H. 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación Ed., México.

Valdebenito G. 2006. Paquete Tecnológico del maqui. <http://www.gestionforestal.cl>

