

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Caracterización del papel del TGF-Beta en el neuroblastoma
metastásico óseo**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Liria Mitzuko Fajardo Yamamoto

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Liria Mitzuko Fajardo Yamamoto

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Director de tesis

Miembros del comité
Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dr. Ulises Gregorio Pacheco Bardullas

Dra. Francesca Telese



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Liria Mitzuko Fajardo Yamamoto © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Liria Mitzuko Fajardo Yamamoto** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Caracterización del papel del TGF-Beta en el neuroblastoma metastásico óseo

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Director de tesis

Neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en pediatría. La mayoría de los pacientes presentan metástasis desde su diagnóstico y el hueso es el sitio más frecuente de diseminación metastásica. Los pacientes con NB metastásico desarrollan lesiones osteolíticas similares a los pacientes con metástasis óseas de cáncer de mama y melanoma. En pacientes con cáncer de mama, próstata y melanoma se ha reportado que el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β) regula la expresión de genes que favorecen el establecimiento y progresión de las metástasis óseas. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el efecto del TGF- β en la expresión de genes prometastásicos en células de NB, evaluar el efecto del TGF- β en los procesos celulares de migración, proliferación y apoptosis; así como establecer un modelo animal de NB metastásico a hueso. Nuestros resultados demuestran que las células de NB tratadas con TGF- β elevan la expresión de genes metastásicos (*PMEPA1*, *CXCR4* y *PTHrP*) y en los procesos celulares analizados se observó un aumento en la tasa de migración y proliferación. De forma interesante se observó que las células de NB presentan una disminución significativa en la tasa de proliferación al ser cultivadas en presencia de la porción soluble del receptor III del TGF- β (conocido como betaglicano soluble o sBG), el cual es un inhibidor del TGF- β . Finalmente, entre los métodos evaluados en este trabajo para el establecimiento del modelo murino de metástasis óseas en NB, la inoculación intratibial de células de NB de humano resultó ser la vía de administración más efectiva para observar lesiones osteolíticas en los ratones.

Palabras clave: Neuroblastoma, metástasis ósea, Factor de crecimiento y transformación beta.

Abstract of the thesis presented by **Liria Mitzuko Fajardo Yamamoto** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

TGF-Beta role in neuroblastoma bone metastasis

Abstract approved by:

Dr. Patricia Juárez Camacho
Thesis Director

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor among pediatric cancers. A unique feature of NB is the high metastatic rate, and bone is one of the main sites of metastatic occurrence. Patients with NB usually develop osteolytic lesions such as the ones present in patients with breast cancer and melanoma. Solid evidence support that Transforming Growth Factor- beta (TGF- β) plays a main role in the establishment and progression of bone metastases from breast and prostate cancer and melanoma. In this project, we characterized the expression of TGF- β responsive genes involved in bone metastasis, the effect of TGF- β in cellular processes such as migration, proliferation and apoptosis; as well as the establishment of a murine model of NB bone metastasis. Our results showed that NB cells treated with TGF- β increased the expression of prometastatic genes (*PMEPA1*, *CXCR4* and *PTHrP*) and presented an increase in proliferation and migration rates. Interestingly treatment with the soluble portion of the TGF- β receptor III (also known as soluble Betaglycan or sBG), which is a TGF- β inhibitor, significantly decreased their proliferation rate. Finally, among the different methods evaluated in this project, we proved that intratibial inoculation of NB human cells is the most effective approach in order to develop NB bone metastasis in mouse.

Keywords: Neuroblastoma, bone metastasis, Transforming Growth Factor Beta.

Dedicatoria

In dulcedine societatis, quarere veritatem
Alberto Magno

A la mayor fuente de Amor y a mi familia...

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó para realizar mis estudios de maestría a través del número de registro 613816 dentro del programa de becas de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida y en particular al Departamento de Innovación Biomédica por darme la oportunidad de llevar a cabo mi maestría, hacer uso de sus instalaciones y sobre todo por el conocimiento científico criticado y compartido.

A mi tutora Dra. Patricia Juárez, por aceptarme como alumna, por su tiempo, entusiasmo, exigencia, asesoría y sobre todo su paciencia en los distintos retos que enfrentamos.

A mi comité de tesis: Dr. Pierrick Fournier, por compartir sus conocimientos y habilidades que fueron fundamentales en la realización de mi proyecto de maestría y sobre todo la crítica constructiva que me brindó; Dra. Rosa Mouriño, por su ayuda invaluable dentro y fuera del CICESE y sobre todo su amistad; Dr. Eugenio Méndez, por su paciencia y amabilidad; Dr. Ulises Pacheco, por sus sugerencias, críticas y observaciones y Dra. Francesca Telese, por su apoyo, interés y aportaciones para enriquecer este proyecto de investigación.

Al Grupo de Cáncer y Hueso, los que están y los que se han ido, por todo el apoyo incondicional, las críticas y todos los momentos compartidos.

Al Dr. Luis Donis por compartir desinteresadamente sus conocimientos.

A mis amigos y familia.

A mis padres, por todo su amor y entrega, por educarme en valores y enseñarme lo que realmente importa en la vida.

A Mario Alberto, por todo tu amor, tu comprensión y tu infinita paciencia.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Lista de acrónimos.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	6
1.1.1 La vía de señalización canónica del TGF- β	7
1.1.2 Vías de señalización no canónica del TGF- β	8
1.1.3 El TGF- β y su papel en la formación de metástasis.....	8
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos.....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología	13
2.1 Cultivo celular.....	13
2.2 Grupos de estudio.....	13
2.3 Análisis de biología molecular	14
2.3.1 RTqPCR.....	14
2.2.1 Western Blot.....	15
2.4 Ensayos de actividad celular.....	17
2.4.1 Migración.....	17
2.4.2 Proliferación.....	17
2.4.3 Apoptosis.....	17
2.5 Establecimiento de un modelo murino de metástasis ósea en neuroblastoma.....	18
2.5.1 Preparación de células Neuro-2A y SK-N-AS para inoculación.....	18

2.5.2 Inoculación subcutánea.....	19
2.5.3 Inoculación intratibial.....	19
2.5.4 Inoculación intracardiaca.....	19
2.5.5 Colecta de tejidos.....	20
2.6 Análisis estadístico.....	20
Capítulo 3. Resultados	21
3.1 Niveles de respuesta al TGF- β en células de Neuroblastoma.....	21
Las células SK-N-AS expresan Receptores I y II del TGF- β	21
3.1.1. Activación de la vía canónica del TGF- β en células de Neuroblastoma.....	22
3.1.2. Niveles de expresión de genes regulados por TGF- β en células de NB.....	26
Expresión de genes pro metastásicos regulados por TGF- β en células SK-N-AS	26
Respuesta de las células Neuro-2A al TGF- β	28
3.2 Efecto del TGF- β en procesos celulares en líneas celulares de Neuroblastoma.....	29
3.2.1 El TGF- β aumenta parcialmente la migración en células SK-N-AS.....	29
3.2.2 Efecto del TGF- β en la proliferación de células de NB.....	31
El betaglicano soluble disminuye la viabilidad en células de NB.....	31
3.2.3 Efecto del TGF- β en apoptosis en líneas celulares de NB	32
3.3 Establecimiento de un modelo animal de metástasis ósea de Neuroblastoma.....	35
Capítulo 4. Discusión	39
4.1 Respuesta de las células de Neuroblastoma al TGF- β	39
4.1.1 Activación de la vía de señalización del TGF- β mediada por proteínas Smad 2/3.	39
4.1.2 Efecto del TGF- β en la expresión de genes pro metastásicos en células de NB.....	40
4.2 Efecto del TGF- β en procesos celulares.....	41
4.2.1 Migración.....	41
4.2.2 Proliferación.....	43
4.2.3 Apoptosis.....	44
4.3 Establecimiento de un modelo murino de Neuroblastoma metastásico óseo.....	44
Capítulo 5. Conclusiones	47
Capítulo 6. Perspectivas	48
Literatura citada	49

Lista de figuras

Figura		Página
1	Desarrollo del Sistema Nervioso y formación de las células de las crestas neurales...	2
2	Estadios clínicos de Neuroblastoma.....	3
3	Círculo vicioso de la metástasis ósea.....	5
5	Estructura del Receptor III del TGF- β	6
4	La vía de señalización canónica del TGF- β	7
6	Expresión relativa del ARNm del Receptor I del TGF- β en diferentes líneas celulares de cáncer comparado con células de NB humano (SK-N-AS).....	21
7	Expresión relativa del ARNm del Receptor II del TGF- β en diferentes líneas celulares de cáncer comparado con células de NB humano (SK-N-AS).....	21
8	Western Blot para la identificación de proteínas Smad 2/3 y Smad 2/3 fosforiladas en células N2A.....	23
9	Western Blot para la identificación de proteínas Smad 2/3 y Smad 2/3 fosforiladas en células SK-N-AS.....	24
10	Western Blot para detección de la proteína P-Smad 2/3 fosforiladas en células MDA-MB-231, SK-N-AS Y Neuro-2A.....	25
11	Expresión relativa del ARNm de genes regulados por TGF- β en células DU145 y SK-N-AS.....	27
12	Expresión relativa de PTHrP en células 4T1 y N2A.....	29
13	Ensayo de migración en células de Neuroblastoma.....	30
14	Ensayo de proliferación celular en 24 y 48.....	31
15	Imágenes representativas de células de Neuroblastoma después de las 48 horas de tratamiento en los distintos grupos de estudio.....	32
16	Análisis de apoptosis de células Neuro-2A en los diferentes grupos de estudio a las 48 horas de tratamiento.....	33
17	Análisis de apoptosis de células SK-N-AS en los diferentes grupos de estudio a las 48 horas de tratamiento.....	33
18	Fotografías de ratones Balb/C que desarrollaron tumor macroscópico.....	35
19	Gráficos que muestran la fluctuación en el peso corporal de los ratones como parámetro de bienestar.....	36

20	Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intratibial de células Neuro-2A.....	37
21	Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intratibial de células SK-N-AS.....	38
22	Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intracardiaca de células SK-N-AS.....	38

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de RTqPCR.....	15
2	Datos obtenidos del ensayo de apoptosis en las células SK-N-AS	34
3	Datos obtenidos del ensayo de apoptosis en las células Neuro-2A	34

Lista de acrónimos

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CADM1	Molécula de adhesión celular tipo 1
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CXCR4	Receptor de quimiosinas tipo 4
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAGs	Glucosaminoglicanos
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
IP	Ioduro de propidio
JNK	Cinasa c-Jun amino terminal
kDa	Kilodaltones
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MMP1	Metaloproteinasas/colagenasas de matriz tipo 1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MYCN	Factor de transcripción del protooncogén N-myc
NCAM	Molécula de adhesión celular de tejido neural
NB	Neuroblastoma
NBm	Neuroblastoma metastásico
OPN	Osteopontina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PMEPA1	Proteína prostática transmembranal inducida por andrógenos tipo 1
PTHrP	Péptido relacionado a hormona paratiroidea
RPL32	Proteína tipo receptor 32
sBG	Betaglicano soluble, también forma soluble del receptor tipo III del TGF- β
SFB	Suero fetal bovino
SPHK1	Esfingosina quinasa tipo 1
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF-β	Factor de crecimiento y transformación tipo beta
TβRI	Receptor I del TGF- β
TβRII	Receptor II del TGF- β

TβRIII	Receptor III del TGF-β
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo alfa

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en niños (0 a 14 años de edad) a nivel mundial (Ward, 2014) y nacional (Fajardo, 2016). La incidencia mundial de cáncer infantil ha aumentado sostenidamente los últimos 35 años (Steliarova-Foucher, 2017) pero en México la incidencia de cáncer en niños se ha mantenido estable desde 2001 (Palma, 2010).

Los tipos de cáncer más frecuentes en niños son: leucemia aguda linfoblástica, tumores del sistema nervioso central y neuroblastoma (Steliarova-Foucher, 2017).

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en pediatría y es el tipo de cáncer más frecuente en niños menores de un año. En países desarrollados, el NB tiene una incidencia de 7 a 14 casos por millón de niños de 0 a 14 años; mientras que en países menos desarrollados la incidencia es cercana a 6 casos por millón de niños. Se cree que la mayor incidencia en países desarrollados es debida a una mayor vigilancia médica de la población pediátrica (Palma, 2010). Específicamente para México, el NB corresponde al 2.7% de casos de cáncer infantil, con una incidencia de 3.8 casos por millón de niños de 0 a 14 años (Juárez, 2009).

El NB se desarrolla en tejido nervioso periférico, su principal sitio de presentación es la glándula suprarrenal y se caracteriza por tener una gran capacidad para formar metástasis (NIH, 2013). A nivel mundial el 40% de los casos de NB se presentan en glándula suprarrenal y más del 50% de los pacientes presenta metástasis desde su diagnóstico (Heck, 2009). Se piensa que el sitio de presentación de NB está dado por la fisiopatología de este tipo de cáncer.

Durante la formación del sistema nervioso, previo al cierre del tubo neural, se conforma un conglomerado celular llamado crestas neurales (Figura 1). La diferenciación de las células de las crestas neurales contribuye a la formación de distintas estructuras anatómicas, esta especialización celular ocurre por un proceso denominado Transición Epitelio-Mesénquima (TEM), en el que las células pierden sus propiedades de adhesión y polaridad para poder migrar del tubo neural, diferenciarse y conformar las distintas estructuras anatómicas. Este mecanismo es altamente regulado por diferentes procesos moleculares como: metilación del ADN, modificación de histonas, expresión de factores de transcripción, entre otros (Simões-Costa, 2015).

Las células de las crestas neurales se pueden subdividir en cuatro categorías funcionales: craneales, cardíacas, vagales/sacras y del tronco. Éstas últimas migran a la región de la aorta dorsal, donde se diferencian en células progenitoras simpatoadrenales, que dan lugar al sistema nervioso periférico, del cual se derivan los ganglios simpáticos y glándulas suprarrenales, principales sitios de ocurrencia del NB (Marshall, 2014). A lo largo de este proceso pueden ocurrir diversas alteraciones genéticas que desencadenen el desarrollo de NB.

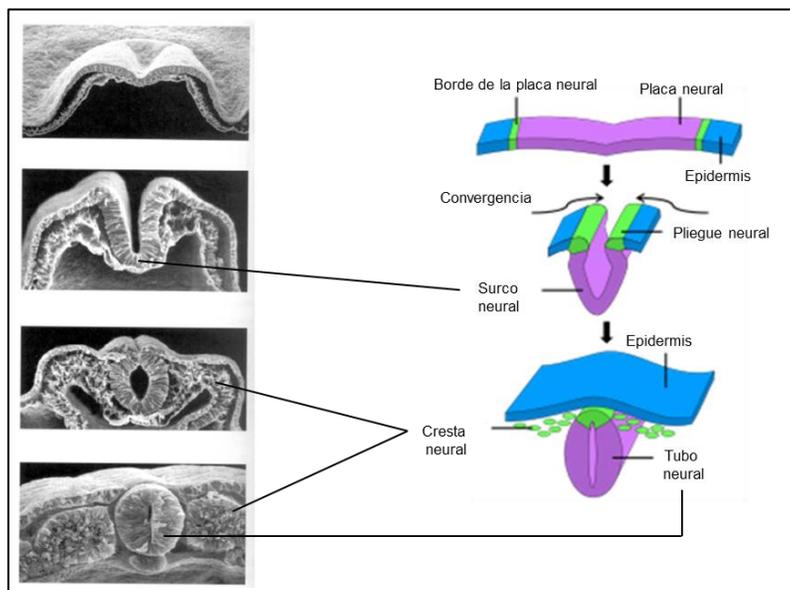


Figura 1. Desarrollo del Sistema nervioso y formación de las células de las crestas neurales. (Izquierda) Microscopía electrónica de barrido que muestra la formación del tubo neural y localización de las células de las crestas neurales. (Derecha) Esquema que representa el proceso de formación del tubo neural y cresta neural. Modificado de: Saavedra J, Domínguez A. (2014).

El diagnóstico de los pacientes con NB se realiza de forma clínica y con apoyo de estudios de gabinete. En la mayoría de los pacientes con NB se observan niveles elevados de dopamina, ácido homovanílico y ácido vanililmandélico en orina y a nivel sanguíneo se observa un aumento en la lactato deshidrogenasa y enolasa específica de neuronas; sin embargo, éstas últimas no son específicas de pacientes con NB.

En cuanto a los estudios de imagen que se practican a pacientes con sospecha de NB se encuentran: radiografías, tomografía axial computada o resonancia magnética con el fin de evaluar las dimensiones del tumor y la presencia de metástasis (NIH, 2013). Asimismo, se lleva a cabo una caracterización genética: se busca la amplificación del oncogén MYCN mediante fluorescencia por

hibridación in situ (se considera amplificación si se observa cuatro veces por encima del nivel de referencia) y otras alteraciones cromosómicas numéricas (ganancia o pérdida de cromosomas enteros) o alteraciones segmentarias (pérdida de uno o varios segmentos de un cromosoma).

La histología del NB es determinante en el pronóstico de la enfermedad, entre menos diferenciadas y más heterogéneas se observen las células en los estudios histopatológicos de las biopsias de pacientes con NB, es mayor la agresividad del tumor y por ende, el pronóstico es peor. Las células de NB se caracterizan por ser pequeñas, monomórficas, con hiperchromasia nuclear (exceso de pigmentación), presencia de micronúcleos y cromatina granular. Junto con la localización del tumor primario, edad de presentación y determinadas alteraciones genéticas, la histopatología confiere un riesgo específico a los pacientes con NB y se clasifica en 4 estadios (Matthay, 2016) (Figura 2).

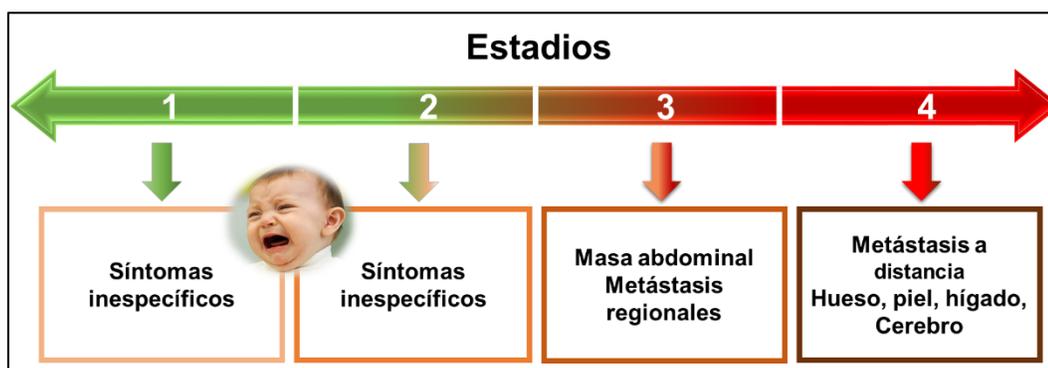


Figura 2. Estadios clínicos del NB. Los estadios 1 y 2 de NB se consideran de riesgo bajo y riesgo intermedio, respectivamente y los pacientes presentan síntomas inespecíficos, lo que dificulta su diagnóstico. Los estadios 3 y 4 considerados de riesgo alto y riesgo muy alto, corresponden a etapas avanzadas de la enfermedad y la principal característica clínica es la presencia de metástasis.

Existe otra categoría dentro de la clasificación por Grupo de Riesgo del Neuroblastoma, denominada 4S (Estadio 4 especial, por sus siglas en inglés) y se caracteriza por presentar regresión espontánea del tumor. El estadiaje 4S está restringido a pacientes diagnosticados con NB y las siguientes características: edad menor de 12 meses, sin amplificación del oncogén MYCN, metástasis únicamente en piel, hígado y médula ósea (Matthay, 2016).

El tratamiento de los pacientes con NB se basa dependiendo el grupo de riesgo al que pertenecen. En los pacientes con NB en estadio 1 y 4S el tratamiento es únicamente observación, para los casos de riesgo intermedio el tratamiento indicado es resección quirúrgica del tumor y si no fue posible una

resección completa del tumor se administran de dos a ocho ciclos de quimioterapia y radioterapia. Finalmente, para los casos de riesgo alto y muy alto se indica quimioterapia, resección quirúrgica y otra serie de ciclos de quimioterapia postquirúrgica, así como inmunoterapia o terapia dirigida particularmente para los casos de NB metastásico (Matthay, 2016).

Se conoce como neuroblastoma metastásico (NBm) cuando se diagnostica NB a un paciente y se observan metástasis en otros órganos. En NB los principales sitios de ocurrencia de metástasis son: hueso (70.5%), ganglios linfáticos (30.9%), hígado (29.6%), intracraneales (18.2%), pulmón (3.3%) y cerebro (0.6%) (DuBois, 1999).

La metástasis es la formación de tumores secundarios a partir de células cancerosas que se han separado del tumor primario y logran invadir un tejido u órgano diferente (Weinberg, 2013).

En algunos tipos de cáncer como mama y próstata, uno de los principales sitios donde se desarrollan las metástasis es el hueso. La formación de metástasis óseas es un proceso complejo que comprende varias etapas, inicia cuando las células tumorales se desprenden del tumor primario e ingresan al torrente sanguíneo, evaden la respuesta inmune y proliferan dentro del tejido óseo (Gupta, 2006).

Existen dos tipos de metástasis óseas: osteolíticas (donde existe destrucción del tejido óseo) y osteoblásticas (formación defectuosa del hueso); para el caso particular de NB, las metástasis óseas descritas son de tipo osteolítico (Sohara, 2005).

Una de las principales características que posee el tejido óseo para favorecer el establecimiento de metástasis es la abundancia de factores de crecimiento que se almacenan dentro de la matriz ósea, como el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros.

Cuando las células cancerosas se diseminan a los huesos estimulan a los osteoclastos para aumentar la tasa de resorción ósea y la liberación consecuente de más factores de crecimiento, que serán utilizados para el crecimiento y proliferación de las células tumorales. Los espacios libres, producto de la resorción ósea, son ocupados por más células cancerígenas que a su vez, estimulan a los osteoclastos; dando origen a lo que se conoce como el círculo vicioso de la metástasis ósea (Yin, 1999) (Figura 3.).

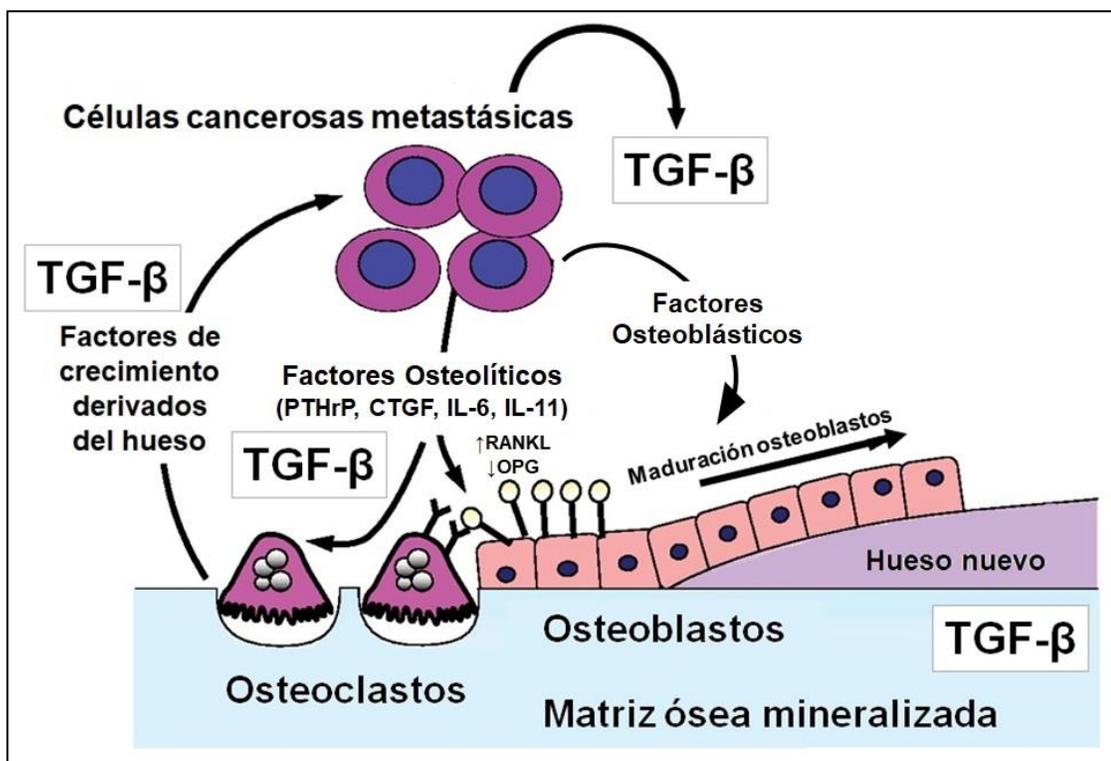


Figura 3. Círculo vicioso de la metástasis ósea. Las células tumorales secretan factores que estimulan a los osteoclastos y osteoblastos provocando un desequilibrio en la tasa de resorción ósea. Factores osteolíticos como el péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) e interleucinas (IL-6 y -11); incrementan la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) y disminución de osteoprotegerina (OPG) en los osteoblastos provocando osteoclastogénesis. La resorción ósea mediada por osteoclastos libera factores de crecimiento como el TGF- β , lo que estimula a las células cancerosas metastásicas dando origen a un círculo vicioso.

Yin *et. al.* (1999) demostraron que células de cáncer de mama (MDA-MB-231) transfectadas para no expresar el Receptor tipo II del TGF- β (T β RII), inhiben la secreción de PTHrP inducida por el TGF- β lo que provocó una disminución en la formación de lesiones osteolíticas en un modelo murino de metástasis óseas. Asimismo, Korpál *et. al.* (2009) reportaron imágenes en vivo de células tumorales, mediante bioluminiscencia dual, donde se demostró la activación de la vía de señalización del TGF- β , durante el establecimiento de las metástasis óseas.

Los reportes previos son algunas de evidencias que han logrado dilucidar al TGF- β como uno de los principales factores en el establecimiento y progresión de las metástasis óseas.

1.1 Antecedentes

El TGF- β es una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citocinas, que incluye a las proteínas morfogénicas del hueso (BMP, por sus siglas en inglés), activinas, inhibinas, hormona anti-mülleriana y al TGF- β , entre otros factores de crecimiento y diferenciación. En humanos se han descrito tres isoformas del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24, respectivamente), pero poseen 80% de homología en su secuencia de aminoácidos. El TGF- β es secretado como un precursor latente de 25 kDa, en su porción C-terminal posee nueve residuos de cisteína donde se produce un corte proteolítico para dar lugar a la forma activa del TGF- β , la cual está conformada por un homodímero de dos polipéptidos de 12.5 kDa unidos por un enlace disulfuro. Cuando se une la forma activa del TGF- β con su receptor se desencadena la vía de señalización del TGF- β .

Se han descrito tres tipos de receptor del TGF- β : receptor I del TGF- β (T β RI), receptor tipo II (T β RII) y receptor tipo III (T β RIII). T β RI y T β RII son glicoproteínas transmembranales; en su región extracelular se une el ligando y la región intracitoplásmica son proteínas cinasas con dominios treoninas/serinas.

El T β RIII conocido también como betaglicano (Figura 4), es una proteína con funciones opuestas; cuando está unido a la membrana e interacciona con el TGF- β , lo presenta ante los receptores T β RII y T β RI potenciando la cascada de señalización. Sin embargo, cuando ocurre una escisión proteolítica en la región extracelular se da origen a la forma soluble del betaglicano (sBG) el cual secuestra al ligando y actúa como un agente neutralizante del TGF- β e inhibe la vía de señalización (Massagué, 1998).

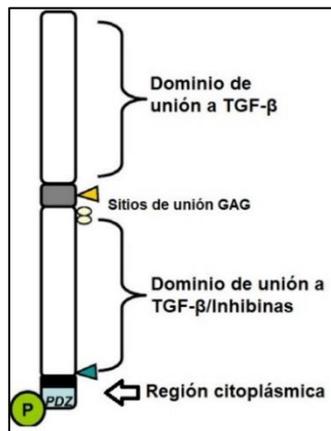


Figura 4. Estructura del receptor III de TGF- β . Región superior (amino terminal) representa el sitio de unión con TGF- β y presentación al Receptor II de TGF- β . Sitios de unión a GAGs (Glucosaminoglicanos). En negro se muestra la región transmembranal: Anclaje del receptor a la membrana plasmática. Región citoplásmica (carboxilo terminal) P: Fosforilación por Receptor II de TGF- β en el dominio PDZ.

1.1.1 La vía de señalización canónica del TGF- β

La vía de señalización del TGF- β (Figura 5) inicia en el espacio extracelular con la unión del TGF- β al T β RIII, el cual recluta al T β RII para provocar su unión con el T β RI; también puede iniciar cuando el TGF- β se une directamente al T β RII, lo que induce la atracción del T β RI, provocando su fosforilación. La asociación entre los receptores T β RII y T β RI conforma el complejo receptor en forma de heterotetrámero, de esta forma es capaz de desencadenar la cascada de señalización a través de reacciones de fosforilación en las proteínas intracelulares Smad 2 y Smad 3, las cuales formarán un complejo con la proteína Smad 4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de forma específica con otros factores para regular la transcripción de genes blanco y llevar a cabo las funciones biológicas de diferenciación, control del ciclo celular, síntesis de matriz extracelular, entre otras. Esta vía de señalización a través de proteínas Smads se conoce como la vía canónica de señalización del TGF- β (Massagué, 1998).

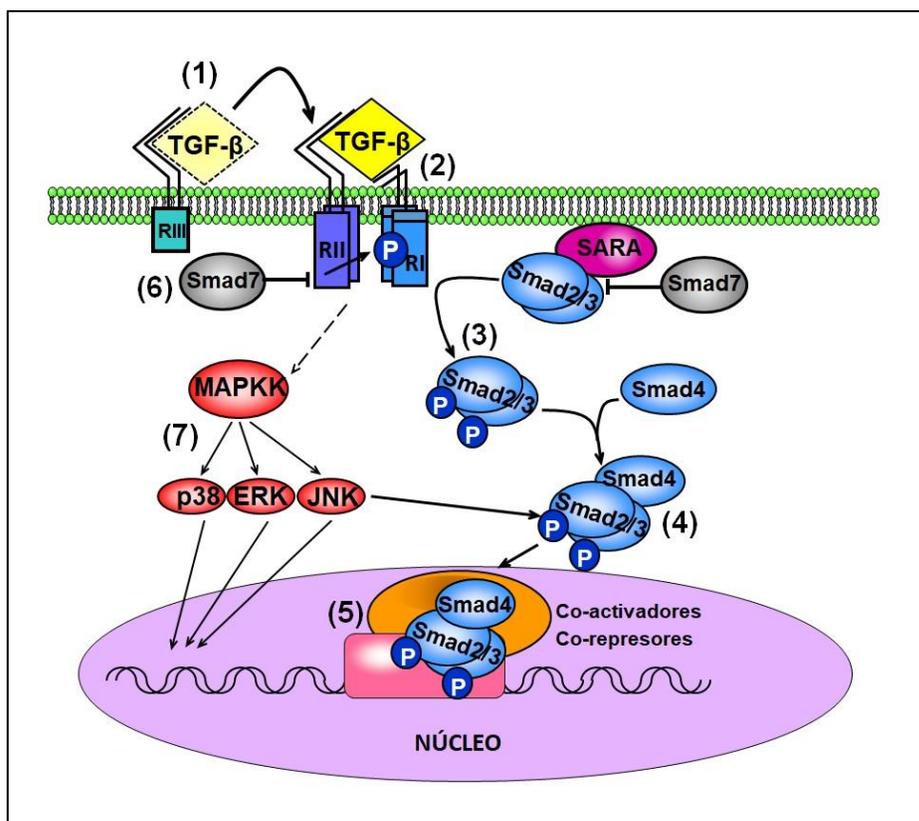


Figura 5. La vía de señalización canónica del TGF- β . La unión del ligando al receptor II del TGF- β propiciada por el receptor III (1) ocasiona el acercamiento y activación del receptor I de TGF- β , formando un heterotetrámero activo (2). Este complejo receptor fosforila a las proteínas Smads 2 y 3 (3), las cuáles se unirán con la proteína Smad4, formando un complejo de proteínas capaz de trasladar al interior del núcleo (4) donde actuarán como factores de transcripción (5). La proteína Smad 7 (6) actúa como inhibidora de esta vía de señalización. El ligando también puede activar otras vías de señalización (7) como es el caso de la vía MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) que a su vez regula la expresión de distintos genes.

Las proteínas Smads (*mothers against decapentaplegic*) tienen un papel clave en la transducción de la señal desde los receptores a los genes blanco en el núcleo. Dependiendo sus características estructurales y funcionales las proteínas Smad se dividen en tres categorías: 1) Smads activadas por el receptor o R-Smads: en este grupo se encuentran las proteínas Smad 2 y 3, son las primeras en transducir el mensaje a nivel intracelular después de ser activadas por el T β RI. 2) Smad cooperadora o C-Smad: se asocia con R-Smads para formar un complejo heterotrimérico de dos R-Smad y una Smad 4, el cual se trasladará a núcleo para activar la transcripción de los genes blanco de la vía. 3) Smad inhibitorias o I-Smads: proteínas Smad 6 ó 7, que son antagonistas de la vía (Massagué, 1998).

1.1.2 Vías de señalización no canónica del TGF- β

Existen otras vías de señalización activadas por el TGF- β , conocidas como señalización no canónica del TGF- β , como es el caso de PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3-cinasa/proteína cinasa B) que participan en la regulación de apoptosis, metabolismo de glucosa, proliferación y migración principalmente, esta vía tiene un papel importante en el proceso de TEM. Otro ejemplo es la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que activan diversas proteínas (Figura 5-5) y factores de transcripción como p38 (miembro de la familia MAPK que responde a estrés ambiental y citosinas inflamatorias), JNK (cinasa c-Jun amino terminal) y ERK (cinasa regulada por señales extracelulares), estas vías regulan principalmente los procesos celulares de apoptosis y migración (Johnson, 2002).

El TGF- β puede integrar señales mediadas por otras proteínas como integrinas, Notch (proteínas transmembranales), Wnt (del inglés *Wingless and Int*, miembro de la familia de glucoproteínas de secreción), TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa, citocina que interviene en la inflamación), así como señales que modifiquen el ciclo celular o induzcan apoptosis.

1.1.3 El TGF- β y su papel en la formación de metástasis

En etapas tempranas de la formación tumoral, el TGF- β actúa como supresor de tumores inhibiendo el crecimiento de células epiteliales y la TEM. Sin embargo, en estadios avanzados del cáncer,

el TGF- β promueve la proliferación tumoral, favorece la TEM y angiogénesis; propiciando el desarrollo y progresión de metástasis (Massagué, 2008).

Existen diversos estudios que confirman la participación del TGF- β en diferentes etapas de la formación de metástasis óseas. Guise *et. al.* (1996) caracterizaron al PTHrP, cuya secreción es inducida por el TGF- β , como un mediador fundamental en las metástasis óseas y demuestran que anticuerpos contra PTHrP bloquean el desarrollo y progresión de metástasis óseas en un modelo murino de cáncer de mama metastásico a hueso.

Kang *et. al.* (2003) describen una serie de genes, entre los que se encuentran: IL-11, CTGF, CXCR4 (receptor de quimionas tipo 4) y MMP1 (metaloproteinasa de matriz 1), los cuales son regulados por el TGF- β y favorecen la formación y progresión de metástasis en tejido óseo. Más adelante, mediante estudios de inmunohistoquímica demostraron la sobreexpresión de proteína Smad 2 activa (fosforilada) en metástasis óseas de pacientes con cáncer de mama y comprobaron los efectos *in vivo* del *knockdown* de la proteína Smad 4 en un modelo murino de metástasis óseas al observar disminución de lesiones osteolíticas y aumento en la supervivencia de los ratones experimentales (Kang, 2005).

En 2007, Javelaud *et. al.*, demostraron que la sobreexpresión de Smad 7 en células de melanoma disminuye la formación de metástasis óseas *in vivo* al inhibir la activación de la vía de señalización del TGF- β mediada por proteínas Smad.

Por otro lado en cáncer de próstata, Fournier *et. al.* (2015) demostraron que el TGF- β regula la expresión de genes pro metastásicos, entre los que destaca PMEPA1 (que codifica para la Proteína prostática transmembranal inducida por andrógenos tipo 1), a nivel clínico los pacientes con cáncer de próstata metastásico y niveles bajos de Pmepa1 presentan menor supervivencia y en un modelo murino comprueban que el *knockdown* de PMEPA1 incrementa el desarrollo de metástasis óseas.

El TGF- β mediante su vía de señalización canónica o independiente de proteínas Smads, participa en la regulación de genes que inducen diversos procesos celulares como adhesión, motilidad, diferenciación, proliferación, migración e incluso muerte celular. Algunos de los genes que son regulados por el TGF- β son inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés), genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular, entre otros (Massagué, 2008, Juárez, 2011). Por lo cual, al estar alterada la vía de señalización o la regulación de ésta, se favorece el crecimiento tumoral y la progresión de las metástasis.

La caracterización del papel del TGF- β en las metástasis óseas ha sido posible, entre otros factores, por el establecimiento de modelos preclínicos de metástasis óseas. Para el caso particular de NB, uno de los modelos animales mayormente reportados es el modelo de ratón transgénico TH-MYCN (en el que la expresión de N-myc es favorecida por el gen de tirosina hidroxilasa); en este modelo se ha logrado el desarrollo de NB en ganglios paraespinales, pero no en glándula suprarrenal. Principalmente se ha utilizado este modelo para evaluar el efecto de nuevos agentes quimioterapéuticos (Teitz, 2011).

Una de las principales dificultades en los modelos murinos de NB ha sido la falta de desarrollo tumoral en la glándula suprarrenal y el desarrollo de metástasis en los sitios característicos: hueso, cerebro e hígado. En 2017 Seong y colaboradores propusieron un modelo murino que desarrolla metástasis a los sitios característicos de NB e identificaron más de 400 genes que regulan el desarrollo de metástasis (Seong, 2017). Los autores identificaron que los genes CADM1, YAP/TAZ y SPHK1 participan en la formación de metástasis y tienen relación con el pronóstico de los pacientes con NB. De los tres genes caracterizados, SPHK1 es altamente regulado por TGF- β y ha sido descrito como protagonista en el establecimiento de metástasis óseas y progresión en cáncer de mama (Stayrook, 2015).

Debido a la importancia del TGF- β en el establecimiento y progresión de metástasis óseas en diferentes tipos de cáncer como mama, próstata y melanoma (Yin, 1999; Kang, 2005; Javelaud, 2007 y Fournier, 2015); este proyecto pretende describir si las metástasis óseas que desarrollan los pacientes con NB se encuentran reguladas de forma similar por el TGF- β .

1.2 Justificación

El neuroblastoma metastásico es una patología que se presenta en edades muy tempranas y se caracteriza por ser de mal pronóstico, los pacientes presentan una supervivencia menor del 40% a cinco años tras ser diagnosticada. Los tratamientos disponibles para las etapas avanzadas de esta patología no son completamente efectivos y los pacientes de forma frecuente cursan con efectos colaterales como fracturas, dolor óseo intenso, compresión de médula espinal o radicular y alteraciones en médula ósea, entre otros. Uno de los principales sitios donde se desarrollan metástasis en NB es el tejido óseo y las lesiones descritas en los pacientes son de tipo osteolítico como sucede en las metástasis óseas de cáncer de mama y melanoma.

Mediante el establecimiento de modelos preclínicos, se ha demostrado que el TGF- β es un factor imprescindible en el desarrollo y progresión de metástasis óseas en cáncer de mama, melanoma y próstata (Yin, 1999, Kang, 2003; Javelaud, 2007 y Fournier, 2015).

Por este motivo el presente trabajo de investigación se enfoca a responder si el TGF- β podría tener un efecto fundamental en el desarrollo de metástasis óseas en NB, así como describir los efectos que tiene el TGF- β en procesos celulares de células de NB, finalmente se busca establecer un modelo murino de NB metastásico con el objetivo de comprender la fisiopatología en etapas avanzadas del NB y proponer nuevas estrategias terapéuticas.

1.3 Hipótesis

1. Las líneas celulares de neuroblastoma (NB) aumentarán la expresión de genes que favorecen el desarrollo de metástasis al ser cultivadas en presencia del Factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF- β).
2. La inoculación de células de NB mediante inyección intratibial e intracardiaca en ratones causará lesiones osteolíticas en los organismos de estudio.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto del TGF- β *in vitro* utilizando líneas celulares de NB y establecer un modelo murino de NB metastásico a hueso.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar niveles de respuesta al TGF- β en líneas celulares de NB midiendo la expresión de genes diana en la vía de señalización del TGF- β y detectar la presencia de proteínas smad2/3 fosforiladas para comprobar la activación de esta vía.
2. Evaluar el efecto del TGF- β en los procesos celulares de migración, proliferación y apoptosis de células de NB *in vitro*.
3. Establecer un modelo de NB metastásico a hueso a partir de ratones inoculados con células de NB.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Se cultivaron las siguientes líneas celulares: células Neuro-2A (N2A), aisladas de un tumor en ratones albinos, esta línea celular fue donada amablemente por la Dra. Francesca Telese (UCSD); células SK-N-AS, aisladas de una lesión metastásica en cerebro de una paciente con neuroblastoma, esta línea celular se obtuvo de la ATCC, ambas líneas celulares se mantuvieron con medio DMEM; células 4T1 derivadas de cáncer de mama murino y células DU145 derivadas de una lesión metastásica en cerebro de un paciente con carcinoma de próstata, las últimas dos líneas celulares se cultivaron en medio RPMI. Todos los medios de cultivo se complementaron con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico, bajo una atmósfera humedecida con CO₂ al 5% y una temperatura de 37°C. Todos los experimentos *in vitro* se realizaron cuando las células en cultivo presentaron una confluencia aproximada del 80%.

2.2 Grupos de estudio

Para evaluar el efecto del TGF- β en las diferentes fases experimentales del proyecto, se formaron cuatro grupos de estudio:

- a) Grupo control: tratado con medio de cultivo, suplementado con 1% de SFB.
- b) Grupo TGF- β : a una concentración de 5 ng/ml.
- c) Grupo sBG: a una concentración de 5 μ g/ml.
- d) Grupo sBG/ TGF- β : a una concentración de 5 μ g/ml y 5 ng/ml, respectivamente.

La dosis del TGF- β fue determinada con base en lo reportado por Juárez *et. al.* (2017). Antes de cada experimento los grupos de estudio se sometieron a una fase de inanición (medio de cultivo sin SFB) y los grupos c) y d) se expusieron a una fase de pre-tratamiento de 4 horas con sBG (medio sin SFB + sBG a una concentración de 5 μ g/ml).

2.3 Análisis de Biología Molecular

Para analizar los niveles de respuesta al TGF- β en células de NB se midió la expresión de genes diana de la vía de señalización del TGF- β mediante PCR en tiempo real (RTqPCR) así como la presencia de proteínas Smad 2/3 fosforiladas para comprobación de la activación de la vía de señalización de TGF- β mediante detección por Western Blot.

2.3.1 RTqPCR

La expresión de genes blanco en la vía de señalización del TGF- β se evaluó por PCR en tiempo real. En placa de 24 pozos se sembraron células SK-N-AS y DU145 (células de carcinoma de próstata, como grupo de comparación) y células N2A y 4T1 (células de cáncer de mama de ratón como grupo de comparación para las células N2A). Para el caso de células SK-N-AS se sembraron 1.4×10^5 células por pozo, de las células DU145 se sembraron 7×10^4 células por pozo y para las células de ratón se sembraron las siguientes cantidades: 1×10^5 células N2A por pozo y 5×10^4 células 4T1 por pozo. Cuando todas las líneas celulares alcanzaron una confluencia aproximada del 80% se inició el periodo de inanición por 8 horas y el periodo de pre-tratamiento de 4 horas a los grupos sBG y sBG/TGF- β , al finalizar el periodo de inanición se inició el periodo de tratamiento en todos los grupos de estudio. Al transcurrir 24 horas de tratamiento, se realizó la extracción de ARN con el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma Aldrich) y se cuantificó por Nanodrop (Thermo Scientific) posteriormente se sintetizó el ADN complementario (cDNA) de cada muestra de ARN a través de la reacción de transcripción reversa utilizando el kit SuperScript II (Invitrogen).

Finalmente se realizó cuantificación de ARNm (ARN mensajero) mediante RT-qPCR. Para las líneas celulares de humano se midió la expresión de *PMEPA1*, *CXCR4*, *PTHrP*, *TBR1* y *TBR2*, para las líneas celulares de ratón únicamente se evaluó el gen *Pthrp*, ambos grupos (humano y ratón) se normalizaron con el gen *RPL32*. Los cDNA se analizaron por triplicado mediante PCR cuantitativa en tiempo real, la reacción fue preparada en 10 μ L de volumen utilizando el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen).

Únicamente para el análisis de expresión de los receptores I y II de TGF- β se utilizó cDNA de diferentes líneas celulares para compararlo con las células SK-N-AS, las líneas utilizadas fueron: MDA-MB-231, T47D (líneas celulares de cáncer de mama), PC3 Y DU145 (líneas celulares de cáncer de próstata) (el cDNA de las células MDA-MB-231, T47D y PC3 fue donado amablemente por Fernando Guerra, Laboratorio

Biomedicina, CICESE). La expresión de los genes: *PMEPA1*, *CXCR4* y *PTHrP* fue analizada únicamente en las células SK-N-AS y se comparó con los niveles de expresión de las células DU145. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los genes evaluados.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de RTqPCR

Nombre del gen	Secuencia forward	Secuencia reverse
<i>TβRI</i>	GATGGGCTCTGCTTTGTCTC	CAAGGCCAGGTGATGACTTT
<i>TβRII</i>	TTTTCCACCTGTGACAACCA	GGAGAAGCAGCATCTTCCAG
<i>PMEPA1</i>	AGAACACTCCGCGCTTCTTA	GCTTGTGCATTAGACCAGA
<i>CXCR4</i>	CCGTGGCAAACCTGGTACTTT	GACGCCAACATAGACCACCT
<i>PTHrP</i>	ACTCGCTCTGCCTGGTTAGA	GGAGGTGTCAGACAGGTGGT
<i>Pthrp</i>	CAGCCGAAATCAGAGCTACC	CGTCTCCACCTTGTGGTTT
<i>RPL32</i>	CAGGGTTCGTAGAAGATTCAAGGG	CTTGGAGGAAACATTGTGAGCGATC
<i>Rpl32</i>	CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG	CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC

2.3.2 Western Blot

Para comprobar la activación de la vía de señalización del TGF-β se analizó la presencia de proteína Smad2/3 fosforilada. En una placa de 12 pozos se sembraron 4 pozos con 4.5×10^5 células SKNAS por pozo, 4 pozos con 3.5×10^5 células N2A por pozo y los 4 pozos restantes con 1.5×10^5 células MDA-MB-231 cada pozo (como grupo control positivo del experimento).

Al observarse una confluencia aproximada del 80% se inició un periodo de inanición por 6 horas, en los grupos sBG y sBG/TGF-β se inició un periodo de pre-tratamiento con inhibidor de TGF-β (sBG) por 4 horas. Al concluir el periodo de inanición y pre-tratamiento se inició el tratamiento en todos los grupos de estudio por 30 minutos.

Al finalizar el tratamiento los cultivos celulares fueron lisados en buffer (IGEPAL 1%, inhibidor de proteasas (cOmplete, Roche) 1X, inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP, Roche) 1X, Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM), se cuantificó la concentración de proteína en cada muestra mediante la técnica de Bradford (Sigma Aldrich). La proteína se cargó en un gel de acrilamida al 10% y se separó por electroforesis. Posteriormente se transfirió a membranas de Polivinildifluoruro (PVDF), las membranas se bloquearon con albúmina al 5% por dos horas a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados

con TBS-Tween al 0.5% (TBST) de 10 minutos cada uno y ambas membranas se dejaron incubando con su respectivo anticuerpo primario en agitación constante durante la noche. Para el caso de proteínas Smad 2/3 se utilizó el anticuerpo Anti-SMAD2/3 (Smad 2/3 Antibody, Cell Signalling Technology-CST) a una dilución 1:1000 y para las proteínas Smad fosforiladas se utilizó el anticuerpo Anti-Phospho-Smad2/Smad3, CST) a una dilución 1:500.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se dejaron incubando con los anticuerpos secundarios (Anti-Rabbit IgG (G21234)) a una dilución 1:40,000 durante dos horas. Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces más con TBS-T. Las proteínas se identificaron por un método quimioluminiscente utilizando el reactivo de Millipore Sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP para transferencias "Western" (Immobilon western chemillum hrp substrate).

Fraccionamiento Nuclear

Se realizó una separación de la fracción citosólica y la fracción nuclear con el objetivo de detectar proteínas Smad 2/3 fosforiladas en la región nuclear (las proteínas Smad 2/3 al estar fosforiladas, forman un complejo de traslocación hacia el núcleo junto con la proteína Smad 4, Figura 5-2).

En una placa de 6 pozos se sembraron 2 pozos con 1.2×10^6 células SKNAS por pozo, 2 pozos con 7×10^5 células N2A por pozo y los 2 pozos restantes con 3.5×10^5 células MDA-MB-231 cada pozo (como grupo control positivo del experimento). En este experimento únicamente se evaluaron los grupos Control y el grupo expuesto al TGF- β . Al observarse una confluencia aproximada del 80% se inició periodo de inanición por 6 horas y al finalizar este periodo se inició el tratamiento en ambos grupos de estudio por 30 minutos. Los cultivos celulares fueron lisados en buffer (IGEPAL 0.05%, inhibidor de proteasas (cComplete, Roche) 1X, inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP, Roche) 1X, KCl 10mM, MgCl₂ 1.5mM, HEPES 10mM) y posteriormente se centrifugaron, el sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica se almacenó y el botón precipitado (pellet) se resuspendió en buffer RIPA (SDS 0.1%, Triton X100 10%, inhibidor de proteasas (cComplete Roche) 1X, inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP, Roche) 1X, NaCl 150mM, EDTA 2mM y TRIS-HCl 50mM) para la obtención de proteínas nucleares.

Las muestras de los grupos control y TGF- β de las tres líneas celulares fueron cargadas en geles de acrilamida al 10% para su separación por electroforesis, se cargó por separado la fracción nuclear y la fracción citosólica en otro gel. Posteriormente se transfirieron a membranas PVDF y se prosigió con la metodología de Western Blot descrita previamente.

2.4 Ensayos de actividad celular

2.4.1 Migración

Se evaluó mediante el ensayo de la herida. En placa de 12 pozos se sembraron 6 pozos con 1×10^5 células N2A por pozo y 6 pozos con 2×10^5 células SK-N-AS por pozo, para este ensayo únicamente se formaron dos grupos de estudio: Control (3 pozos) y TGF- β (5 ng/ml) (3 pozos). Todos los pozos se sometieron a un periodo de inanición por ocho horas, posteriormente se rasgó la monocapa celular con una punta de 200 μ L a lo largo del diámetro de cada pozo, se retiró el medio de cultivo, se lavó cada pozo con 500 μ L de PBS y se adicionó medio de cultivo nuevamente con su respectivo tratamiento. Se marcaron tres regiones distintas en cada pozo y se tomó registro fotográfico de todas las regiones en todos los pozos a las cero, 12, 24, 36 y 48 horas.

Al finalizar el experimento se midió el área de la herida en cada fotografía con el software ImageJ y se comparó el promedio del área cada grupo (Control VS. TGF- β) en los distintos tiempos.

2.4.2 Proliferación celular

Se midió la tasa de proliferación celular mediante el ensayo de MTT (método colorimétrico del thiazolyl blue tetrazolium bromide), la reducción del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en las células viables produce un compuesto azul (formazan), cuya absorbancia es leída a 570 nm. En placa de 96 pozos se sembraron 2×10^4 células N2A en 100 μ l de medio DMEM por pozo y para el caso de células SK-N-AS se sembraron 4×10^4 células por pozo, se formaron triplicados de los 4 grupos de estudio. Al finalizar el tiempo de tratamiento (24 ó 48 horas) se agregó el reactivo MTT (20 μ l por pozo), transcurridas 5 horas de incubación a 37°C se agregaron 100 μ l de buffer de lisis, finalmente las células se incubaron por 20 horas a 37°C y al finalizar se leyó la absorbancia a 570nm.

2.4.3 Análisis de Apoptosis

Se analizó mediante citometría de flujo con la tinción de Anexina-V y yoduro de propidio. En células viables la fosfatidil serina se localiza en la región citosólica, al inducirse apoptosis en las células se altera la

organización de los fosfolípidos de la membrana celular que provocan la exposición de fosfatidil serina al medio extracelular, que será captada por la anexina-V acoplada a fluoresceína. Por otro lado, el yoduro de propidio es un colorante que sólo es captado por células no viables. Con esta doble tinción es posible discriminar células viables, en apoptosis (temprana o tardía) y células necróticas.

En placa de 24 pozos se sembraron 7×10^4 células N2A por pozo y 1.4×10^5 células SK-N-AS por pozo. Se formaron los grupos de estudio y un grupo extra que fue tratado con solución salina al 0.9% con el objetivo de inducir apoptosis. El periodo de tratamiento fue de 48 horas, posteriormente se colectaron las células junto con el medio de cultivo y se centrifugaron cinco minutos, a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se suspendieron en PBS frío para cuantificar células viables mediante exclusión por azul tripano. Se utilizó el kit de apoptosis Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit de Life Technologies, se siguieron las indicaciones del proveedor. La discriminación de las distintas subpoblaciones celulares se cuantificó por citometría de flujo con Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). Se adquirieron 150 μ l a una velocidad de 200 μ l/min pasando alrededor de 500 eventos por segundo. Se utilizó el software FlowJo V.10 para el análisis de los datos.

2.5 Establecimiento de un modelo murino de metástasis ósea en neuroblastoma

Para todos los experimentos in vivo se utilizaron ratones hembra de cuatro a ocho semanas de edad. Para las inoculaciones intracardiacas e intratibiales, los animales de estudio fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (100 mg/kg) y Xilazina (10 mg/Kg) vía intraperitoneal y se les administró lubricante oftálmico tópico en repetidas ocasiones mientras el animal se encontrara anestesiado. Se realizó registro del peso corporal de los animales cada tercer día post-inoculación, así como evaluación de la formación de tumor como parámetros para vigilar el bienestar de los animales en estudio.

2.5.1 Preparación de células N2A y SK-N-AS para inoculación

De los cultivos de células N2A o SK-N-AS, se obtuvo una suspensión celular a la que se le agregaron cuatro volúmenes de PBS frío y se centrifugó a 4°C durante 10 min a 300 g. Se realizó el lavado con PBS dos veces

más, posteriormente el paquete celular se resuspendió en dos ml de PBS para contar las células y ajustar la concentración final indicada dependiendo del sitio de inoculación de cada grupo de animales.

2.5.2 Inoculación subcutánea

Se trabajó con ocho hembras Balb/C de cuatro semanas de edad y nueve hembras C57/BL6 de seis semanas de edad para evaluar la tumorigenicidad de las células N2A. Los animales fueron marcados con cortes en sus orejas para su identificación. Se sujetó cada animal con firmeza, se aplicó etanol al 70% en el sitio de inoculación y con jeringa de 1 ml se inyectaron las células N2A vía subcutánea en ambos flancos de cada animal. Cada cepa de ratones se dividió en dos grupos, el primer grupo fue inoculado con 1×10^6 células en cada flanco y el segundo grupo se inoculó con 2×10^6 células.

2.5.3 Inoculación intratibial

Se utilizaron ratones Balb/C de cuatro semanas ($n=10$) y CD1 Nu/Nu ($n=9$) de entre seis y ocho semanas de edad. Previo a la administración de la anestesia se aplicó una dosis de analgesia (Buprenorfina 0.1 mg/kg) vía intraperitoneal. Se realizó asepsia de la región a inocular con etanol 70%, la inoculación se realizó con aguja 31G a través del ligamento patelar en la región intercondílea y se inyectó en la porción proximal de cada tibia aproximadamente 25 μ l de células en suspensión. Para los ratones Balb/C se inocularon 2×10^5 células N2A en ambas tibias y en los ratones CD1 Nu/Nu se inocularon 1×10^5 células SK-N-AS en cada tibia.

Para la inoculación de células SK-N-AS se utilizaron ratones hembra CD1 Nu/Nu de entre seis y ocho semanas de edad aproximadamente, los cuáles fueron adquiridos del bioterio de la UAM Xochimilco.

2.5.4 Inoculación intracardiaca

Se utilizaron ratones hembra CD1 Nu/Nu de entre seis y ocho semanas de edad ($n=14$). Cada ratón se fijó en posición decúbito dorsal con cinta adhesiva para mantenerlo en posición. Se sujetó el esternón y se

inyectó la suspensión celular en el ventrículo izquierdo del corazón. Se utilizaron agujas nuevas para cada uno de los ratones y se inocularon 1×10^5 células SK-N-AS. Después de la inyección se colocaron a un tapete térmico para evitar la pérdida de calor corporal y se vigilaron constantemente hasta recuperarse de la anestesia. Posteriormente se le transfirió a su respectiva caja.

2.5.5 Colecta de tejidos

Al concluir el experimento, los animales fueron sacrificados y se recolectaron las extremidades pélvicas. Las muestras se conservaron en formalina durante 48 horas, se lavaron con PBS y finalmente se conservaron en etanol 70%. Los huesos extraídos se enviaron al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca), donde se realizaron estudios radiográficos por medio de un sistema in-Vivo Xtreme (Bruker).

2.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, fueron analizados con el paquete computacional Graph Pad Prism 6 utilizando las pruebas paramétricas de análisis de varianzas (ANOVA) de una y dos vías, seguido del post test de Bonferroni o Tukey, dependiendo el caso. Los resultados significativos fueron aquellos con una $p < 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Niveles de respuesta al TGF- β en células de NB

Las células SK-N-AS expresan los receptores I y II del TGF- β

Como primer paso para evaluar el nivel de respuesta al TGF- β en células de NB, se analizó la expresión de los receptores I y II del TGF- β en células SK-N-AS y se comparó con la expresión en otras líneas celulares de cáncer: MDA-MB-231, T47D (correspondientes a líneas celulares de cáncer de mama) y PC3, DU145 (líneas celulares de cáncer de próstata), se eligieron determinados linajes celulares por su modulación al ser expuestas al TGF- β (Fournier, 2015 y Juárez, 2017). En la Figura 6 se observa que las células MDA-MB-231, DU145 y SK-N-AS presentan niveles de ARNm del T β RI similares.

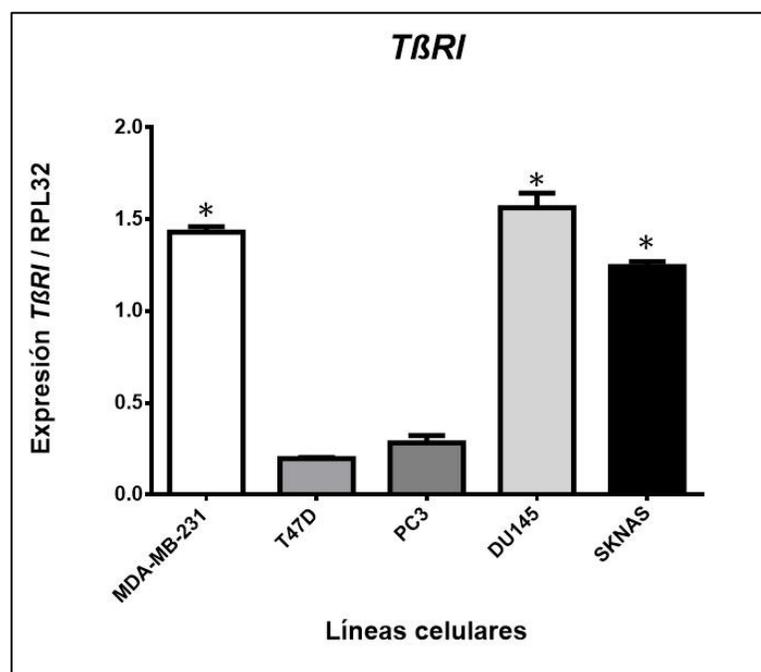


Figura 6. Expresión relativa del ARNm del Receptor I del TGF- β en diferentes líneas celulares de cáncer comparado con células de NB humano (SK-N-AS). Los datos de la gráfica representan la media \pm error estándar de la media (SEM), el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (*Datos significativos $p < 0.05$).

Respecto al nivel de expresión relativa del ARNm del T β RII las células MDA-MB-231 y DU145 presentan niveles similares entre sí. En este receptor en particular, las células SK-N-AS únicamente presentan niveles diferentes con las células T47D (Figura 7).

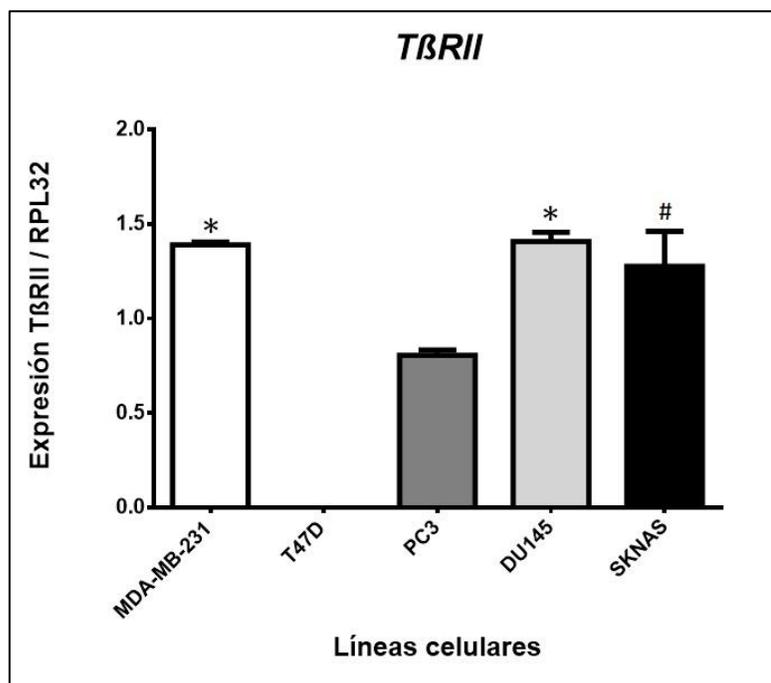


Figura 7. Expresión relativa del ARNm del Receptor II del TGF- β en diferentes líneas celulares de cáncer comparado con células de NB humano (SK-N-AS). Los datos de la gráfica representan la media \pm SEM, el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (*Datos significativos $p < 0.05$, células MDA-MB-231, DU145 y SK-N-AS presentan niveles similares entre ellas, # células SK-N-AS no presentan diferencias significativas con células PC3).

Se puede observar que la expresión relativa del ARNm de los receptores I y II de TGF- β en las células SKNAS es similar a las líneas celulares MDA-MB-231 y DU145, por lo que el siguiente paso fue comprobar la activación de la vía de señalización canónica del TGF- β en las células de NB.

3.1.1 Activación de la vía canónica de TGF- β en células de NB

Respecto a la comprobación de la activación de la vía de TGF- β , se buscó la presencia de proteínas Smad 2 y 3 y proteínas Smad 2 y 3 fosforiladas mediante Western blot. Para ambas proteínas se esperaba la presencia de una banda entre el peso de 50 y 60 kDa (52.6 kDa específicamente).

Las proteínas Smad 2/3 fueron identificadas en todos los grupos de estudio en células N2A (Figura 8-A), sin embargo; no se encontró señal de las proteínas Smad 2/3 fosforiladas en ningún grupo de estudio. Se ajustaron los parámetros de dilución del anticuerpo primario (Anti-Phospho-Smad2/Smad3) a 1:500

con el fin de detectar señal quimioluminiscente para las proteínas fosforiladas, no se apreció ninguna banda en el peso esperado de 52 kDa (Figura 8-B).

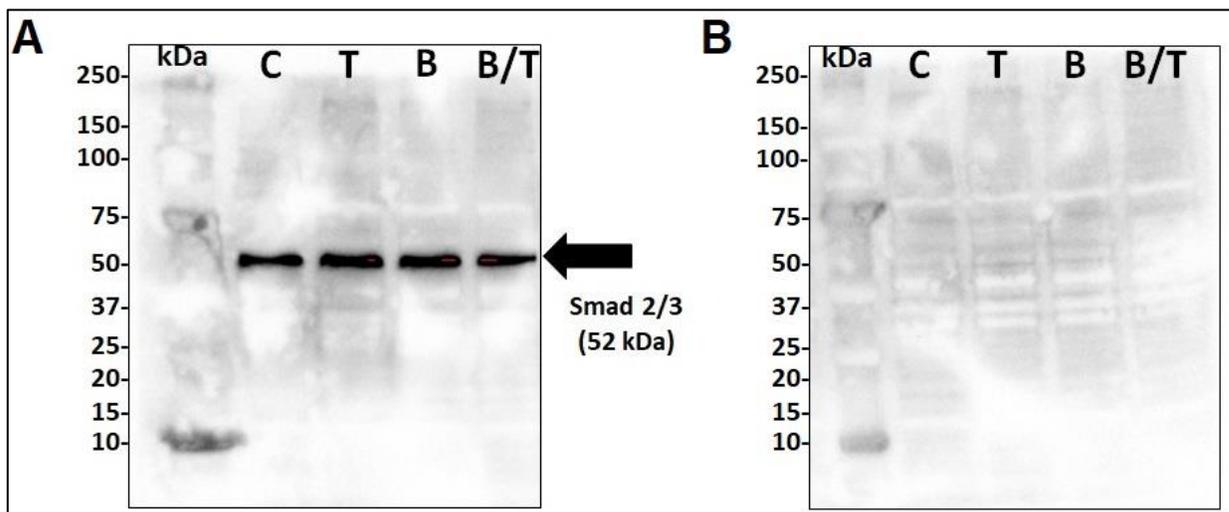


Figura 8. Western Blot para la identificación de proteínas Smad 2/3 y Smad 2/3 fosforiladas en células Neuro-2A. (A) Detección de proteínas Smad 2/3 en 52 kDa. (B) Membrana incubada con anticuerpo primario anti P-Smad2/3 (Smad 2/3 fosforiladas). En ambas membranas se cargaron 40 μ g de proteína por grupo de estudio, las membranas fueron bloqueadas con TBS-T con leche al 5% por dos horas. Se incubaron toda la noche con el anticuerpo respectivo a una dilución de 1:1000. El anticuerpo secundario fue anti-conejo a una dilución de trabajo 1:40,000. Grupos de estudio C: Control, T: TGF- β , B: sBG (Betaglicano soluble) y B/T: sBG, TGF- β .

En el caso de células SK-N-AS se observó el mismo patrón: las proteínas Smad 2/3 fueron identificadas en todos los grupos de estudio, sin embargo; no se detectó señal de las proteínas Smad 2/3 fosforiladas (Figura 9).

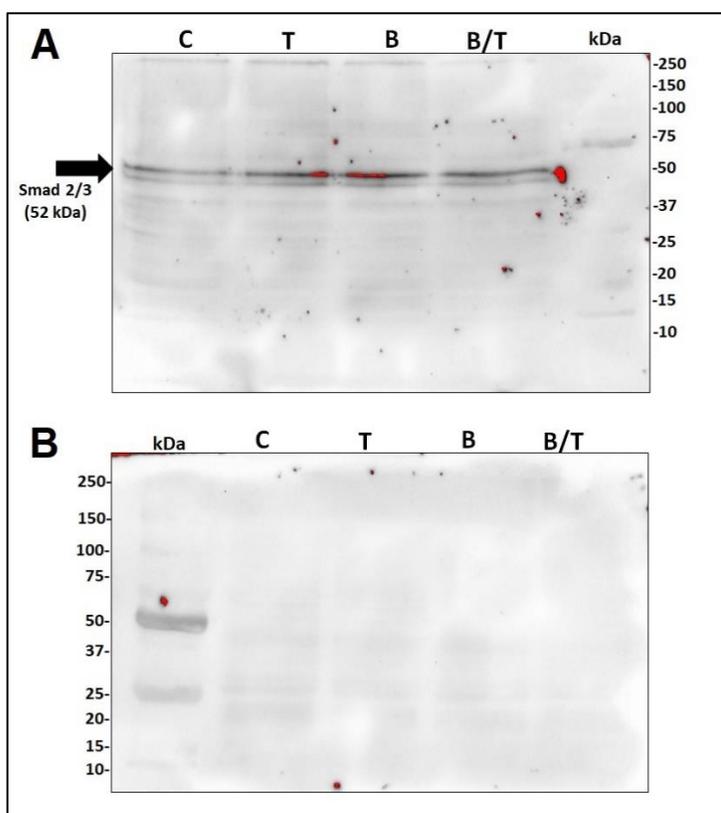


Figura 9. Western Blot para la identificación de proteínas Smad 2/3 y Smad 2/3 fosforiladas en células SK-N-AS. (A) Detección de proteínas Smad 2/3 en 52 kDa. La membrana se incubó con el anticuerpo respectivo a una dilución de 1:1000. (B) Membrana incubada con anticuerpo primario anti P-Smad2/3 (Smad 2/3 fosforiladas) a una dilución 1:500. En ambas membranas se cargaron 50 μ g de proteína por grupo de estudio, las membranas fueron bloqueadas con BSA al 5% por dos horas. El anticuerpo secundario fue anti-conejo a una dilución de trabajo 1:40,000. Grupos de estudio C: Control, T: TGF- β , B: sBG (Betaglicano soluble) y B/T: sBG, TGF- β .

Se buscó la presencia de proteínas Smad 2/3 fosforiladas en ambas líneas celulares de NB (Neuro-2A y SK-N-AS), así como en células MDA-MB-231, mediante fraccionamiento nuclear y para su comparación con la fracción citosólica. En la fracción citosólica se detectó señal leve en un peso molecular correspondiente a 50 kDa para proteínas Smad 2/3 fosforiladas, en las muestras de las células MDA-MB-231 y N2A, sin embargo se observó ruido (señal) de fondo. La detección de proteínas Smad 2/3 es evidente en todas las líneas celulares y en ambos grupos de estudio e incluso la señal es más intensa en el grupo tratado con TGF- β de las células MDA-MB-231 y N2A (Figura 10-A). En la fracción nuclear no se detectó señal para proteínas (Figura 10-B).

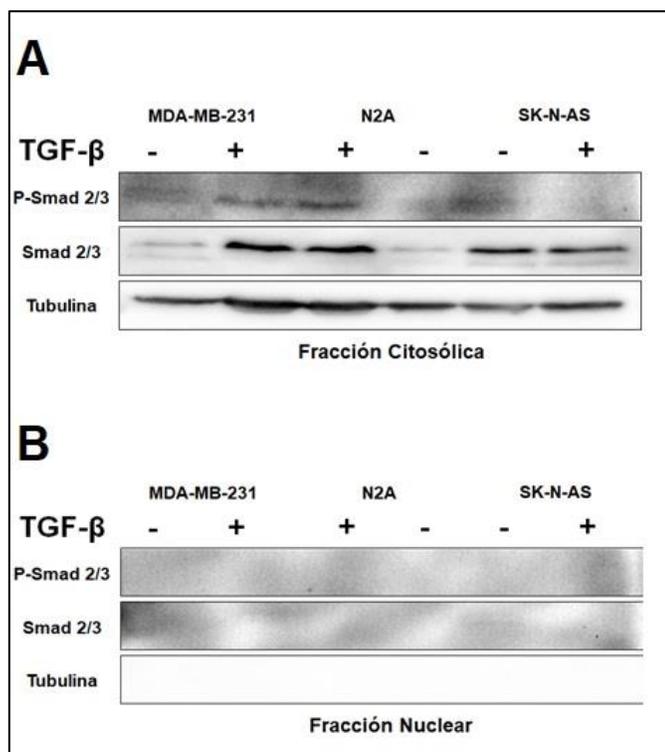


Figura 10. Western blot para detección de la proteína P-Smad2/3 (Smad2/3 Fosforiladas) en células MDA-MB-231, SK-N-AS y Neuro-2A. (A) Fracción citosólica. (B) Fracción nuclear. Las membranas fueron bloqueadas con BSA 5% por dos horas. Se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-P-Smad2/3 una dilución de 1:500 y antiSmad2/3 a una dilución de trabajo de 1:500. El anticuerpo secundario fue anti-conejo a una dilución de 1:40,000. Anti-tubulina 1:4,000 detectado con anti-ratón 1:40,000 como control de carga.

Desafortunadamente no fue posible comprobar la activación de la vía de señalización canónica del TGF- β en las células de NB, consideramos que principalmente fueron problemas técnicos relacionadas con la metodología de Western Blot a pesar de realizar fraccionamiento nuclear y citosólico, ya que tampoco se detectó presencia de las proteínas Smads fosforiladas en las células MDA-MB-231 que se utilizaron como células de control.

A pesar de no comprobar la activación de las proteínas Smad 2/3, la respuesta de las células de NB al TGF- β puede ser evaluada a nivel transcripcional, por lo que el siguiente paso fue la medición de la expresión de genes regulados por el TGF- β en células de NB.

3.1.2 Niveles de expresión de genes regulados por TGF- β en células de NB

Expresión de genes pro metastásicos regulados por el TGF- β en células SK-N-AS

Al confirmar que la expresión de receptores del TGF- β I y II en las células SK-N-AS es similar a las líneas celulares DU145 y MDA-MB-231, se prosiguió a la medición de la expresión relativa de ARNm de los genes *PMEPA1*, *CXCR4* y *PTHrP* en los diferentes grupos de estudio en células SK-N-AS y DU145 mediante PCR en tiempo real.

El objetivo de analizar un grupo expuesto al sBG es comprobar la activación del TGF- β (se espera que los efectos observados en este grupo sean menores que el grupo expuesto al TGF- β). Asimismo, el fundamento de tener un grupo de estudio expuesto a sBG en la fase de pre-tratamiento y posteriormente al TGF- β consiste en primer lugar bloquear la señal de TGF- β presente intrínsecamente en las células y posteriormente analizar el efecto del TGF- β a partir de un estado basal.

Existe evidencia que los genes evaluados (*PMEPA1*, *CXCR4* y *PTHrP*) son regulados por el TGF- β (Fournier, 2015; Kang, 2003 y Yin, 1999).

PMEPA1 (proteína transmembrana de próstata inducida por andrógenos 1, por sus siglas en inglés) es un gen que codifica para una proteína transmembrana que contiene motivos de interacción con proteínas Smads, inducido por andrógenos y otros factores como el TGF- β , factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento derivado de insulina (Nie, 2016 y Fournier, 2015).

En la Figura 11-A se aprecia que las células SK-N-AS del grupo de estudio sBG/TGF- β , elevan la expresión de *PMEPA1* de forma significativa. Por su parte, las células DU145 de ambos grupos de estudio cultivados en presencia del TGF- β presentaron un aumento en la expresión relativa de *PMEPA1* y en ambas líneas celulares se comprobó la inhibición de la expresión de *PMEPA1* en presencia de sBG.

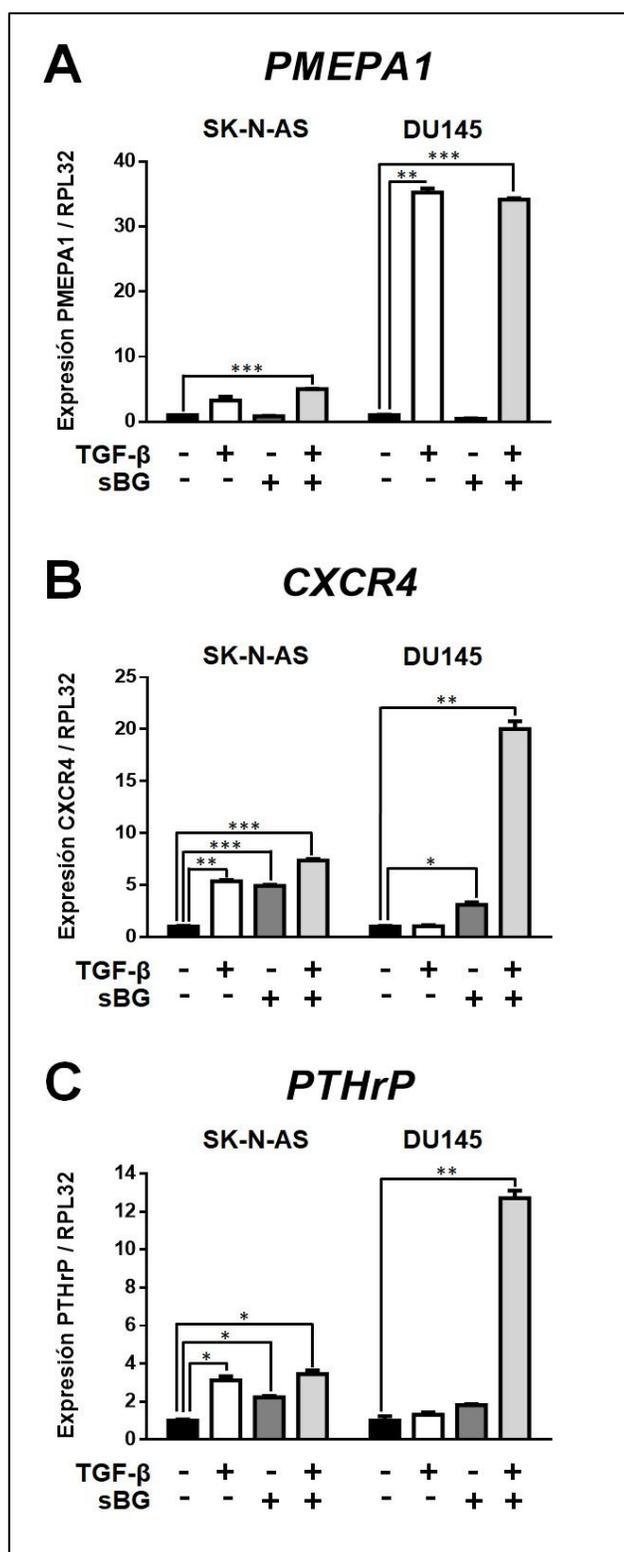


Figura 11. Expresión relativa del ARNm de genes regulados por TGF- β en células DU145 y SK-N-AS. Las células fueron pre tratadas con sBG (5 μ g/ml) \pm tratamiento con TGF- β (5 ng/ml) por 24 horas. Se midió la expresión de los genes *PMEPA1* (A), *CXCR4* (B) y *PTHrP* (C) mediante PCR en tiempo real. Cada línea celular se analizó por separado: Los datos de la gráfica representan la media \pm error estándar de la media (SEM), el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (Datos significativos *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

CXCR4 (receptor de quimiosinas tipo 4, por sus siglas en inglés) gen que codifica para la proteína con el mismo nombre, en cáncer de mama es altamente regulado por el TGF- β (Zhao, 2010) y se ha encontrado sobreexpresión de este gen en más de 23 tipos diferentes de cáncer (Chatterjee, 2014).

Al analizar la expresión relativa de ARNm de *CXCR4* en células DU145 se puede observar una elevación en la expresión relativa de *CXCR4* en el grupo tratado con sBG y de forma notoria el grupo sBG/TGF- β presentó un incremento sustancial en la expresión de ARNm de *CXCR4* a diferencia de los grupos: Control, TGF- β y sBG. Al comparar estos niveles de expresión con las células SK-N-AS se aprecia una elevación significativa en la expresión de *CXCR4* en todos los grupos de estudio, sin embargo, la elevación en el grupo sBG/TGF- β no fue tan marcada como en las células DU145 (Figura 11-B).

PTHrP (péptido relacionado a la hormona paratiroidea) cuando es secretado por células cancerosas puede inducir hipercalcemia en los pacientes, es un gen altamente regulado por el TGF- β y juega un papel protagónico en el establecimiento de metástasis óseas en cáncer de mama (Yin, 1999). Para el caso de la expresión de ARNm de *PTHrP* en las células DU145 se observa un efecto similar que en la expresión de *CXCR4*: las células DU145 del grupo sBG/TGF- β muestran un incremento significativo en la expresión de ARNm de *PTHrP*, sin observarse cambios significativos en los demás grupos respecto al grupo control. Las células SK-N-AS por su parte, presentan un aumento en la expresión relativa de ARNm de *PTHrP* en todos los grupos de estudio comparada con su grupo control y de forma notable se aprecia que en los grupos expuestos al TGF- β de esta línea celular, el nivel de expresión de *PTHrP* fue mayor que el grupo expuesto a sBG (Figura 11-C).

Respuesta de las células Neuro-2A al TGF- β

Para el caso de las células de NB de ratón (Neuro-2A) se analizó la expresión relativa de *PTHrP* y se comparó con la línea celular 4T1 debido a su modulación al ser expuesta al TGF- β (Muraoka, 2002). En la Figura 12 se muestra el análisis de la expresión de *PTHrP* en las líneas celulares de ratón 4T1 comparada con N2A, donde se puede observar que las células de NB no presentan diferencias en la expresión de *PTHrP* en los diferentes grupos de estudio, comparado con la expresión en células 4T1 donde se aprecia el aumento en la expresión de este gen al ser expuestas al TGF- β .

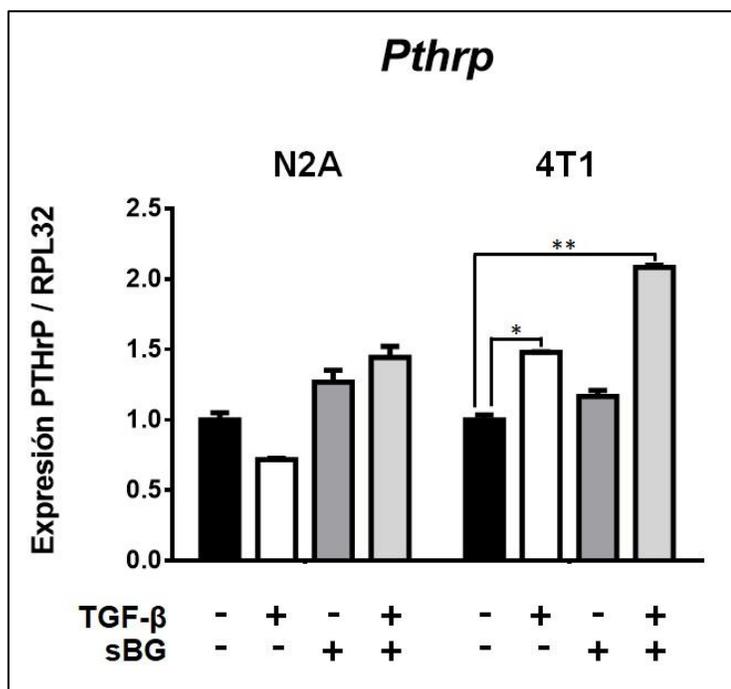


Figura 12. Expresión relativa de PTHrP en células 4T1 y N2A. Las células fueron pre tratadas con sBG (5 μ g/ml) \pm tratamiento con TGF- β (5 ng/ml) por 24 horas. Se midió la expresión del ARNm de *Pthrp* mediante PCR en tiempo real. Cada línea celular se analizó por separado: Los datos de la gráfica representan la media \pm error estándar de la media (SEM), el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (Datos significativos * p < 0.05, ** p < 0.01).

3.2 Efecto de TGF- β en los procesos celulares de migración, proliferación y apoptosis en líneas celulares de NB

3.2.1 El TGF- β aumenta parcialmente la migración en células SKNAS.

Uno de los sellos distintivos de las células cancerosas es la capacidad que poseen para poder invadir tejidos adyacentes y posteriormente desarrollar metástasis. Mediante el ensayo de la herida se evaluó si el TGF- β tiene un efecto en la tasa de migración de las células de NB.

Se llevó a cabo registro fotográfico de la herida en ambas líneas celulares por 72 horas, sin embargo; después de las 56 horas de seguimiento, la proliferación, tanto de células SK-N-AS como N2A para ambos grupos de estudio (Control y TGF- β), generó una confluencia en la monocapa celular \sim 100% por lo que únicamente se evaluaron los cambios hasta las 48 horas de tratamiento (imágenes no mostradas). Se evaluó el área correspondiente a la herida en todos los grupos, con ayuda del software ImageJ se cuantificó el área de la herida.

Como se puede observar en la Figura 13-A y B en las células SK-N-AS aumentó la tasa de migración en el grupo con TGF- β , pero este efecto sólo es significativo hasta las 48 horas de seguimiento y para el caso de las células N2A no se observaron cambios significativos entre los grupos de estudio (Figura 13-C y D).

Una característica particular de las células N2A es el desprendimiento del fondo de la placa al encontrarse en una confluencia mayor del 90%, lo que dificultó la evaluación del área en la región donde fue trazada la herida; ya que se observaban células dentro del área, sin estar adheridas ni tener contacto con las células adherentes (Figura 13-C, 48 horas).

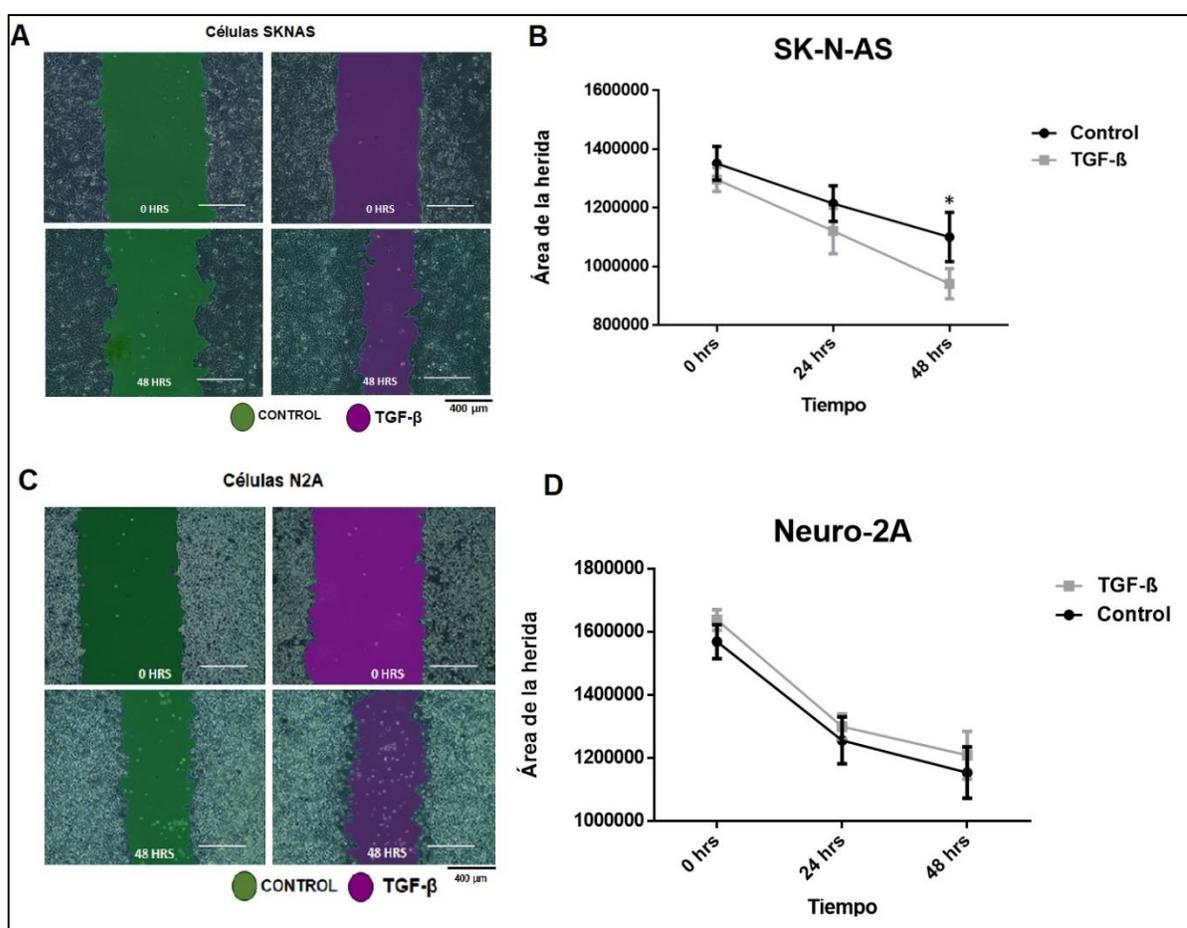


Figura 13. Ensayo de migración en células de NB. Se realizó el ensayo de la herida, se rasgó la monocapa confluyente de células SK-N-AS y Neuro-2A, se llevó a cabo registro fotográfico con microscopio invertido a 10X cada 8 horas para observar la tasa de migración. **(A)** Imágenes representativas de los grupos Control y TGF- β a las 0 y 48 horas en células SK-N-AS. **(B)** Gráfico que muestra la diferencia en el área de la herida a través del tiempo, la medición del área de la herida (región sombreada) se realizó con el programa ImageJ. **(C)** y **(D)** para células Neuro-2A, t de student * $p < 0.05$.

3.2.2 Efecto del TGF- β en la proliferación de células de NB

El efecto en la viabilidad de células de NB de los diferentes grupos de tratamiento fue evaluado mediante ensayo con MTT. En la Figura 14 se observa que el TGF- β aumenta la proliferación de las células de NB (SK-N-AS y N2A) a las 24 horas de tratamiento en comparación el grupo control. Este efecto ya no es significativo a las 48 horas de tratamiento. Para el caso de las células N2A el aumento en la proliferación es significativo para el grupo tratado con sBG/TGF- β a las 24 horas de tratamiento.

El betaglicano soluble (sBG) disminuye la viabilidad de las células de NB.

En ambas líneas celulares se puede apreciar que a las 48 horas de tratamiento con sBG disminuye la viabilidad celular, una característica importante de resaltar en este experimento es el grupo tratado con sBG y TGF- β , ya que en la evaluación inicial de la proliferación a 24 horas se observó un incremento en la viabilidad de las células cancerosas en ambas líneas celulares, siendo significativo únicamente para las células de NB de ratón; pero de forma interesante a las 48 horas de tratamiento, la disminución de la tasa de proliferación es significativa para ambas líneas celulares.

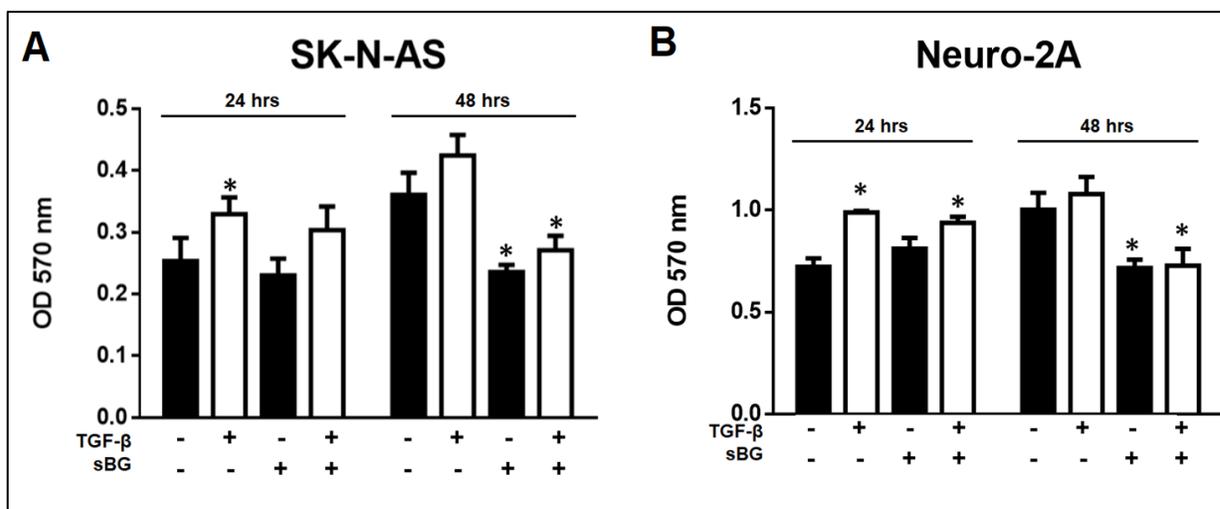


Figura 14. Ensayo de proliferación celular en 24 y 48 horas. Se midió la absorbancia de las células de NB en la presencia de MTT a 570 nm a las 24 y 48 horas de tratamiento. **(A)** Células SK-N-AS, **(B)** Células N2A. Se observan cambios significativos en los grupos tratados con sBG y éstos se acentúan a las 48 horas de tratamiento en ambos linajes celulares. Prueba estadística ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni (*Datos significativos $p < 0.05$).

3.2.3 Efecto del TGF- β en apoptosis en células de NB

Con base en los resultados de proliferación celular, el análisis de apoptosis se realizó únicamente a las 48 horas de tratamiento en ambas líneas celulares. El grupo control positivo para apoptosis fue tratado con solución salina 0.9% durante el mismo periodo de tiempo.

En la Figura 15 se puede observar la morfología de los distintos grupos analizados con aumento 20X, para los grupos controles positivos para apoptosis se puede apreciar el cambio en la morfología celulares respecto a los demás grupos de estudio; se observa menor confluencia, células reducidas en tamaño y de forma esférica. Asimismo, es importante observar la morfología de las células del grupo tratado con sBG/TGF- β , ya que a diferencia de los demás grupos (Control, TGF- β y sBG) se aprecian mayor número de células pequeñas y redondas, así como menor confluencia sobre todo para las células Neuro-2A.

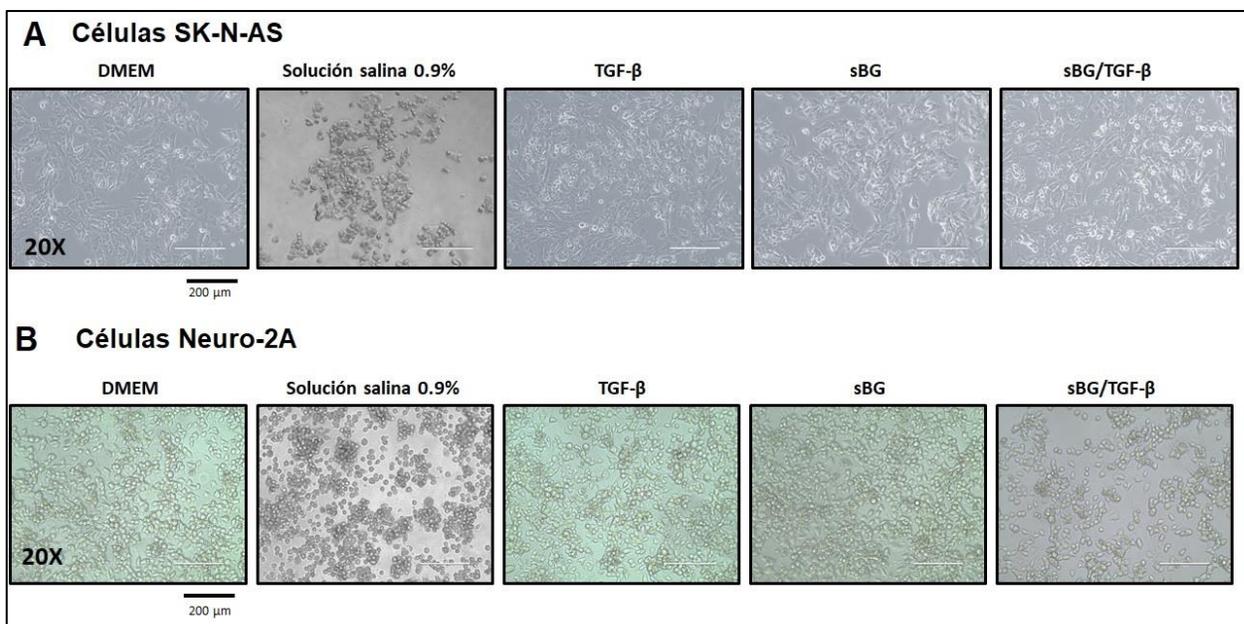


Figura 15. Imágenes representativas de células de NB después de 48 horas de tratamiento de los distintos grupos de estudio para la línea celular SK-N-AS (A) y Neuro-2A (B). En ambos casos se puede apreciar que en las células del grupo tratado con solución salina se presenta un cambio en su morfología, las células se aprecian de menor tamaño, menor confluencia entre ellas y de forma esférica comparadas con los demás grupos de estudio. De igual forma en los grupos tratados con sBG/TGF- β se pueden apreciar células pequeñas y esféricas, así como menor confluencia.

En la Figura 16 se muestra el análisis de apoptosis mediante citometría de flujo con Anexina V y Iodouro de Propidio (IP) para las células SK-N-AS y en la Figura 17 para las células N2A. En los cuadrantes

Q4 se encuentra la población celular viable, los cuadrantes Q3 y Q2 representan las células en apoptosis; en Q3 se localizan las células positivas para Anexina V (apoptosis temprana) y Q2 células en apoptosis tardía (ya que fueron positivas para ambos: Anexina V e IP), finalmente en el cuadrante Q4 se esquematizan las células necróticas (positivas para IP).

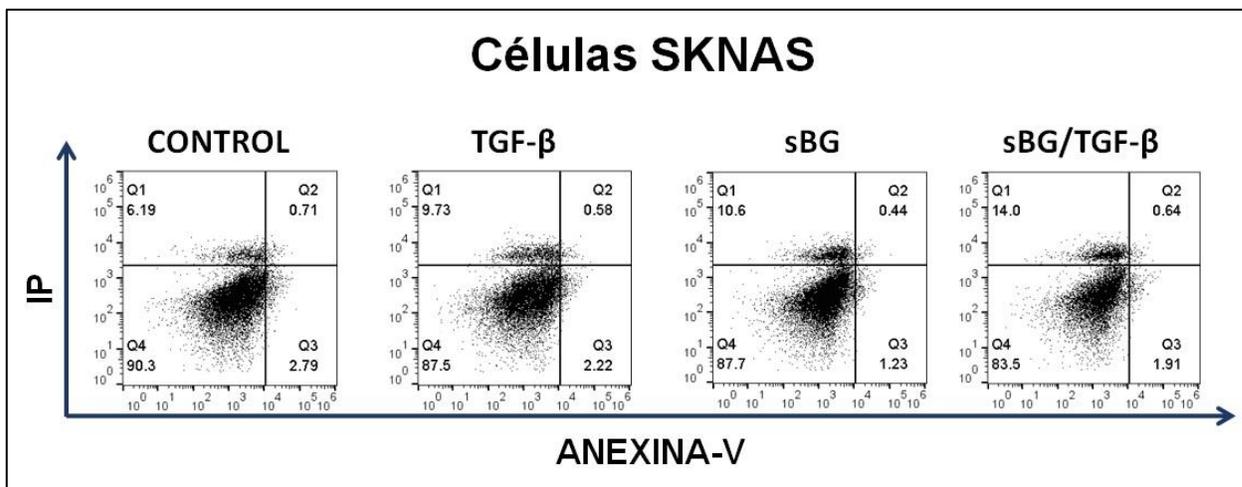


Figura 16. Análisis de apoptosis de células SKNAS en los diferentes grupos de estudio a las 48 horas de tratamiento. Las células fueron teñidas con AlexaFluor® 488-Anexina V / Ioduro de propidio (100 µg/ml), posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo. Se adquirieron 150 µl de cada a una velocidad de 200 µl/min pasando alrededor de 500 eventos por segundo. Se muestran los porcentajes de las distintas subpoblaciones celulares Q1: (+) IP, Q2: (+) IP/Anexina-V, Q3: (+) Anexina-V y Q4 (-).

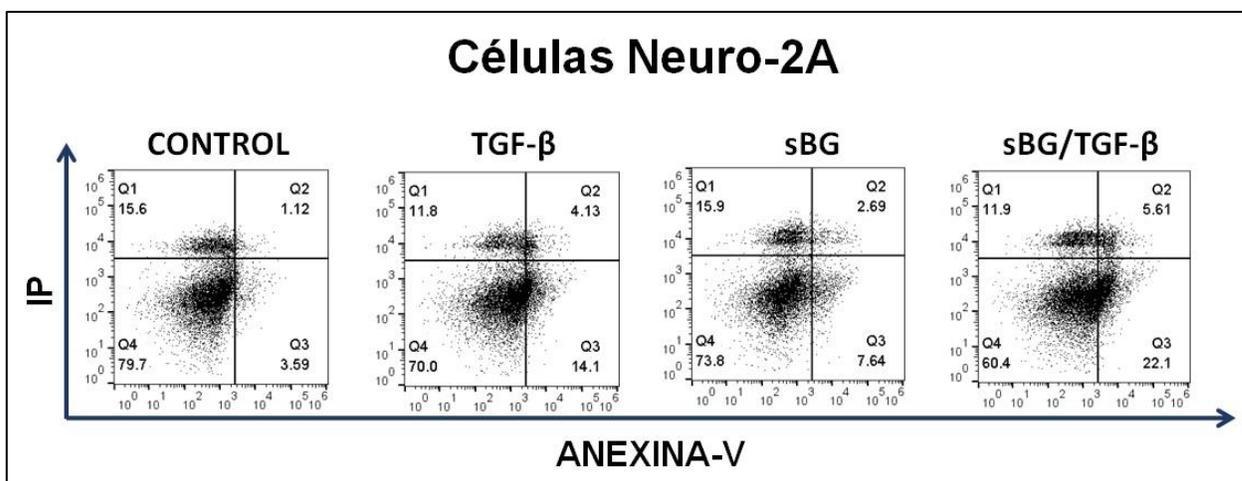


Figura 17. Análisis de apoptosis de células Neuro-2A en los diferentes grupos de estudio a las 48 horas de tratamiento. Las células fueron teñidas con AlexaFluor® 488-Anexina V / Ioduro de propidio (100 µg/ml), posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo. Se adquirieron 150 µl de cada a una velocidad de 200 µl/min pasando alrededor de 500 eventos por segundo. Se muestran los porcentajes de las distintas subpoblaciones celulares Q1: (+) IP, Q2: (+) IP/Anexina-V, Q3: (+) Anexina-V y Q4 (-).

En el análisis de apoptosis de este trabajo se observó que las células SK-N-AS a diferencia de las células N2A, son más resistentes en términos de viabilidad. El porcentaje de células SK-N-AS vivas en todos los grupos de estudio fue cerca del 90%, con excepción del grupo sBG/TGF- β que presentó 83.5% de células vivas. Específicamente en esta línea celular se observó un ligero aumento en la población de células en necrosis de los grupos de estudio comparadas con el grupo control (Tabla 2.).

Tabla 2. Datos obtenidos del ensayo de apoptosis en las células SK-N-AS

Grupo de estudio	Células Viables	Células en Apoptosis Temprana	Células en Apoptosis Tardía	Células en Necrosis
Control	90.3%	2.79%	0.71%	6.19%
TGF- β	87.5%	2.22%	0.58%	9.73%
sBG	87.7%	1.23%	0.44%	10.6%
sBG/TGF- β	83.5%	1.91%	0.64%	14%

Para el caso de las células N2A se observó que la población de las células vivas fue menor en comparación con las células SK-N-AS y de forma notoria el grupo expuesto a sBG/TGF- β presentó alrededor del 20% menos población de células vivas que el grupo control. Respecto a la población de células en necrosis y apoptosis tardía, los cuatro grupos fueron similares. Por otro lado, en la Tabla 3. se observa que las células del grupo sBG/TGF- β presentaron un aumento de la población en apoptosis temprana en comparación con los demás grupos y de forma importante con el grupo Control (22.1% vs 3.59%, respectivamente) (Tabla 3.).

Tabla 3. Datos obtenidos del ensayo de apoptosis en las células Neuro-2A

Grupo de estudio	Células Viables	Células en Apoptosis Temprana	Células en Apoptosis Tardía	Células en Necrosis
Control	79.7%	3.59%	1.12%	15.5%
TGF- β	70%	14.1%	4.13%	11.8%
sBG	73.8%	7.64%	2.69%	15.9%
sBG/TGF- β	60.4%	22.1%	5.61%	11.9%

Estos resultados son compatibles con los datos obtenidos en el ensayo de proliferación, donde se observó una disminución en la viabilidad celular en el grupo tratado con sBG/TGF- β , sin embargo; es preciso complementar el análisis de apoptosis para confirmar si este efecto es significativo.

3.3 Establecimiento de un modelo animal de metástasis ósea de NB

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las células N2A para formar tumor en ratones se realizó inoculación subcutánea de células N2A en los flancos laterales de cada ratón, se evaluaron ocho ratones hembra Balb/C de cuatro semanas de edad y nueve ratones hembra C57/BL6 de la misma edad. De todos los ratones sólo uno desarrolló tumor subcutáneo (Figura 18-A), perteneciente a la cepa de Balb/C que corresponde al 12.5% de esa cohorte de ratones inoculados, el resto de los ratones fueron evaluados por un periodo de seis semanas sin observar desarrollo de tumores en ninguna cepa y en términos globales el peso corporal no disminuyó, lo que indicaba que los animales se encontraban sanos (Figura 19-A).

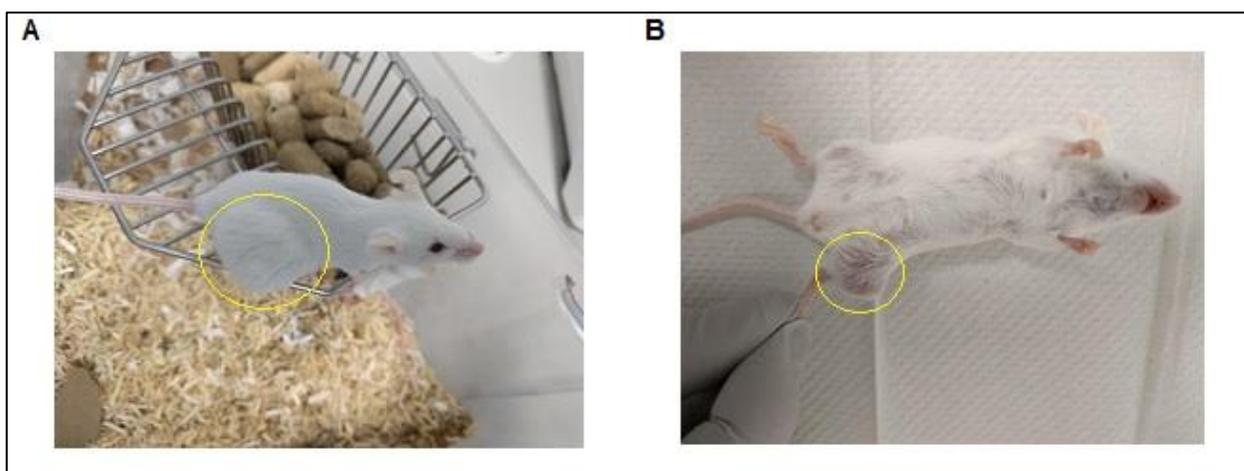


Figura 18. Fotografías de los ratones Balb/C que desarrollaron tumor macroscópico. (A) Ratón que presentó desarrollo de tumor subcutáneo en flanco izquierdo. **(B)** Ratón que desarrolló tumor en rodilla izquierda, 14 días después de la inoculación intratibial.

A pesar de que el porcentaje de ratones Balb/C que formó tumor fue muy bajo se prosiguió a evaluar la formación de tumor mediante inoculación intratibial, para este procedimiento se estudiaron 10 ratones Balb/C de cuatro semanas de edad, se inocularon 2×10^5 células N2A en la región proximal de

ambas tibias, durante el experimento dos ratones murieron posterior a la inoculación intratibial, posiblemente a causa del cóctel anestésico y aunado a la inoculación.

Respecto al peso corporal, en toda la población de estudio disminuyó alrededor de un gramo posterior a la intervención, sin embargo, después del día 10 todos los animales recuperaron el peso y la tendencia en toda la cohorte fue un aumento gradual del peso corporal, a excepción de un ratón que desarrolló tumor macroscópico en la extremidad pélvica izquierda (Figura 17-B).

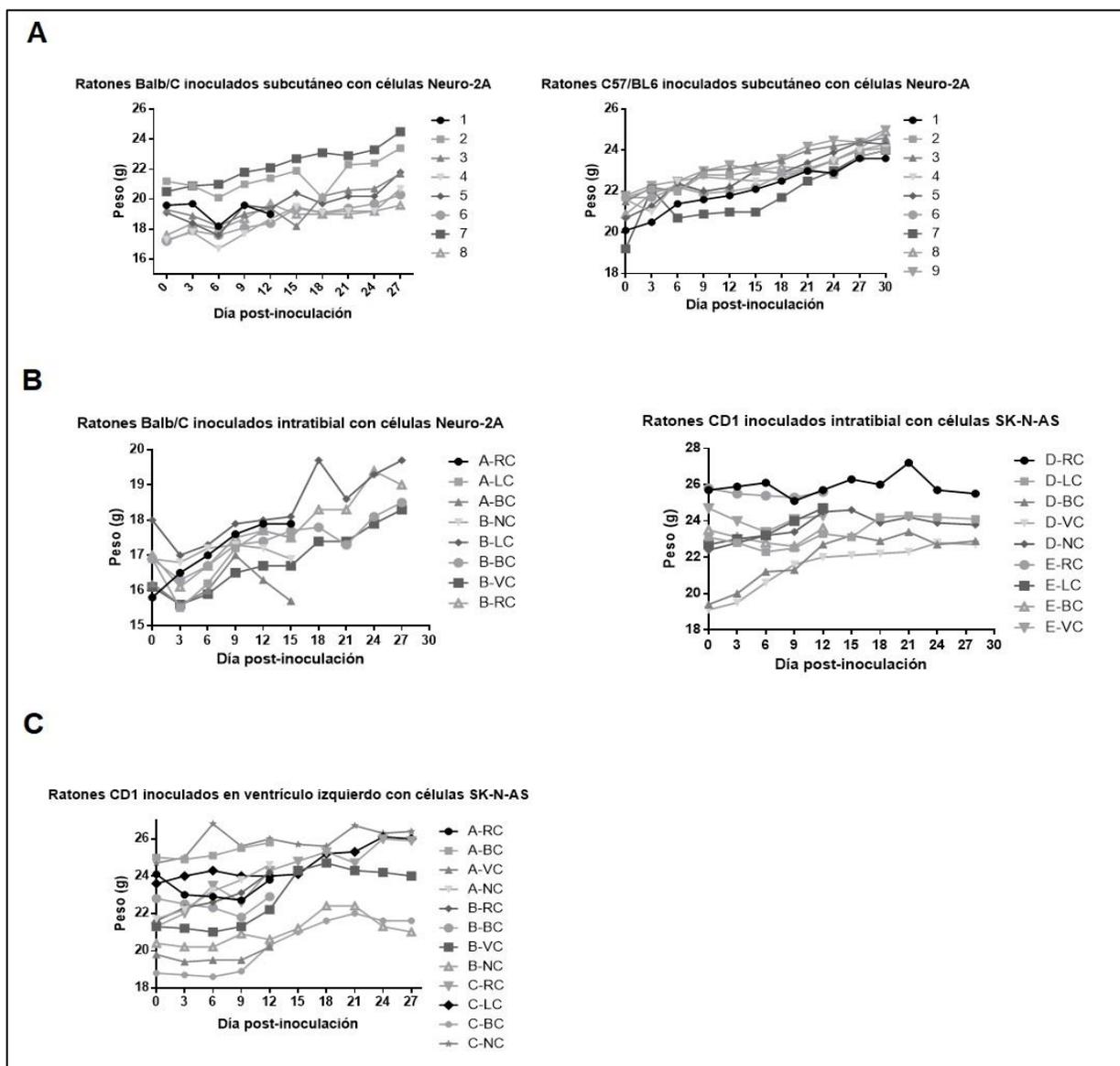


Figura 19. Gráficos que muestran la fluctuación en el peso corporal de los ratones como parámetro de bienestar. **(A)** Ratones Balb/C (izquierda) y C57/BL6 (derecha) inoculados con células Neuro-2A en flancos laterales. **(B)** Ratones con inoculación intratibial de células Neuro-2A (izquierda) y células SK-N-AS (derecha). **(C)** Ratones CD1 Nu/Nu inoculados con células SK-N-AS en ventrículo izquierdo.

Para los ratones que recibieron inoculación intratibial o intracardiaca el periodo de seguimiento fue de 14 y 28 días, el tiempo se determinó con lo descrito por Tsutsumimoto, 2016 y en experimentos realizados dentro del Grupo de Cáncer y Hueso (CICESE); al concluir el periodo de seguimiento en cada grupo, los ratones se sacrificaron y se disecaron ambas extremidades pélvicas para su análisis con estudios radiográficos.

En la Figura 20 se observan las imágenes de Rayos X de los ratones Balb/C con inoculación intratibial de células N2A. De los ocho ratones inoculados, sólo dos formaron tumor macroscópico, que corresponde al 25%, sin embargo, la formación tumoral se localiza en tejido blando y en ningún individuo inoculado de esta cohorte se aprecian lesiones radiolúcidas que indicarían presencia de metástasis óseas.

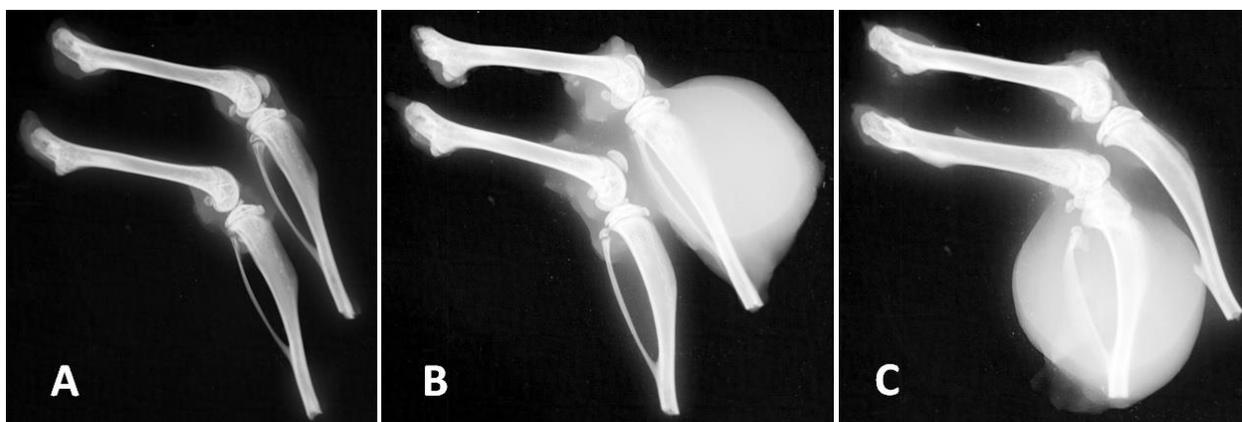


Figura 20. Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intratibial de células Neuro-2A. (A) Se muestra imagen de Rayos X de miembros pélvicos de ratón Balb/C que no desarrolló tumor macroscópico, no se observan lesiones radiolúcidas para comparación con **(B y C)** Se observa formación de tumor en tejido blando en región proximal de la tibia, no se observan lesiones osteolíticas.

En la Figura 21 se muestran las imágenes de Rayos X representativas de los miembros pélvicos de los ratones con inoculación intratibial de células SK-N-AS en ratones Nu/Nu de seis a ocho semanas de edad. De esta cohorte de ratones inoculados, dos de ellos formaron tumor macroscópico, que corresponde al 22.2% de los animales intervenidos. De forma notoria los individuos que formaron tumor macroscópico presentaron pérdida de la continuidad en el tejido ósea en la región proximal de la tibia, ambos fueron sacrificados a los 28 días posteriores a la inoculación intratibial (Figura 21).



Figura 21. Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intratibial de células SK-N-AS. (A) Se muestra imagen de rayos X de ratón que desarrolló tumor macroscópico, se observa presencia de región radiolúcida en región proximal de la tibia (flecha). **(B)** Rayos X de ratón que formó tumor macroscópico, se observa presencia de lesión radiolúcida en ambas tibias (flechas).

En la Figura 22 se muestran las imágenes de Rayos X representativas de los miembros pélvicos de los ratones con inoculación intracardiaca de células SK-N-AS en ratones Nu/Nu de seis a ocho semanas de edad. En ninguno de los ratones inoculados se apreciaron lesiones radiolúcidas indicativas de osteólisis.

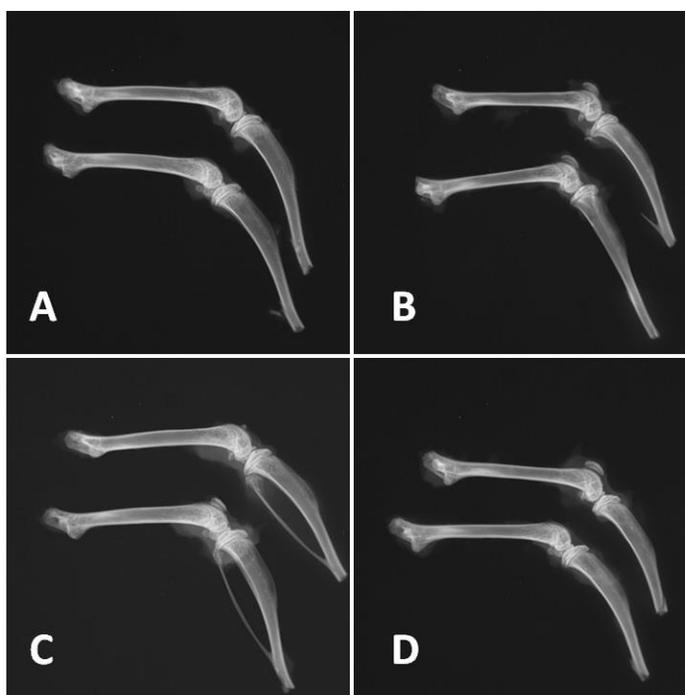


Figura 22. Imágenes radiográficas representativas de los miembros pélvicos de ratones con inoculación intracardiaca de células SK-N-AS. No se observan lesiones radiolúcidas. **(A y B)** Corresponden a ratones que fueron sacrificados a los 14 días posteriores a la inoculación en ventrículo izquierdo, **(C y D)** fueron ratones sacrificados a los 28 días posteriores a la intervención.

Capítulo 4. Discusión

El TGF- β tiene un papel clave en diferentes etapas del desarrollo del sistema nervioso, por lo que los procesos celulares que regula (principalmente proliferación y migración) son clave en la fisiopatología del NB. Las células que presentan una transformación y dan origen al desarrollo de NB pertenecen a un linaje que no ha sido completamente diferenciado y el grado de diferenciación correlaciona con el grado de agresividad de la enfermedad y pronóstico en los pacientes.

4.1 Respuesta de las células de NB a TGF- β

Las células SK-N-AS de forma similar que otras células cancerosas como las células MDA-MB-231 (cáncer de mama) y las células DU145 (cáncer de próstata) expresan niveles similares de receptores del TGF- β . Esta expresión de receptores concuerda con lo reportado en muestras de pacientes con estadios avanzados de NB (Iolascon, 2000) quienes observaron presencia de T β RI y T β RII en estudios inmunohistoquímicos en biopsias de pacientes con NB y ausencia del T β RIII y comprobaron dichos resultados mediante RTqPCR.

En el siguiente nivel de la cascada de señalización del TGF- β se encuentran las proteínas intracelulares Smad 2/3 que al ser fosforiladas se unen a la proteína Smad4, ingresan al núcleo y se inicia la activación o inhibición de genes, para generar una respuesta celular.

4.1.1 Activación de la vía de señalización de TGF- β mediada por proteínas Smad 2/3

Una de las principales limitantes en la detección de las proteínas Smad 2/3 fosforiladas que nos indicarían la activación de esta vía de señalización fue la baja o nula señal obtenida en los Western blot. Para poder ver las proteínas fosforiladas utilizamos el anticuerpo con la menor dilución posible, sin embargo, esto derivó en poca especificidad del anticuerpo anti-P-Smad 2/3 utilizado, ya que se observaron diversas bandas en diferentes pesos moleculares en el grupo correspondiente a células MDA-MB-231, aunque se detecte la presencia de bandas en el peso molecular esperado (52 kDa) lo que podría indicar una señal cruzada con otras proteínas.

Por otro lado, una posible razón por la cual no se detecte la presencia de proteínas Smad 2/3 fosforiladas en las células de NB podría ser la activación de vías alternas para el establecimiento de metástasis óseas, como podría ser la vía MAPK (Knelson, 2014). Sin embargo; al no detectar señal en las células MDA-MB-231, se podría asumir un error en la metodología o anticuerpo utilizado.

A pesar de no haber comprobado la activación de la vía canónica de señalización del TGF- β , en este trabajo realizamos análisis de la expresión de genes blanco en células de NB.

4.1.2 Efecto del TGF- β en la expresión de genes pro-metastásicos en células de NB

En este proyecto se analizó la expresión de genes que son altamente regulados por TGF- β en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer (mama, próstata, melanoma, entre otros), estos genes favorecen el establecimiento y desarrollo de metástasis óseas (Yin, 1999; Kang, 2005; Javelaud, 2007; Fournier, 2015).

Las células SK-N-AS elevan la expresión de *PMEPA1* al ser cultivadas en presencia del TGF- β . Sin embargo, es notable la diferencia que existe entre las células DU145 y las células SK-N-AS. La expresión de este gen no se ha reportado anteriormente en líneas celulares de NB y la principal razón por la que se analizó la expresión de dicho gen en las células de NB, se debe a que *PMEPA1* es un gen inducido por el TGF- β (Watanabe, 2009). Una de las razones por la que podría existir esta diferencia es el linaje celular, Xu *et. al.* (2003) reportaron que la expresión de *PMEPA1* es muy abundante en tejido prostático y su expresión está restringida a células epiteliales de próstata.

Para el caso de *CXCR4* y *PTHrP* es muy evidente la diferencia en expresión del grupo sBG/TGF- β en células DU145 comparadas con SK-N-AS, sin embargo; se observa una elevación de la expresión relativa de *CXCR4* en las células de NB al ser expuestas tanto a TGF- β como sBG.

Al respecto, Shankar *et. al.* (2015) analizaron la expresión de *CXCR4* en 20 líneas celulares de NB y observaron que existe una gran heterogeneidad y las clasificaron dependiendo su potencial invasivo, sin embargo; no utilizaron la línea SK-N-AS. Por otro lado existen varias investigaciones (Germinder *et al.*, 2001 y Liberman *et al.*, 2012) donde se reporta que la expresión de *CXCR4* en células de NB juega un papel fundamental para la proliferación y quimiotaxis de las células cancerosas al sitio de metástasis, en

particular Germinder (2001) reporta que el desarrollo de metástasis óseas en NB está regulada por el acoplamiento de CXCR4 con su ligando SDF-1 (Factor 1 derivado del estroma celular, por sus siglas en inglés), pero al llegar las células cancerosas al hueso disminuye la expresión de *CXCR4* en el sitio metastásico. Esto podría explicar la sutil expresión que se observó en esta investigación (comparada con las células DU145) y que es ligeramente estimulada por TGF- β .

Finalmente para la expresión de *PTHrP* se observa el mismo patrón de expresión de *CXCR4*. *PTHrP* es un gen altamente regulado por el TGF- β y tiene un papel muy importante en el desarrollo de lesiones osteolíticas y osteoblásticas en metástasis de cáncer de mama y próstata, respectivamente (Yin *et. al.*, 1999 y Liao *et. al.*, 2008). De Torres *et. al.* (2009) reportan que la expresión de *PTHrP* en tumores neuroblásticos es directamente proporcional al grado de diferenciación del tejido tumoral, en esta investigación se utilizó una línea celular de NB que se aisló de un tumor agresivo (metastásico) y poco diferenciado por lo que esto podría dar respuesta a la baja expresión que se encontró de *PTHrP* para el caso de la línea celular SK-N-AS.

Respecto a las células N2A que fueron aisladas de un tumor espontáneo en ratón albino, la baja regulación que presentan posterior a la exposición al TGF- β o sBG puede ser debida a que no son una estirpe agresiva en comparación a las células 4T1, las cuales derivan de lesiones metastásicas en ratones con cáncer de mama (Lelekakis, 1999).

4.2 Efecto de TGF- β en procesos celulares

4.2.1 Migración

Uno de los múltiples procesos celulares que regula el TGF- β es la diferenciación de las células (Massagué, 1998), en el caso particular de las células de NB se conoce que existe una alteración en el proceso migración de las células de las crestas neurales que aunado a otras alteraciones genéticas, dan origen a la transformación maligna de estas células (Matthay, 2016).

Los ensayos de migración celular realizados en este trabajo, fueron evaluados mediante el ensayo de la herida. Se realizaron diversos ensayos preliminares con el objetivo de evaluar el cierre de la herida en las células de NB, la principal característica que se consideró fue el porcentaje de SFB que se adicionó

al medio de cultivo. La única ocasión en la que se cerró por completo el área de la herida, en ambas líneas celulares de NB, fue al realizarse el ensayo con medio de cultivo suplementado con 10% de SFB sin periodo de inanición; esto dificulta la evaluación de la tasa de migración porque es complejo evaluar si el cierre fue debido a migración de las células o proliferación de las mismas.

Nuestros resultados mostraron que las células de NB de humano (SK-N-AS) presentan mayor tasa de migración al ser expuestas a TGF- β , por su parte, las células de ratón (N2A) no mostraron diferencias entre los grupos de estudio.

El aumento en la tasa de migración en las células SK-N-AS del grupo expuesto al TGF- β puede estar dado por cambios en el citoesqueleto como lo sugiere Scarpa *et al.* (1996), quienes reportaron que las células SK-N-AS al ser tratadas con TGF- β presentan cambios morfológicos consistentes en el aumento de prolongaciones citoplásmicas largas y delgadas (denominados neurofilamentos) a diferencia de su contraparte no expuesta a la citocina, este cambio en la morfología no fue tan evidente como lo reporta Scarpa; sin embargo, podría explicar la diferencia que se observa en la disminución del área de la herida. Estos resultados también coinciden con Luo *et al.* (1999) quienes demuestran que células de NB expuestas al TGF- β presentan alteraciones en la migración neuronal y que son ocasionados por la expresión de moléculas de adhesión celular asociadas a tejido neural (N-CAM, por sus siglas en inglés). Por otro lado, Shao *et al.* (2017) reportaron que el TGF- β promueve la migración en células de NB (SK-N-SH) y este efecto es mediante la vía independiente de proteínas Smads, lo que demuestra consistencia con los resultados del ensayo de migración de este trabajo.

Para las células de ratón (N2A) el TGF- β no tuvo un efecto en la tasa de migración, incluso en ningún grupo de estudio se observó el cierre completo de la herida; este resultado contrasta con lo reportado por Arumugam *et al.* (2016), quienes observan ~100% del cierre de la herida en su ensayo de migración con células N2A. Una gran diferencia entre las metodologías fue que los autores realizan el ensayo con medio de cultivo adicionado con 10% de SFB, sin exponer las células a un periodo de inanición. En contraste, para el ensayo de migración de células N2A de este proyecto, los cultivos celulares se expusieron a un periodo de inanición durante ocho horas y el ensayo se llevó a cabo con medio de cultivo con 5% de SFB, con el fin de evaluar la capacidad de migración de las células y el cierre de la herida no sea a causa de proliferación de las mismas.

En nuestros resultados, el cierre incompleto de la herida en las células N2A podría ser a causa del efecto que provoca el periodo de inanición en esta línea celular en particular, aunado al medio de cultivo

con bajo porcentaje de SFB en el que se llevó a cabo el ensayo de migración de este proyecto. Zeidler *et al.* (2017) demostraron que el periodo de inanición en las células N2A, induce la diferenciación de las células a neuronas, éstas son metabólicamente más activas, lo cual aumenta el tiempo de división celular además de presentar una menor capacidad para almacenar nutrientes en comparación con el fenotipo neuroblasto (Zeidler, 2017). Esto podría explicar que el cierre de la herida que observamos en el ensayo preliminar sea debido a proliferación de las células N2A.

4.2.2 Proliferación

En los resultados del ensayo de proliferación a las 24 horas de exposición al TGF- β , en ambas líneas celulares (SK-N-AS y N2A) se observó un aumento significativo en la tasa de proliferación de células de NB, este resultado es consistente con lo reportado por Scarpa *et al.* (1996) quienes demuestran que el TGF- β participa en la diferenciación de las células de las crestas neurales a neuronas, sin embargo; en las células de NB, el TGF- β no induce la diferenciación y por consecuencia las células cancerosas presentan una tasa de proliferación mayor que las células no cancerosas.

Por otro lado, Luo *et al.* (1999) demostraron que los efectos en la viabilidad celular en NB son inducidos mediante la activación de la vía de señalización de ERK (MAPK). El TGF- β puede señalizar a través de vías alternas como ERK, por lo tanto; si los efectos observados en las células de NB son mediados por el TGF- β , ERK requiere ser determinado y esto daría respuesta a la baja regulación del TGF- β que se observó en la medición de genes metastásicos en este proyecto.

En contraste con los resultados anteriores, tanto las células SK-N-AS como las células N2A, presentan una disminución significativa de la viabilidad celular en los grupos expuestos a sBG durante 48 horas. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Knelson *et al.* (2014), quienes reportan que determinados factores solubles localizados en el estroma de tumores de pacientes con NB inducen la diferenciación de las células cancerosas provocando disminución en la proliferación de las células de NB. Uno de los factores solubles propuestos por este grupo es el sBG, el cual actúa como un potente antagonista del TGF- β , al secuestrar al ligando y disminuir la concentración extracelular disponible del TGF- β (López-Casillas, 1993).

Se han demostrado efectos similares del sBG en otras líneas celulares de cáncer, Bandyopadhyay *et. al* (2005) reportó el efecto *in vivo* de sBG en ratones inoculados con células DU145 (cáncer de próstata) y por su parte, Elderbroom *et. al.* (2014) demostraron que el sBG disminuye la migración e invasión de las células MDA-MB-231 y concluyen que la cantidad de sBG endógeno está inversamente relacionada con el potencial metastásico de las células *in vitro* e *in vivo*.

4.2.3 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular fundamental en los organismos multicelulares, se encuentra altamente regulado y organizado. Específicamente en NB, el mecanismo de apoptosis de células tumorales juega un papel clave en los pacientes que presentan regresión espontánea; sin embargo, para los casos de NB de Alto Riesgo se han reportado defectos a distintos niveles de la vía de señalización de apoptosis que se relacionan estrechamente con la agresividad de la enfermedad (Li, 2013).

En el análisis de apoptosis de este trabajo se observó que las células de NB expuestas a sBG/TGF- β presentan menor porcentaje de células vivas y los porcentajes en los grupos de necrosis y apoptosis son diferentes para ambas líneas celulares, lo que sugiere que los mecanismos de muerte que están sucediendo en las células de NB de humano son diferentes a los que ocurren en las células de NB de ratón. Sin embargo, resulta imprescindible analizar nuevamente el efecto del TGF- β y sBG en apoptosis, y en diferentes periodos de exposición, para confirmar si el aumento de la población en necrosis de células SK-N-AS, así como el aumento de células en apoptosis temprana de células N2A, son significativos. De ser cierto y aunado a los resultados de proliferación, se podría asumir que el sBG provoca una disminución en la viabilidad de las células de NB y conforme a lo reportado por Knelson *et. al.* (2014) se podría considerar que dentro de los factores solubles propuestos por dicho autor, el sBG juega un rol protagónico en la proliferación de células de NB.

4.3 Establecimiento de un modelo murino de metástasis ósea en NB

El descubrimiento de blancos terapéuticos basados en la caracterización genética en metástasis óseas de cáncer de mama, melanoma y próstata ha sido posible, en parte, gracias al establecimiento de modelos

murinos que permiten imitar las características más sobresalientes de la diseminación de células cancerosas al tejido óseo.

En el caso de NB metastásico óseo, el establecimiento de modelos animales ha sido más complicado por la edad en que se desarrolla este tipo de cáncer; una de las características de los modelos de metástasis ya establecidos es la utilización de ratones en determinada edad (cuatro a seis semanas de vida) que corresponde a una etapa juvenil o adulta temprana, esta es la primera dificultad que debe ser valorada para el caso de NB, ya que es un tipo de tumor que se desarrolla en edades muy tempranas y que se origina a partir de células neurales progenitoras que presentan una heterogeneidad espacial y temporal considerable (Dyer, 2004).

En este trabajo evaluamos tres diferentes vías de inoculación para el establecimiento del modelo murino de NB. En la inoculación subcutánea evaluamos la capacidad de las células para formar tumores primarios, en la inoculación intratibial e intracardiaca evaluamos la capacidad de formar tumores en el tejido óseo.

Existen diversos modelos murinos de metástasis ósea en NB como son inoculación de células de NB en región retroperitoneal (Katsanis, 1994), inoculación de células cancerosas en la vena lateral de la cola (Bogenman, 1996), xenoinjertos derivados de tejido tumoral en pacientes con NB de alto riesgo (Sartelet, 2012; Zhao, 2012; Braekeveldt, 2016) así como inoculación sistémica (Tsutsumimoto, 2016; Seong, 2017) de células de NB; en los cuales se reporta el desarrollo de lesiones metastásicas en periodos de seguimiento prolongados (más de ocho semanas de seguimiento).

A diferencia de estos modelos murinos de NB metastásico a hueso, en nuestro modelo animal de inoculación intratibial se determinaron dos periodos de Fin de Seguimiento que fueron a los 14 y a los 28 días posteriores a la inoculación, esto fue definido con base en resultados previos de inoculación intratibial dentro del Grupo de Cáncer y Hueso (CICESE) y el promedio de aparición de las primeras lesiones metastásicas observadas en publicaciones de Tsutsumimoto et al. (2016) y Seong et al. (2017).

Una de las principales fortalezas del modelo animal de este proyecto fue acelerar el tiempo de desarrollo de metástasis al inocular las células tumorales directamente en el tejido óseo, con el objetivo que pudiera ser más compatible con el tiempo de desarrollo de metástasis en los pacientes con NB de alto riesgo, en quienes las lesiones se desarrollan en un periodo de tiempo muy corto; para ello, al realizar la

inoculación intratibial se forzó a limitar el daño en tejido óseo y disminuir el tiempo de seguimiento en los animales de estudio.

Nuestros resultados en ratones Balb/C inoculados con células Neuro-2A muestran que esta línea celular es capaz de desarrollar tumores primarios, sin embargo, las células de NB de ratón no poseen la agresividad para dañar el tejido óseo. Por otro lado, la formación tumoral que se apreció en los dos ratones posiblemente sea debida a una localización de las células fuera del tejido óseo en el momento de la inoculación intratibial, lo que provocó el desarrollo de tumor en tejido muscular.

Uno de los principales factores a considerar de los ratones CD1 Nu/Nu inoculados con células SK-N-AS en la región intratibial, fue el desarrollo de lesiones líticas. Este resultado coincide con lo reportado por Tsutsumimoto *et. al.* (2016) quienes observan lesiones osteolíticas en miembros pélvicos de ratones inoculados con la misma línea celular, sin embargo, ellos emplean la inoculación de las células en el ventrículo izquierdo de los ratones y su periodo de seguimiento fue de seis semanas.

Una de las fortalezas de nuestro modelo de inoculación intratibial fue la formación de lesiones osteolíticas en un periodo de 28 días en comparación con los 69 días de seguimiento que reportaron Seong *et. al.* (2017) para observar lesiones osteolíticas en su modelo murino de NB metastásico.

A pesar de que el porcentaje de ratones que formó tumor fue bajo (22.22%) en el grupo que recibió inoculación intratibial con células SK-N-AS, el desarrollo de lesiones líticas en tejido óseo es evidente; por lo que sería recomendable inocular diferente cantidad de células para aumentar la probabilidad de desarrollar tumor, así como emplear una cohorte de ratones más homogénea en edad y peso para definir con mayor claridad las condiciones fenotípicas más favorables de los ratones de estudio para formar metástasis ósea y posteriormente aprovechar este modelo animal de NB para describir nuevas estrategias terapéuticas en el NBm.

Capítulo 5. Conclusiones

Este proyecto evaluó el patrón de expresión de genes que favorecen el desarrollo de metástasis óseas y que son altamente regulados por el TGF- β , específicamente *PMEPA1*, *CXCR4* y *PTHrP*. Se logró establecer que el TGF- β regula la expresión de genes en las células de neuroblastoma de humano (SK-N-AS), sin embargo; los niveles de expresión relativa de los genes evaluados son muy diferentes a los que presentan las células de cáncer de próstata, a pesar de tener niveles similares de los receptores I y II del TGF- β . Por otro lado, las células de NB de ratón (Neuro 2A) no presentan modulación en la expresión relativa de PTHrP al ser expuestas al TGF- β .

Respecto a los procesos celulares analizados en este trabajo, se estableció que el TGF- β aumenta de forma parcial la tasa de migración en las células SK-N-AS y no presenta un efecto significativo en la proliferación celular. Por otro lado, se observó que el betaglicano soluble (inhibidor del TGF) disminuye la proliferación de las células de NB de forma significativa a las 48 horas de exposición y nuestro análisis de apoptosis sugiere que la viabilidad celular disminuida que se observó en las células N2A sucede por la vía de apoptosis, sin embargo; este ensayo requiere ser comprobado.

Finalmente, se logró establecer un modelo murino de metástasis ósea de NB con células SK-N-AS siendo la vía intratibial la mejor intervención para su desarrollo.

Capítulo 6. Perspectivas

- Analizar el efecto del sBG en los procesos celulares de migración e invasión. Confirmar la vía de muerte celular que presentan las células de NB al ser expuestas tanto al TGF- β como al sBG, así como evaluar diferentes concentraciones y tiempo de exposición; para comprobar que en efecto el sBG podría ser una estrategia terapéutica en los estadios avanzados de NB.
- Evaluar si los efectos tanto del TGF- β como del betaglicano soluble (sBG) se llevan a cabo mediante la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), u otras vías alternas.
- Optimizar el modelo murino de NB metastásico óseo ya establecido, inoculando diferente cantidad de células de NB, con el fin de aumentar la frecuencia de metástasis óseas.
- Evaluar el efecto *in vivo* de sBG en el modelo murino de metástasis ósea en NB y su potencial como agente terapéutico en etapas avanzadas de NB.

Literatura citada

- Arumugam, P., Subramanian, R., Priyadharsini, J. V., y Gopalswamy, J. (2016). Thymoquinone inhibits the migration of mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells by down-regulating MMP-2 and MMP-9. *Chinese journal of natural medicines*, 14(12), 904-912.
- Bandyopadhyay, A., Wang, L., López-Casillas, F., Mendoza, V., Yeh, I. T., y Sun, L. (2005). Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *The Prostate*, 63(1), 81-90.
- Bogenmann, E. (1996). A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. *International Journal of Cancer*, 67(3), 379-385.
- Braekveldt, N., Wigerup, C., Tadeo, I., Beckman, S., Sandén, C., Jönsson, J., Erjefält, J. S., Berbegall, A. P., Börjesson, A., Backman, T., Øra, I., Navarro, S., Noguera, R., Gisseelsson, D., Pählman, S., y Bexell, D. (2016). Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts reflect the microenvironmental hallmarks of aggressive patient tumours. *Cancer Letters*, 375(2), 384-389.
- Chatterjee, S., Azad, B. B., y Nimmagadda, S. (2014). The intricate role of CXCR4 in cancer. En: *Advances in cancer research*. Academic Press, pp. 31-82.
- De Torres, C., Beleta, H., Díaz, R., Toran, N., Rodríguez, E., Lavarino, C., García, I., Acosta, S., Suñol, M., y Mora, J. (2009). The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer*, 115(12), 2792-2803.
- DuBois, S. G., Kalika, Y., Lukens, J. N., Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Atkinson, J. B., Haase, G. M., Black, C. T., Pérez, C., Gerbing, R., Stram, D. O., y Matthay, K. K. (1999). Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 21, 181-189.
- Dyer, M. A. (2004). Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *Journal of Clinical Pathology*, 57(6), 561-576.
- Elderbroom, J. L., Huang, J. J., Gatzka, C. E., Chen, J., How, T., Starr, M., Nixon, a., y Blobe, G. (2014). Ectodomain shedding of TβRIII is required for TβRIII-mediated suppression of TGF-β signaling and breast cancer migration and invasion. *Molecular biology of the cell*, 25(16), 2320-2332.
- Fajardo, G., A., González, M. G., Pachuca, V. A., Allende, L. A., Fajardo, Y. L. M., y Rendón, M. M. E. (2016). Cancer incidence and mortality in children in the Mexican Social Security Institute (1996-2013). *Salud Pública de México*, 58(2), 162-170.
- Fournier, P. G., Juárez, P., Jiang, G., Clines, G. A., Niewolna, M., Kim, H. S., Walton, H. W., Peng, X. H., Liu, Y., Mohammad, K. S., Wells, C. D., Chirgwin, J. M., y Guise, T. A. (2015). The TGF-β signaling regulator PMEPA1 suppresses prostate cancer metastases to bone. *Cancer cell*, 27(6), 809-821.
- Geminder, H., Sagi-Assif, O., Goldberg, L., Meshel, T., Rechavi, G., Witz, I. P., y Ben-Baruch, A. (2001). A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4747-4757.

- Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., y Mundy, G. R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *The Journal of clinical investigation*, 98(7), 1544-1549.
- Gupta, G.P., y Massagué, J. (2006). *Cancer Metastasis: Building a Framework*. *Cell*, 127, 679-695.
- Heck, J. E., Ritz, B., Hung, R. J., Hashibe, M., y Boffetta, P. (2009). The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 23(2), 125-143.
- Huang, M., y Weiss, W. A. (2013). Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(10), a014415.
- Iolascon, A., Giordani, L., Borriello, A., Carbone, R., Izzo, A., Tonini, G. P., y Della Ragione, F. (2000). Reduced expression of transforming growth factor-beta receptor type III in high stage neuroblastomas. *British Journal of Cancer*, 82(6), 1171.
- Javelaud, D., Mohammad, K. S., McKenna, C. R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., André, J., Delmas, V., Larue, L., Guise, T. A., y Mauviel, A. (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer research*, 67(5), 2317-2324.
- Johnson, G. L., y Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912.
- Juárez-Ocaña, S., Palma-Padilla, V., González-Miranda, G., Siordia-Reyes, A. G., López-Aguilar, E., Aguilar-Martínez, M., Mejía-Aranguré, J. M., Carreón-Cruz, R., Rendón-Macías, M. E., y Fajardo-Gutiérrez, A. (2009). Epidemiological and some clinical characteristics of neuroblastoma in Mexican children (1996–2005). *BMC cancer*, 9(1), 266.
- Juárez, P., Fournier, P. G. J., Mohammad, K. S., McKenna, R. C., Davis, H. W., Peng, X. H., Niewolna, M., Mauviel, A., Chirgwin, J. M., y Guise, T. A. (2017). Halofuginone inhibits TGF- β /BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis. *Oncotarget*, 8(49), 86447.
- Juárez, P., y Guise, T. A. (2011). TGF- β in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone*, 48(1), 23-29.
- Kang, H. Y., Lin, H. K., Hu, Y. C., Yeh, S., Huang, K. E., y Chang, C. (2001). From transforming growth factor- β signaling to androgen action: Identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3018–3023.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., y Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell*, 3(6), 537-549.
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G. P., Serganova, I., Chen, C. R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W. L., y Massagué, J. (2005). Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13909-13914.

- Katsanis, E., Blazar, B. R., Bausero, M. A., Gunther, R., y Anderson, P. M. (1994). Retroperitoneal inoculation of murine neuroblastoma results in a reliable model for evaluation of the antitumor immune response. *Journal of Pediatric Surgery*, 29(4), 538-542.
- Knelson, E. H., Gaviglio, A. L., Nee, J. C., Starr, M. D., Nixon, A. B., Marcus, S. G., y Blobe, G. C. (2014). Stromal heparan sulfate differentiates neuroblasts to suppress neuroblastoma growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 3016-3031.
- Korpai, M., Yan, J., Lu, X., Xu, S., Lerit, D.A., and Kang, Y. (2009). Imaging transforming growth factor- β signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nat. Med.* 15, 960–966.
- Lelekakis, M., Moseley, J. M., Martin, T. J., Hards, D., Williams, E., Ho, P., Lowen, D., Javni, J., Miller, F. R., Slavin, J., y Anderson, R. L. (1999). A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clinical and Experimental Metastasis*, 17(2), 163-170.
- Li, Y., y Nakagawara, A. (2013). Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma. *Cells*, 2(2), 432–459.
- Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, Vassal, G., Joseph, J. M., y Gross, N. (2012) Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 Axis in the Malignant Progression of Human Neuroblastoma. *PLoS ONE* 7(8): e43665.
- Liao, J., Li, X., Koh, A. J., Berry, J. E., Thudi, N., Rosol, T. J., Pienta, K. J., y McCauley, L. K. (2008). Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions. *International Journal of Cancer*, 123(10), 2267-2278.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C., Kreiger M., Scott M., Bretscher A., Ploegh H., y Matsudaira P. (2007). *Molecular cell biology*. (6th ed.). New York. Freeman y Company. (pp. 668-670).
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J., y Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. *Cell*, 73(7), 1435-1444.
- Luo, J., y Miller, M. W. (1999). Transforming Growth Factor β 1-Regulated Cell Proliferation and Expression of Neural Cell Adhesion Molecule in B104 Neuroblastoma Cells: Differential Effects of Ethanol. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2286-2293.
- Marshall, G. M., Carter, D. R., Cheung, B. B., Liu, T., Mateos, M. K., Meyerowitz, J. G., y Weiss, W. A. (2014). The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 14(4), 277-289.
- Massagué, J. (1998). TGF- β Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 753–791. Recuperado en 2017 de: <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>
- Matthay, K.K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., y Weiss, W.A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, p.16078.
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, s., Gotwals, P. J., Kotliansky, V., y Arteaga, C. L. (2002). Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(12), 1551-1559.

- National Institute of Health [NIH], 2013. Neuroblastoma Treatment 2013. Consultado el 25 de julio del 2017 de: <https://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma.html>.
- Nie, Z., Wang, C., Zhou, Z., Chen, C., Liu, R., y Wang, D. (2016). Transforming growth factor-beta increases breast cancer stem cell population partially through upregulating PMEPA1 expression. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 48(2), 194-201.
- Palma, P. V., Juárez, O. S., González, M. G., Siordia, R. A. G., Mejía, A. J. M., Carreón, C. R., y Fajardo G. A. (2010). Incidencia y tendencia del neuroblastoma en niños derechohabientes del IMSS. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48(2).
- Sartelet, H., Durrieu, L., Fontaine, F., Nyalendo, C., y Haddad, E. (2012). Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice. *In Vivo*, 26(1), 19-29.
- Saavedra, J. (2014). Tejido Nervioso. En: Saavedra, J., Domínguez, A. (Eds.), *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular*. McGraw-Hill Education, México. (pp)
- Scarpa, S., Coppa, A., Ragano-Caracciolo, M., Mincione, G., Giuffrida, A., Modesti, A., y Colletta, G. (1996). Transforming growth factor β regulates differentiation and proliferation of human neuroblastoma. *Experimental Cell Research*, 229(1), 147-154.
- Seong, B. K. A., Fathers, K. E., Hallett, R., Yung, C. K., Stein, L. D., Mouaaz, S., Kee, L., Hawkins, C. E., Irwin, M. S., y Kaplan, D. R. (2017). A metastatic mouse model identifies genes that regulate neuroblastoma metastasis. *Cancer research*, 77(3), 696-706.
- Shankar, V., Hori, H., Kihira, K., Lei, Q., Toyoda, H., Iwamoto, S., y Komada, Y. (2015). Mesenchymal stromal cell secretome up-regulates 47 kDa CXCR4 expression, and induce invasiveness in neuroblastoma cell lines. *PloS one*, 10(3), e0120069.
- Shao, J., Gao, Z., Huang, W., y Lu, Z. (2017). The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*, 50, 1623-1633. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3954>
- Simões-Costa, M., y Bronner, M.E., (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242–257.
- Sohara, Y., Shimada, H., y DeClerck, Y. A. (2005). Mechanisms of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer letters*, 228(1), 203-209.
- Stayrook, K. R., Mack, J. K., Cerabona, D., Edwards, D. F., Bui, H. H., Niewolna, M., Fournier, P. G. J., Mohammad, K. S., Waning, d. L., y Guise, T. A. (2015). TGF- β -Mediated induction of SphK1 as a potential determinant in human MDA-MB-231 breast cancer cell bone metastasis. *BoneKEY reports*, 4.
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesselning, P., Young-Shin, H., y Stiller, C. A. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*, 18(6), 719-731.
- Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B., y Kaatsch, P. (2005). International classification of childhood cancer. *Cancer*, 103(7), 1457-1467.

- Teitz, T., Stanke, J. J., Federico, S., Bradley, C. L., Brennan, R., Zhang, J., Johnson, M. D., Sedlacik, J., Inoue, M., Zhang, Z. M., Frase, S., Rehg, J. E., Hillenbrand, C. M., Finkelstein, D., Calabrese, C., Dyer, M. A., y Lahti, J. M. (2011). Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS one*, 6(4), e19133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019133>
- Teitz, T., Inoue, M., Valentine, M. B., Zhu, K., Rehg, J. E., Zhao, W., y Rubinstein, M. (2013). Th-MYCN mice with caspase-8 deficiency develop advanced neuroblastoma with bone marrow metastasis. *Cancer research*, 73(13), 4086-4097.
- Tsutsumimoto, T., Williams, P., y Yoneda, T. (2014). The SK-N-AS human neuroblastoma cell line develops osteolytic bone metastases with increased angiogenesis and COX-2 expression. *Journal of Bone Oncology*, 3(3-4), 67-76.
- Ward E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., y Jemal, A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2), 83-103.
- Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., Satoh, K., Wiercinska, E., Yang, W., Shi, L., Tanaka, A., Nakano, N., Mommaas, M., Shibuya, H., Dijke, P., y Kato, M. (2010). TMEPAI, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. *Molecular Cell* 37, 123–134.
- Weinberg, R. (2013). *The biology of cancer*. (2da ed.) Garland Science.
- Xu, L. L., Shi, Y., Petrovics, G., Sun, C., Makarem, M., Zhang, W., Sesterhenn, I., McLeod, D., Sun, L., Moul, J., y Srivastava, S. (2003). PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer research*, 63(15), 4299-4304.
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R., y Guise, T. A. (1999). TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 197.
- Zeidler, J., Fernandes-Siqueira, L., Carvalho, S., Cararo-Lopes, E., Dias, H., Ketzer, A., Galina, A., y Da Poian, T. (2017). Short-term starvation is a strategy to unravel the cellular capacity of oxidizing specific exogenous/endogenous substrates in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 14176-14187.
- Zhao, H., Cai, W., Li, S., Da, Z., Sun, H., Ma, L., y Zhi, D. (2012). Establishment and characterization of xenograft models of human neuroblastoma bone metastasis. *Child's Nervous System*, 28(12), 2047-2054.
- Zhao, X. P., Huang, Y. Y., Huang, Y., Lei, P., Peng, J. L., Wu, S., Wang, M., Li, W., Zhu, H. F., y Shen, G. X. (2010). Transforming growth factor- β 1 upregulates the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(3), 347.
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell research*, 19(1), 128.