

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



---

**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con  
orientación en Biotecnología Marina**

---

**Desarrollo de modelos *ex vivo* para evaluar formación y  
metástasis ósea**

Tesis

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

Presenta:

**Cinthia Nayeli Cuero Antolin**

Ensenada, Baja California, México  
2016.

Tesis defendida por

**Cinthia Nayeli Cuero Antolin**

Y aprobada por el comité

---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Director de tesis

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dr. Israel Rocha Mendoza**

**Dr. Ulises Gregorio Pacheco Bardullas**



---

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

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Cinthia Nayeli Cuero Antolin ©2016*

*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 **Cinthia Nayeli Cuero Antolin** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

### **Desarrollo de modelos *ex vivo* para evaluar formación y metástasis ósea**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Patricia Juárez Camacho  
Director de tesis

Existen diversas patologías óseas ocasionadas por un desajuste en el proceso de remodelación ósea, por otra parte, existen enfermedades como el cáncer de mama donde las células tienden a metastatizar al hueso, alterando el balance de formación y resorción ósea. El desequilibrio en la remodelación influye en el desajuste de la expresión de factores del microambiente del hueso, como el TGF- $\beta$ . Para el estudio de las diversas patologías óseas, metástasis ósea y evaluación de posibles tratamientos se utilizan modelos *in vitro* e *in vivo*, los cuales tienen diversas limitaciones. Para superar las limitaciones, recientemente se han tratado de desarrollar modelos *ex vivo*. Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar dos modelos de cultivo *ex-vivo*, uno para el estudio de la formación ósea y otro para estudiar la interacción de las células cancerosas con el hueso. Se utilizaron calvarias provenientes de ratones BALB/C y FVB de 4-5 días de edad; las hemicalvarias obtenidas se cultivaron en presencia de insulina para inducir la formación de hueso nuevo, en presencia de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 que son células de cáncer de mama y en presencia de medio condicionado para inducir la resorción ósea de forma directa (contacto célula-célula) e indirecta (sin contacto célula-célula) respectivamente. Durante el proyecto, se estandarizaron las condiciones de cultivo de las hemicalvarias y se analizaron características estructurales de cada hemicalvaria en respuesta a las distintas condiciones mediante histología, además se realizó el análisis de la expresión de genes involucrados en remodelación ósea. También, se validaron ambos modelos *ex-vivo*, mediante la inhibición de la vía de señalización del TGF- $\beta$  utilizando betaglicano soluble, un inhibidor del TGF- $\beta$ . Los datos indicaron que betaglicano soluble promueve la formación ósea en cultivos de calvaria y compensa la resorción ósea provocada por las células de cáncer de mama. Los resultados obtenidos demuestran que los modelos *ex vivo* desarrollados en este trabajo, pueden ser empleados para recrear las condiciones de formación y metástasis ósea, para poder estudiar mecanismos implicados en ambos procesos y medir los cambios en la expresión de genes en respuesta a las condiciones del microambiente óseo. Además de permitir la evaluación de posibles agentes terapéuticos

**Palabras clave:** Hueso, remodelación ósea, metástasis ósea, modelos *ex vivo*.

Abstract of the thesis presented by **Cinthia Nayeli Cuero Antolin** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

### **Development of *ex-vivo* models for the study of bone formation and bone metastasis**

Abstract approved by:

---

Dra. Patricia Juárez Camacho  
Thesis director

There are many bone diseases due to an unbalance in the bone remodeling process. There are also diseases like breast cancer where cells tend to metastasize to bone, altering the balance between bone formation and resorption. The imbalance in remodeling mismatch influences the expression of bone microenvironment factors such as TGF- $\beta$ . For the study of diverse bone diseases, bone metastasis and evaluation of possible treatments, the *in vitro* and *in vivo* models that are used present various limitations. To overcome the limitations, recently they have tried to develop *ex-vivo* models. This project aimed to develop two *ex vivo* models, one for the study of bone formation and a second one to study the interaction of cancer cells with bone. Calvaria from BALB / C and FVB mice of 4-5 days old were used. The hemicalvarias obtained were cultured in the presence of insulin to induce new bone formation, in the presence of breast cancer cells MDA-MB-231 or MCF-7 or in the presence of conditioned medium to induce bone resorption directly (cell-cell contact) and indirectly (without cell-cell contact) respectively. During the project, the conditions for the culture of hemicalvarias were standardized and structural characteristics of each hemicalvaria were analyzed in response to different conditions by histology, furthermore, analysis of the expression of genes involved in bone remodeling were performed. Both *ex vivo* models are also validated, by the inhibition of TGF- $\beta$  signaling pathway, using soluble betaglycan, an inhibitor of TGF- $\beta$ . The data indicated that soluble betaglycan promotes bone formation in calvaria and compensates bone resorption caused by breast cancer cells. The results show that the *ex vivo* models developed in this work can be used to recreate the conditions of bone formation and metastasis, to study mechanisms involved in both processes and measure the changes in gene expression in response to conditions in the bone microenvironment. In addition to allowing the evaluation of potential therapeutic agents.

**Keywords:** Bone , bone remodeling, bone metastasis, *ex vivo* models.

## Dedicatoria

*A mi madre Gloria Antolin Villalva, que aunque ya no está presente físicamente, ha sido mi fuente de inspiración en todo momento y en cada acción que he realizado a lo largo de mi vida; me crió con su infinito amor y siempre creyó en mí, en que podría hacer cualquier cosa que me propusiera; me enseñó a sonreír y ser positiva ante las adversidades de la vida para poder afrontarlas con madurez, pero sobre todo me mostro lo maravillosa que es la vida y que la felicidad se encuentra en las cosas más sencillas, pequeñas e inimaginables.*

## Agradecimientos

*Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme realizar mis estudios de maestría en el Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios, mediante el programa de becas de maestría a través del No. Becario 340048.*

*A mi director de tesis, Dra. Patricia Juárez Camacho por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y colaborar en este proyecto; por el tiempo, confianza, dedicación, apoyo y conocimientos brindados.*

*A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Pierrick Fournier, Dr. Israel Rocha y Dr. Ulises Bardullas por su apoyo, tiempo y valiosas contribuciones durante la realización del trabajo.*

*A la Dra. Ernestina Castro Bongoria y a su equipo de trabajo conformado por Rocío Navarro, Leobardo, Héctor Blanckes y Marco Figueroa por su ayuda y préstamo de material y equipo.*

*A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez y a su equipo de trabajo conformado por Edgar, Paola Bata, Maider Justel, Leonel Pérez y Laura por sus consejos, asesoría, capacitación y préstamo del equipo Fast Prep para la homogenización de los tejidos usados en el desarrollo de este proyecto.*

*A Deyanira del laboratorio de histología de U.A.C. por enseñarme y permitirme trabajar con mis primeras muestras de histología.*

*Al Dr. Mario Nomura por permitirme usar las instalaciones y equipo del laboratorio U.A.C. para realizar el trabajo de histología correspondiente a este trabajo.*

*A Rodolfo Díaz Argüero y a Alba Chavarria Gonzalez por ayudarme a estandarizar y realizar el proceso histológico de los tejidos empleados a lo largo del proyecto.*

*Al Dr. Luis Eduardo Calderon y a la M.C. Abigail Pañola Madrigal por el préstamo del Microscopio, cámara, canastillas de tinción y la confianza brindada para usar el equipo y material.*

*A Mario Salazar Ceseña por los consejos, enseñanza, capacitación y préstamo del microscopio con cámara.*

*A la Dra. Carolina Álvarez Delgado por su asesoría y compartir sus conocimientos relacionados con el uso del programa Image J, programa utilizado para el análisis histomorfométrico.*

*A la Dra. Ma. Elena Solana Arellano por su asesoría durante el análisis estadístico de los datos obtenidos a lo largo del trabajo.*

*Al personal administrativo de CICESE por su ayuda con los distintos trámites realizados durante mi estancia en esta institución, principalmente a Adriana Mejía y Gabriela Alzamirano que siempre me trataron con gentileza.*

*A mis hermanos académicos Alejandra Parate Carrillo, Fernando Maurick Guerra Olvera, Abelil Jain y Mónica Itzel Rodríguez Fariás por sus consejos, asesoría y contribuciones para el desarrollo del proyecto; por toda la ayuda brindada en la parte experimental del proyecto y por hacer de mi entorno de trabajo algo sumamente agradable, por su amabilidad, paciencia y cariño brindado durante estos años, pero sobre todo por su amistad.*

*A mi equipo de trabajo PDP conformado por la Dra. Patricia, el Dr. Pierrick, Ale, Fer, Abelil, Moni, Gerardo, Danna, Andrea, Florian y Prakhhar, por su apoyo, consejos, convivencia, orientación y ayuda; por las risas y los momentos de felicidad compartidos; por el cariño y preocupación por mi persona.*

*A mi padre, Inocente Cuero Sosa, por apoyar mis decisiones sin importar lo locas y precipitadas que estas puedan ser, animarme siempre y tenerme confianza, por enseñarme que cada acción y decisión que tome en la vida me traerá una consecuencia positiva o negativa y es por esto que debo meditar las cosas que hago, pero sobre todo por el amor incondicional que me brinda todos los días, por tenerme presente en sus pensamientos, aunque este lejos de casa y recibirme en casa siempre que quiero volver.*

*A mi hermano Francisco Cuero Ansolín, por fungir el papel de amigo, hermano e inclusive de padre cuando se requiere; por apoyarme y animarme en cada uno de los proyectos que he decidido emprender en mi vida; por ser mi cómplice, mi compañero de aventuras y risas a lo largo de mi vida; por mostrarme que*

*siempre puedo contar con el sin importar la situación en la que me encuentre; por cuidarme, amarme mucho y siempre estar a mi al lado sin importar cual lejos estemos el uno del otro.*

*A mi Abuelita, **Socorro Sosa** que en paz descanse, por animarme y creer que siempre puedo dar más de mí; por sus enseñanzas y cuidados cuando más necesite el apoyo de alguien; por confiar en que puedo superar cualquier adversidad y mostrarme esta confianza a través de su metáfora de compararme con un árbol.*

*A mi Abuelita, **Socorro Villalva** por comprender y apoyarme en mis decisiones; por recibirme con mucho amor, cuidarme y muchas veces alimentarme cuando regreso a casa.*

*A mis tíos, **Ismael Cuero, Catalina Cuero y Rosalba de Dios**, por alentar mis sueños, creer en mí, ser mi soporte en momentos de debilidad, compartir mis alegrías, pero sobre todo por todo el amor que me dan.*

*A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos por tenerme presente en su vida, por ayudarme y apoyarme cuando los necesito; por el amor y cariño que me brindan.*

*A **Danna, Lissvia y Martin**, por ser mis primeros amigos de la maestría y amigos para toda la vida; **Danna** por filosofar sobre la vida conmigo, aguantar mis momentos de estrés y desesperación, por su amistad incondicional y cariño; **Liss** por cuidar de mí, escucharme y siempre tener un buen consejo, por considerarme parte de su familia, además de compartir diversión, alegrías y risas conmigo; **Martin** por sus historias sumamente divertidas, salidas y viajes memorables, por aguantar mis momentos de frustración y siempre darme una palabra de aliento.*

*A **Eli, Lupita y Bri** por ser mis amigas, escucharme siempre que lo requiero, aconsejarme y mimarme mucho; por acompañarme en muchas de mis locuras, bailes y aventuras sin queja alguna; por divertirse a mi lado y compartir infinitas risas conmigo además de mi felicidad o tristeza según sea el caso.*

*A **Manes y Abby**, por cuidarme y siempre estar pendientes de mi alimentación y salud durante mi estancia, pero sobre todo por cuidarme cuando mi estado de salud era completamente desfavorable; por escucharme cuando estaba triste y apoyarme; por todas las fiestas y diversión; por ser de las mejores roomies y amigas que he tenido.*

*A Eduardo, Josué, y Rolando, por toda la diversión, aventuras y bromas que me permitieron compartir; por hacerme sentir querida y como en casa, haciendo mi estancia más confortable.*

*Al equipo misocondria, Caro, Aimee, Adri, Aldo y Alberto por hacerme sentir parte de su equipo y en un ambiente agradable, lleno de amor y felicidad, haciendo de mi estancia y mi vida algo placentero; Caro por todas las pláticas divertidas, llenas de risa y por todo el cariño y amor de todos los días; Aimee por ser mi compañera de laboratorio, aventuras, locuras y por quererme mucho; Adri por escucharme, aconsejarme, aguantar mis pláticas, compartir múltiples momentos de felicidad, tristeza y por quererme tanto; Aldo por todas las discusiones del desayuno, comida y cubos, por las risas y diversión compartidas, por ayudarme y apoyarme siempre, pero sobre todo por aguantarme y quererme como soy; Beso por brindarme amistad y cariño incondicional aún apenas conociéndome.*

*A Marco, Kee, Dani y Luis, por el cariño que me brindaron y considerarme parte de su grupo; por las múltiples charlas, risas y diversión compartidas; Marco por los consejos y orientación sobre la vida; Kee por considerarme familia y ayudarme siempre; Dani por escucharme y darme ánimos; Luis por todo el apoyo y la ayuda brindada especialmente con la computadora.*

*A mis compañeros y amigos de la maestría, Dulce, Ana, Maider, Roció, Edel, Leonardo, Pame, Ricardo, Héctor, Iván, Marco y Leonel por compartir su travestía conmigo, por los momentos y aventuras vividos, por el cariño brindado.*

*A todos los que conforman parte del Departamento de Innovación Biomédica, por ayudarme, orientarme y enseñarme distintas cosas a lo largo de mi preparación académica; a todos aquellos que me regalaron una sonrisa y un abrazo todos los días haciendo del laboratorio un segundo hogar para mí.*

*¡ Gracias!*

## Tabla de contenido

Resumen en español .....	i
Resumen en inglés .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Lista de Figuras .....	xii
Lista de tablas .....	xvi
Lista de acrónimos .....	xvii
Capítulo 1 .....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Biología del hueso.....	1
1.2 Remodelación ósea.....	1
1.2.1 Papel del sistema RANKL/OPG en remodelación ósea .....	2
1.2.1.1 RANKL.....	2
1.2.1.2 OPG .....	3
1.2.2 Participación de la vía de señalización de TGF- $\beta$ en la regulación de la remodelación ósea.....	3
1.2.2.1 TGF- $\beta$ .....	3
1.2.2.2 Vía de señalización del TGF- $\beta$ .....	4
1.2.2.3 TGF- $\beta$ en el hueso .....	4
1.2.3 Runx2: Factor de transcripción involucrado en formación ósea y osteoblastos .....	5
1.2.4 Proteínas expresadas en la remodelación ósea .....	6
1.2.4.1 Colágeno tipo I.....	6
1.2.4.2 Fosfatasa alcalina .....	6
1.3 Patologías óseas .....	7
1.3.1 Osteoporosis .....	7
1.3.2 Metástasis ósea: enfermedad relacionada con el cáncer de mama.....	8
1.3.2.1 Cáncer .....	8
1.3.2.2 Cáncer de mama .....	8
1.3.2.3 Metástasis.....	9
1.3.2.4 Proceso de la metástasis .....	9
1.3.2.5 Metástasis ósea .....	10
1.3.2.6 Participación del microambiente óseo en el establecimiento de la metástasis .....	11
1.3.2.7 TGF- $\beta$ y la metástasis ósea .....	12
1.3.2.8 Inhibición de TGF- $\beta$ en hueso y metástasis ósea.....	13

1.3.2.9 Regulación de TGF- $\beta$ por Betaglicano .....	14
1.4 Modelos utilizados para evaluar mecanismos de remodelación ósea, patologías y tratamientos....	15
1.4.1 Modelo <i>in vitro</i> .....	15
1.4.2 Modelo <i>in vivo</i> .....	16
1.5 Modelos <i>ex vivo</i> .....	17
2. Antecedentes .....	18
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis .....	21
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos específicos .....	21
 Capítulo 2 .....	 22
6. Materiales y Métodos .....	22
6.1 Disección de calvaria .....	22
6.2 Cultivo de calvaria .....	23
6.2.1 Pre-incubación de hemicalvarias .....	23
6.3 Modelo de remodelación ósea.....	24
6.3.1 Cultivo de calvaria con insulina.....	24
6.4 Modelo de microambiente tumoral óseo.....	24
6.4.1 Cultivo celular .....	24
6.4.2 Co-Cultivos: Interacción directa entre las células de cáncer y el hueso .....	24
6.4.3 Cultivo de calvaria en presencia de medio condicionado: Efecto indirecto de las células de cáncer en el hueso.....	25
6.5 Validación de los modelos por histología .....	26
6.6 Validación de los modelos por PCR cuantitativa en tiempo real .....	26
6.6.1 Extracción del ARN .....	27
6.6.2 Retrotranscripción del ARN.....	27
6.6.3 Evaluación de la expresión de genes involucrados en remodelación ósea mediante.....	28
6.7 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en los modelos <i>ex vivo</i> .....	28
6.7.1 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en hueso de calvaria murina.....	29
6.7.2 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en co-cultivos de hueso de calvaria y células MDA-MB-231.....	29
6.8 Estadística .....	30

<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>31</b>
<b>7 Resultados .....</b>	<b>31</b>
<b>7.1 Histología y análisis histomorfométrico del modelo de formación ósea .....</b>	<b>31</b>
<b>7.1.1 Efecto de la insulina en calvarias de ratones Balb/c y FVB .....</b>	<b>31</b>
<b>7.2 Expresión de genes involucrados en remodelación ósea.....</b>	<b>33</b>
<b>7.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN .....</b>	<b>33</b>
<b>7.2.2 Expresión del ARNm del sistema RANKL/OPG de calvarias provenientes de ratones FVB en el modelo de formación ósea .....</b>	<b>35</b>
<b>7.2.3 Expresión del ARNm de Col1<math>\alpha</math>, Runx2 y Alpl en calvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina .....</b>	<b>35</b>
<b>7.3 Histología y análisis histomorfométrico del modelo de microambiente tumoral óseo.....</b>	<b>36</b>
<b>7.3.1 Modelo de interacción directa entre las células de cáncer y el hueso .....</b>	<b>36</b>
<b>7.3.1.1 Efecto de las células MDA-MB-231 en calvarias provenientes de ratones Balb/c y FVB.....</b>	<b>36</b>
<b>7.3.1.2 Efecto de las células MCF-7 en calvarias provenientes de ratones Balb/c.....</b>	<b>38</b>
<b>7.3.2 Modelo del efecto indirecto (factores secretados) de las células de cáncer en el hueso.....</b>	<b>39</b>
<b>7.3.2.1 Efecto del medio condicionado proveniente de las células MDA-MB-231 en calvarias de ratones Balb/c y FVB .....</b>	<b>39</b>
<b>7.3.2.2 Efecto del medio condicionado proveniente de las células MCF-7 en calvarias de ratones Balb/c.....</b>	<b>41</b>
<b>7.4 Expresión del sistema RANKL/OPG en el modelo de microambiente tumoral óseo ....</b>	<b>42</b>
<b>7.4.1 Efecto directo de las células MDA-MB-231 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvarias.....</b>	<b>42</b>
<b>7.4.1.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN de calvarias de ratones Balb/c y FVB.....</b>	<b>42</b>
<b>7.4.1.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas con células MDA-MB-231 .....</b>	<b>43</b>
<b>7.4.2 Efecto directo de las células MCF-7 en la expresión del sistema RANKL/OPG en calvarias.....</b>	<b>44</b>
<b>7.4.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN .....</b>	<b>44</b>
<b>7.4.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con células MCF-7 .....</b>	<b>45</b>
<b>7.4.3 Efecto indirecto (factores secretados) de las células MDA-MB-231 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvarias .....</b>	<b>46</b>
<b>7.4.3.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB.....</b>	<b>46</b>
<b>7.4.3.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas con medio condicionado de las células MDA-MB-231 .....</b>	<b>47</b>

7.4.4 Efecto indirecto (factores secretados) de las células MCF-7 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvaria murina .....	48
7.4.4.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN .....	48
7.4.4.2 Expresión de Rankl y Opg en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con medio condicionado de las células MCF-7 .....	48
7.5 Efecto de betaglicano soluble en cultivos de calvarias de ratones Balb/c. ....	49
7.5.1 Histología y análisis histomorfométrico de calvarias cultivadas en presencia de BGs.....	49
7.5.2 Expresión de genes involucrados en remodelación ósea en calvarias cultivadas en presencia de BGs .....	51
7.5.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN .....	51
7.5.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas en presencia de BGs .....	51
7.5.2.3 Expresión de Col1 $\alpha$ , Runx2 y Alpl en calvarias cultivadas con BGs .....	52
7.6 Efecto de betaglicano soluble en co-cultivos de calvarias provenientes de ratones Balb/c con células MDA-MB-231 .....	53
7.6.1 Histología y análisis histomorfométrico de calvarias cultivadas con células MDA-MB-231 en presencia y ausencia de BGs .....	53
7.6.2 Evaluación de la expresión de RANKL y OPG.....	55
7.6.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN .....	55
7.6.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con células MDA-MB-231 en presencia de BGs.....	56
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>58</b>
<b>8 Discusión.....</b>	<b>58</b>
8.1 Modelo de formación ósea en calvaria murina.....	58
8.2 Modelo de resorción ósea y microambiente tumoral.....	60
8.2.1 Efecto directo de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en calvaria murina ...	60
8.2.2 Efecto indirecto (factores liberados) de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en calvaria murina .....	61
8.3 Efecto de BGs en calvaria murina.....	62
8.4 Efecto de BGs en co-cultivo de calvaria murina y células MDA-MB-231.....	63
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>64</b>
<b>9 Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>65</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Pasos de la metástasis. ....	10
<b>Figura 2.</b> Anatomía de la calvaria. a) Identificación de las suturas. b) Diagrama de los cortes (Modificada de Mohammad, et al, 2008). ....	23
<b>Figura 3.</b> Cultivo de calvaria. ....	23
<b>Figura 4.</b> Co-cultivo. ....	25
<b>Figura 5.</b> Secciones de Hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E. a) Hueso de calvaria control proveniente de ratones Balb/c. b) Calvaria de ratones Balb/c cultivada en presencia de 50 µg/ml insulina. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Calvaria de ratones FVB cultivada en presencia de 50 µg/ml insulina. Per, periostio; End, Endostio; OS, osteocito Aumento 40x.....	32
<b>Figura 6.</b> Análisis histomorfométrico del a) grosor de las hemicalvarias de ratones Balb/c, b) área ósea de las hemicalvarias de ratones Balb/c, c) grosor de las hemicalvarias de ratones FVB y d) área ósea de las hemicalvarias de ratones FVB, cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Los cambios estadísticamente significativos obtenidos con la prueba estadística Mann Whitney U, se muestran en asteriscos (*p<0.05). ....	33
<b>Figura 7.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias cultivadas en ausencia y presencia de insulina. ....	34
<b>Figura 8.</b> Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones FVB cultivados en ausencia y presencia de insulina. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (***) p<0.001).....	35
<b>Figura 9.</b> Expresión relativa del ARNm de a) Col1α, b) Runx2 y c) Alpl de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran en asteriscos (*p<0.05). ....	36
<b>Figura 10.</b> Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control de ratones Balb/c. b) Co-cultivo de hemicalvarias de ratones Balb/c con células MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Co-cultivo de hemicalvarias de ratones FVB con células MDA-MB-231. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción; CT, células tumorales. Aumento 40x. ....	37
<b>Figura 11.</b> Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. Prueba estadística no pareada t test, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (*p<005).....	38
<b>Figura 12.</b> Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Co-cultivo de calvaria con células MCF-7. Per, periostio; End, endostio; LV, laguna vacía; AR, áreas de resorción. Aumento 40x. ....	38

<b>Figura 13.</b> Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7. Prueba estadística Unpaired t test, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (* $p < 0.05$ ). .....	39
<b>Figura 14.</b> Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control de ratones Balb/c. b) Hueso de calvaria de ratones Balb/c cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Hueso de calvaria de ratones FVB cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231 Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción. Aumento 40x. ....	40
<b>Figura 15.</b> Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (* $p < 0.05$ ). .....	40
<b>Figura 16.</b> Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Hueso de calvaria cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MCF-7. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción. Aumento 40x. ....	41
<b>Figura 17.</b> Análisis histomorfométrico del área ósea de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (* $p < 0.05$ ). .....	42
<b>Figura 18.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. ....	43
<b>Figura 19.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones FVB que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. ....	43
<b>Figura 20.</b> Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (** $p < 0.01$ ). .....	44
<b>Figura 21.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7. ....	45
<b>Figura 22.</b> Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (** $p < 0.01$ ). .....	45
<b>Figura 23.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. ....	46
<b>Figura 24.</b> Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones FVB que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. ....	46

- Figura 25.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*  $p < 0.01$ ). .....47
- Figura 26.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7. ....48
- Figura 27.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). .....49
- Figura 28.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Sección de hueso de calvaria cultivada con 5  $\mu\text{g/ml}$  de BGs. c) Sección de hueso de calvaria cultivada con 10  $\mu\text{g/ml}$  de BGs. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito. Aumento 40x .....50
- Figura 29.** Análisis histomorfométrico del a) grosor y b) área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de BGs a concentraciones de 5  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns. Los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\*\*  $p < 0.01$ ). .....50
- Figura 30.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de BGs. ....51
- Figura 31.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns. ....52
- Figura 32.** Expresión relativa del RNAm de a) Col1 $\alpha$ , b) Runx2 y c) Alpl de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns. Los cambios significativos se muestran en asteriscos (\*  $p < 0.05$ ). .....53
- Figura 33.** Secciones de calvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Hueso de calvaria cultivada con medio condicionado proveniente de células MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria cultivada con células MDA-MB-231. d) Hueso de calvaria cultivada con células MDA-MB-231 en presencia de BGs. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción; CT, células tumorales. Aumento 40x. ....54
- Figura 34.** Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células MDA-MB-231 y células MDA-MB-231 más BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\*  $p < 0.05$ ). .....55

- Figura 35.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células MDA-MB-231 y células MDA-MB-231 más BGs .....56
- Figura 36.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células mDA-MB-231 y células MDA-MB231 más BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns, los cambios significativos se muestran en asteriscos ( $p < 0.01$ ).....57

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de primers usados en las reacciones de RT-PCR. ....	28
<b>Tabla 2.</b> Cuantificación del ARN proveniente de las hemicalvarias de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Elución en un volumen de 20 $\mu$ l utilizado para PCR cuantitativa. ....	34
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación del ARN proveniente de las hemicalvarias de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Elución en un volumen de 30 $\mu$ l utilizado para su análisis en gel.....	34

## Lista de acrónimos

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALP	Fosfatasa alcalina
AM	Adrenomedulina
AR	Áreas de resorción
ARN	Ácido ribonucleico
A4 $\beta$ 1-VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
BG	Betaglicano
BGs	Betaglicano soluble
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BSA	Albúmina de suero bovino
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col1 $\alpha$	Colágeno tipo I
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CT	Células tumorales
CTGF	Factores de crecimiento de tejido conectivo
CXCL12	Factor derivado de células estromales-1
CXCR4	Receptor tipo 4 para quimiocinas
DKK-1	Proteína relacionada con Dickkopf-1
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Proteínas de la matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
END	Endostio
ER	Receptor de estrógeno
ET-1	Endotelina-1
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	Glicosaminoglicanos
GLI2	Proteína de dedo de cinc
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos
HA	Hidroxiapatita
HER	Receptor tirosina cinasa
HIF1 $\alpha$	Factor de crecimiento 1 $\alpha$ inducible por hipoxia
HSCs	Células madre hematopoyéticas
H&E	Hematoxilina y eosina
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IKK	Complejo inhibidor del factor nuclear kappa-B
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
MSC	Células madre mesenquimales
NFATC1	Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático 1
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa-B
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LV	Laguna vacía

OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
OS	Osteocito
PER	Periostio
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PR	Receptor de progesterona
PTHrP	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa B
RANKL	Ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa B
QRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
Runx2	Factor de transcripción relacionado con Runt
SDF-1	Factor-1 derivado del estroma
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento y transformación beta
T $\beta$ R-I	Receptor I del factor de crecimiento y transformación beta
TNAP	Fosfatasa alcalina no especifica de tejido
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa +acida tartrato resistente
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular

# Capítulo 1

---

## 1. Introducción

### 1.1 Biología del hueso

El hueso es un tejido conectivo que está constituido por células osteoprogenitoras; como los osteoblastos, de estirpe mesenquimal los cuales son células que producen el hueso por el que se establece la matriz extracelular del hueso (Boyce, 2012., Mata, 2010). Los osteocitos por su parte, actúan como sensores capaces de transformar estímulos mecánicos en señales bioquímicas de activación celular, dirigidas hacia células estromales pluripotenciales, también regulan la mineralización y el control de la homeostasis del fosforo (Mata, 2010). Finalmente, los osteoclastos, células de estirpe hematopoyética y miembros de la familia monocito-macrófago, tienen la habilidad para degradar la matriz ósea (Boyce, 2012., Mata, 2010). Esta matriz ósea está formada por osteoide, fibrillas de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Las fibras del hueso compuestas de colágeno tipo I se impregnan con mineral, principalmente en forma de hidroxiapatita  $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2]$  que son cristales de hidróxido de calcio y de fosfato (Demster, 2005., Robey, *et al*, 2008). A diferencia de otros tejidos conectivos la matriz extracelular del hueso está fisiológicamente mineralizada, confiriéndole al hueso fuerza y flexibilidad, permitiéndole cumplir con sus funciones. Entre las funciones del hueso se incluye el soporte para los músculos; protección de los órganos internos y la medula ósea; sirve de almacén de calcio y factores de crecimiento; liberación de factores de crecimiento a partir de la matriz y regulación de la liberación de células hematopoyéticas a partir de la medula (Boyce, 2012., Clark, 2005).

### 1.2 Remodelación ósea

El hueso del esqueleto adulto está continuamente expuesto a una variedad de estímulos, como la liberación de factores de crecimiento y citocinas, que en condiciones patológicas pueden activar el incremento de la remodelación ósea (Boyce, 2012). El ciclo de remodelación ósea está conformado por dos procesos: resorción y formación ósea. En la resorción ósea los osteoclastos se adhieren a la superficie del hueso a través de la integrina  $\alpha\beta3$  que media las interacciones matriz-célula y célula-célula. Tras la adhesión, los osteoclastos forman un anillo de actina, y secretan ácidos, colagenasas y proteasas que desmineralizan la matriz del hueso y degradan las proteínas matricelulares, como el colágeno tipo 1. Existen otros factores que promueven la osteoclastogénesis, como el factor estimulante de colonias de Macrófagos (M-CSF) que en conjunto con la interleucina-34 (IL-34) se unen al receptor FMS (también

conocido como CSF1R) en células mieloides y promueven la osteoclastogénesis. Asimismo, la expresión de RANKL sobre la superficie de los osteoblastos, el cual se une a su receptor, RANK expresando sobre precursores de osteoclastos, para inducir la osteoclastogénesis a través del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), y las vías de señalización NFATc1 y Cinasa N-terminal JUN. La formación ósea está dada por los osteoblastos, para activar las funciones osteoblásticas, las células madre mesenquimales (MSC) presentes en la médula ósea, se diferencian a osteoblastos a través de factores locales, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), las proteínas WNT y el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ ), (Teitelbaum & Ross, 2003., Weilbaecher, *et al*, 2011).

### **1.2.1 Papel del sistema RANKL/OPG en remodelación ósea**

La función de los osteoclastos se acopla y coordina con la función de los osteoblastos durante la remodelación ósea para mantener la integridad del esqueleto, por lo que una desregulación en las funciones de estas células afecta la tasa de remodelación ósea, lo que conlleva a patologías. Los mecanismos del acoplamiento no han sido totalmente aclarados, sin embargo, la identificación de la vía del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), y Osteoprotegerina (OPG) a mediados de la década de 1990 reveló nuevos indicios para la formación, función y supervivencia de los osteoclastos, proporcionando información sobre la regulación de la remodelación ósea (Boyce & Xing, 2008; Boyce, 2012., Dougall, 2011)

#### **1.2.1.1 RANKL**

RANKL es un factor que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). RANKL es típicamente expresado como una proteína homotrimerica unida a una membrana sobre las células osteoblásticas y células T activadas (Boyce, 2012).

Para estimular la diferenciación de los osteoclastos, RANKL que es expresado en la superficie de los osteoblastos interacciona con su receptor RANK presente sobre la superficie de progenitores hematopoyéticos de monocitos. Posterior a la interacción de RANKL con RANK, la parte citoplasmática de RANK interacciona con proteínas adaptadoras conocidas como TRAF (Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), estas proteínas inician una cascada de señalización, a través de la activación de las vías NF- $\kappa$ B, JNK y Src. La vía NF- $\kappa$ B, está implicada en la liberación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B de los complejos IKK en el citoplasma y su subsecuente traslocación al núcleo, mientras que la activación de la vía JNK induce a la formación y activación del complejo AP-1, conformando por c-Fos y c-Jun. En conjunto, AP-1 y NF- $\kappa$ B inducen la expresión del factor de transcripción NFATc1 el cual se trasloca al núcleo mediante

la activación de la vía de Src, a través de esta vía se aumentan los niveles intracelulares de calcio induciendo la activación de calcineurina, que cataliza la eliminación de un grupo fosfato de NFATc1, promoviendo de esta forma su traslocación al núcleo, para inducir la expresión de diversos genes implicados en la osteoclastogénesis (Boyce & Xing, 2008; Boyce, 2012., Darnay, *et al*, 1998; Dougall, 2011; Lemaire, *et al*, 2004; Ross, 2008).

La importancia que tiene RANKL en la osteoclastogénesis se ha demostrado a través de diferentes estudios. Se ha reportado que ratones knockout para RANKL presentan osteopetrosis severa y la carencia de la erupción dental incisiva y molar (Kong, *et al*, 1999). Por otro lado, ensayos realizados utilizando ratones Knockit que expresan RANKL quimérico (murino/humano) y denosumab, un anticuerpo monoclonal humano que inhibe a RANKL, han mostrado una reducción en la resorción ósea y un aumento tanto en la densidad mineral ósea como en la masa ósea (Kostenuik, *et al*, 2009).

### **1.2.1.2 OPG**

Los osteoblastos además de RANKL también expresan Osteoprotegerina, la cual es una proteína soluble con alta similitud estructural con RANK por lo cual OPG inhibe la diferenciación, actividad y sobrevivencia de los osteoclastos al actuar como un receptor señuelo de RANKL, impidiendo la unión de este con RANK (Boyce & Xing, 2008; Boyce, 2012., Roodman, 1999; Ross, 2008). El papel que OPG tiene en la osteoclastogénesis fue mostrado en ratones transgénicos que sobreexpresaban OPG los cuales mostraron un incremento en la masa ósea como consecuencia de una marcada reducción en el número de los osteoclastos trabeculares, a pesar de que el número de precursores de osteoclastos se mantuvieron normales (Simone, *et al*, 1997).

## **1.2.2 Participación de la vía de señalización de TGF- $\beta$ en la regulación de la remodelación ósea**

### **1.2.2.1 TGF- $\beta$**

El Factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) es una de las citocinas más abundantes en la matriz ósea y es un potente inhibidor del crecimiento de células epiteliales, hematopoyéticas y células inmunes, por lo cual desempeña un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto, así como en la homeostasis del tejido normal. El TGF- $\beta$  puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre la formación ósea, dependiendo el contexto y concentración, dado que está implicado en el control de la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y sobrevivencia de muchos tipos celulares. En el proceso de remodelación ósea, el TGF- $\beta$  es liberado en un complejo dimérico latente conformado por el TGF- $\beta$  y su propéptido denominado LAP (proteína asociada a latencia), asimismo existe una proteína

adicional denominada LTBP-1 (proteína unida a TGF- $\beta$  latente) la cual promueve la unión del complejo de TGF- $\beta$  con la matriz extracelular. El TGF- $\beta$  puede ser activado por la hidrólisis de LTBP-1 y la disociación de LAP durante la resorción ósea, lo cual conlleva a la activación de la cascada de señalización para reclutar transitoriamente MSCs (células madre mesenquimales) a la superficie del hueso recientemente reabsorbido para la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso nuevo. Adicionalmente el TGF- $\beta$  también participa en la diferenciación de osteoclastos. (Annes, *et al*, 2004., Dallas, *et al*, 2002., Connolly, *et al*, 2012., Crane & Cao, 2015., Gorter & Dijke, 2013., Saharinen, *et al*, 1999).

### 1.2.2.2 Vía de señalización del TGF- $\beta$

En humanos, se han descrito tres isoformas del TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. La señalización de las tres isoformas es comparable pero sus niveles de expresión difieren. La vía de señalización del TGF- $\beta$  inicia con la unión del ligando al receptor. TGF- $\beta$  se une como dímero a los receptores serina treonina cinasas del tipo I y tipo II, conocidos como ALK5 (también conocido como T $\beta$ R-I) y T $\beta$ RII respectivamente, resultando en un complejo oligomérico. Una vez formado el complejo, el receptor constitutivamente activo del tipo II fosforila y activa a el receptor tipo I ALK5 e inicia la cascada de señalización intracelular. El receptor tipo I fosforila a los mediadores intracelulares Smad 2 y 3. Las proteínas Smads fosforiladas y activadas, se asocian con la Co-Smad, Smad4, formando así un complejo heterodimérico y se translocan al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo de Smad es capaz de unirse a la cromatina y modular su estructura, además, el complejo Smad se asocia con factores de transcripción para regular la transcripción de genes regulados por TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  también es capaz de inducir la transcripción de proteínas Smads inhibitoras como Smad 7; estas proteínas Smad forman un asa de retroalimentación negativa inhibiendo la cascada de señalización del TGF- $\beta$  (Chiechi, *et al*, 2013., Gorter & Dijke, 2013; Janssens, *et al*, 2005., Massague, 1998., Massague, 2000., Shi & Massague, 2003).

### 1.2.2.3 TGF- $\beta$ en el hueso

En condiciones normales, durante la remodelación ósea, el TGF- $\beta$  es un mediador clave en el acoplamiento de resorción y formación ósea. Durante la formación ósea los osteoblastos secretan TGF- $\beta$ , el cual es incrustado dentro de la matriz ósea mineralizada, en donde es almacenado en forma latente. Posterior a la resorción ósea, el TGF- $\beta$  es liberado y se activa por la liberación de este a partir del complejo latente, la liberación es llevada a cabo por catepsinas secretadas por los osteoclastos. El TGF- $\beta$  activo cumple un papel importante tanto en la proliferación de precursores de osteoblastos como en la

regulación en la función directa e indirecta de los osteoclastos (Buijs, *et al*, 2011; Chiechi, *et al*, 2013., Saharinen, *et al*, 1999).

La importancia del TGF- $\beta$  sobre los osteoblastos, se debe a que la liberación del TGF- $\beta$  durante la resorción ósea induce el reclutamiento de células madre mesenquimales y osteoprogenitoras. Además, se ha reportado que TGF- $\beta$  favorece las primeras etapas de diferenciación de las células a osteoblastos maduros, aumentando los niveles de colágeno tipo I e induciendo la expresión de Runx. Por otro lado, durante las etapas posteriores de la diferenciación de osteoblastos, TGF- $\beta$  suprime la expresión de Runx2 para inhibir las últimas etapas de la maduración de osteoblastos (Barnes, *et al*, 1999., Bostrom & Asnis, 1998., Janssens, *et al*, 2005., Tashjian, *et al*, 1985).

El TGF- $\beta$  activo también regula la diferenciación y actividad de los osteoclastos. El TGF- $\beta$  inhibe la diferenciación temprana de osteoclastos, así como su sobrevivencia, actividad y por ende la resorción ósea, a través de la expresión y secreción de OPG por parte de los osteoblastos y mediante la supresión de la expresión de RANKL. Por otro lado, TGF- $\beta$  es capaz de estimular la resorción ósea llevada a cabo por los osteoclastos maduros, esto se debe posiblemente a la regulación positiva de prostaglandinas, las cuales son potentes estimuladores de la diferenciación de osteoclastos (Centrella, *et al*, 1994., Dallas, *et al*, 2002., Quinn, *et al*, 2001., Taipale & Keski-Oja, 1997., Takai, *et al*, 1998., Thirunavukkarasu, *et al*, 2001., Udagawa, *et al*, 2000).

### **1.2.3 Runx2: Factor de transcripción involucrado en formación ósea y osteoblastos**

Runx2 también conocido como Cbfa, es una proteína perteneciente a la familia de los factores de transcripción Runx. Los genes Runx tienen la habilidad de regular la expresión génica en múltiples puntos en el linaje osteogénico. Runx2 es denominado como el factor de transcripción maestro debido a que es un regulador crítico de la diferenciación de osteoblastos y también un regulador de la formación ósea (Lian & Stein, 2003). Runx2 se expresa en las células mesenquimales pluripotentes antes de la expresión del fenotipo de los osteoblastos; Kobayashi y colaboradores demostraron que las células progenitoras mesenquimales derivadas de calvaria de ratones deficientes de Cbfa1 (Runx2) no adquirirían fenotipos osteoblásticos, sin embargo, había mayor diferenciación de condrocitos y adipocitos en ausencia de la diferenciación de osteoblastos (Kobayashi *et al*, 2000). La importancia de Runx2 durante la formación ósea fue demostrada por Komori y colaboradores, en un trabajo realizado con ratones Runx2 Knockout, la examinación del esqueleto de los ratones knockout mostro una carencia completa de osificación, demostrando con esto el requerimiento absoluto de la expresión de Runx2 en el proceso de formación ósea (Komori *et al*, 1997).

## **1.2.4 Proteínas expresadas en la remodelación ósea**

### **1.2.4.1 Colágeno tipo I**

El colágeno es el componente proteico más abundante de la matriz extracelular ósea; el colágeno del tipo I es el que más predomina, aproximadamente comprende el 90% de la parte orgánica, sin embargo, también pueden estar presentes el colágeno tipo III, V, XI y XIII. El colágeno tipo I se forma en el hueso a partir de la combinación de dos cadenas  $\alpha 1$  y una  $\alpha 2$ ; las cadenas  $\alpha$  forman una hélice; las hélices de colágeno se asocian para formar fibrillas que a su vez se unen para formar filamentos o redes, para estabilizar la estructura del colágeno tipo I (Allori, *et al*, 2008; Ebeling, 2001). La red de colágeno tipo I es la base en donde los cristales de  $[(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  hidroxiapatita (HA) son depositados dentro de los espacios de cada subunidad de colágeno. El mecanismo de la formación mineral no está totalmente elucidado, sin embargo, un mecanismo propuesto es la unión de una proteína al colágeno, posiblemente una de las proteínas de la matriz extracelular conocidas por modular la formación mineral, como la sialoproteína ósea (BSP) (Baht, *et al*, 2008; Buckwalter, *et al*, 1995).

### **1.2.4.2 Fosfatasa alcalina**

Fosfatasa alcalina es una glicoproteína unida a membrana que está presente en cuatro isoformas que son codificadas por cuatro genes humanos. Tres isoenzimas son expresadas en una distribución específica de tejido, se expresan en alta concentración en el epitelio intestinal y en la placenta. La cuarta isoenzima de fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), es una enzima ubicua expresada en el hígado, riñón y hueso. La ALP presente en hueso es expresada por los osteoblastos y se encuentra inicialmente anclada a la superficie exterior de la membrana de estos. La función metabólica exacta de ALP es desconocida, no obstante, esta es una enzima involucrada en la biomineralización; ALP cataliza la hidrólisis de enlaces éster de pirofosfatos, que son inhibidores potentes del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, además, durante la hidrólisis se libera una alta concentración de fosfato inorgánico a la matriz para llevarse a cabo el proceso de mineralización en los huesos. Durante la formación ósea los niveles de ALP en la circulación se elevan, esto como resultado de la función celular de los osteoblastos en la remodelación ósea, por lo que ALP se considera un marcador de la diferenciación de osteoblastos, además que en los niveles de ALP son medidos como un marcador de la formación ósea (Demers, 2001., Houston, *et al*, 2004., Kim, *et al*, 2004., Robison, 1923., Schar, *et al*, 1997).

### **1.3 Patologías óseas**

Existen diversas condiciones patológicas originadas a partir del desajuste en la tasa de remodelación ósea. Las alteraciones asociadas a las diversas patologías pueden estimular o inhibir la resorción y formación ósea, provocando la pérdida o ganancia excesiva de hueso a nivel sistémico o local (Boyce, 2012). Dentro de las patologías que afectan la remodelación ósea se encuentran la osteopetrosis, la enfermedad de paget, la osteoporosis y metástasis ósea. En este trabajo nos referimos específicamente a estas dos últimas.

#### **1.3.1 Osteoporosis**

La osteoporosis es una enfermedad del esqueleto que se distingue por la baja masa ósea y deterioro en la microarquitectura del tejido óseo ocasionado que el hueso se vuelva menos resistente al estrés mecánico, incrementando la fragilidad ósea y susceptibilidad a fracturas. El termino osteoporosis significa “hueso poroso”, este término fue introducido por primera vez en Francia y Alemania en el último siglo, sin embargo, fue redefinido debido a que el hueso es mineralizado normalmente, pero reducido en cantidad. La osteoporosis es una enfermedad que históricamente ha sido difícil de definir, un enfoque considerando la densidad mineral ósea no abarca todos los factores de riesgo para la fractura, mientras que una definición basada en la fractura no permitiría la identificación de la población de riesgo. En 1994 la organización mundial de la salud definió a la osteoporosis en términos de la densidad mineral ósea y fracturas previas, pero, dicha definición no considera los cambios en la microestructura que pueden debilitar al hueso independientemente de algún efecto sobre la densidad mineral ósea. Aunque la osteoporosis se relaciona como una enfermedad que afecta a las mujeres, esta también afecta a los hombres alrededor de un cuarto de la tasa en mujeres (Adler, 2013., Harvey, et al, 2008). Se ha reportado que, a nivel mundial, la osteoporosis causa más de 8.9 millones de fracturas al año, estimándose que afecta a 200 millones de mujeres mayores de 60 años. Aproximadamente 75 millones de personas se ven afectadas por la osteoporosis en Europa, Estados Unidos y Japón (IOF, 2016). En 2008 se reportó que alrededor de 10 millones de americanos mayores de 50 años de edad tienen osteoporosis y 1.5 millones presentan fracturas cada año, mientras que otros 35 millones de americanos presentan riesgo de la enfermedad (Harvey, et al, 2008).

### **1.3.2 Metástasis ósea: enfermedad relacionada con el cáncer de mama**

#### **1.3.2.1 Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se origina a partir del desajuste en la homeostasis de diversos procesos celulares involucrados en el mantenimiento del tejido, incluyendo la reparación de células. El desajuste es originado como consecuencia de alteraciones en el genoma provocados por factores físicos y químicos que promueven el desarrollo de un tumor. (Pardee & Stein, 2011; Pelengaris & Khan, 2013; Weinberg, 2013).

El cáncer se caracteriza por poseer señal de crecimiento autónoma, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión a la destrucción inmune, proliferación celular, invasión y metástasis, angiogénesis y reprogramación del metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2000).

El cáncer es una enfermedad, que afecta a gran parte de la población mundial. En 2012, se reportaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas viviendo con la enfermedad (Globocan, 2012).

La tasa global de incidencia de cáncer estandarizada por edad es casi 25% mayor en los hombres que en las mujeres, con tasas de 205 y 165 por 100,000, respectivamente (Globocan, 2012). En cuanto a la mortalidad, las tasas son 15% mayores en las regiones más desarrolladas que en las regiones menos desarrolladas respecto a hombres, y 8% mayor en las mujeres (Globocan, 2012).

A nivel nacional, el cáncer también afecta significativamente a la población, siendo la tercera causa de mortalidad. En 2013, el INEGI reportó un total de 611829 muertes, de las cuales, 73426 (12% del total) muertes fueron a causa de tumores malignos.

#### **1.3.2.2 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es un tumor maligno que comienza en las células de la mama y que puede invadir el tejido que lo rodea y dispersarse a áreas distantes del cuerpo lo cual es conocido como metástasis (American Cancer Society, 2014). Dentro de los cánceres que afectan a la población, el cáncer de mama es uno de los que más predomina. El cáncer de mama es el segundo cáncer más común a nivel mundial, y por mucho, es el cáncer más frecuente en las mujeres. En el 2012, Globocan reportó un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados (25% de todos los cánceres). El cáncer de mama se ubica como la quinta causa de muerte por cáncer en general (522,000 muertes), pero es la causa más frecuente de muerte en las mujeres en las regiones menos desarrolladas (324,000 muertes, el 14,3% del

total), y la segunda causa de muerte en las regiones más desarrolladas (198,000 muertes, 15,4%) (Globocan, 2012).

En México, de acuerdo al INEGI, el cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres, respecto a los cánceres en general. En 2013, se reportaron 5426 muertes debido a cáncer de mama (15% de todos los cánceres) (INEGI, 2013).

### 1.3.2.3 Metástasis

La metástasis es el proceso por el cual las células que conforman tumores malignos, se dispersan e invaden sitios distantes del cuerpo, donde subsecuentemente forman nuevas colonias que pueden desarrollar tumores secundarios. Este proceso es complejo, y se lleva a cabo a través de diversos pasos que involucran diferentes vías de señalización (Holen, 2012., Pecorino, 2012). Entre los lugares más frecuentes a los que metastatizan las células de cáncer de mama se encuentran: pulmones, hígado y los huesos (Saunders & Jassal, 2009).

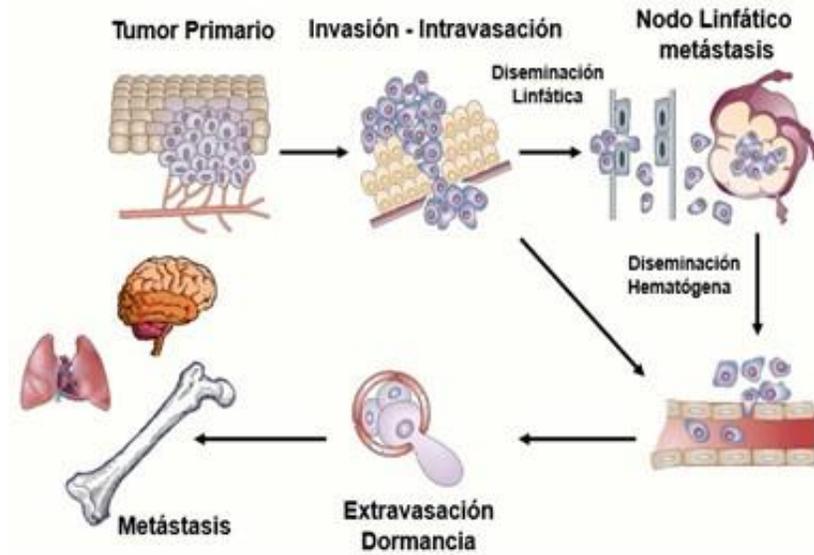
### 1.3.2.4 Proceso de la metástasis

Los diversos pasos que están involucrados en el proceso de metástasis son (Figura 1): Invasión, intravasación, transporte, extravasación, colonización metastásica y angiogénesis.

Las células del tumor primario, al proliferar comienzan a formar nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, con la finalidad de cubrir sus necesidades metabólicas, proceso denominado **angiogénesis**. El proceso de metástasis inicia con la **invasión**, dado que las células del tumor primario se desprenden e invaden a los vasos sanguíneos cercanos. Los vasos sanguíneos proporcionan una vía, mediante la cual las células tumorales entran en el sistema circulatorio del cuerpo, acontecimiento denominado como **Intravasación**. Las células tumorales también pueden entrar indirectamente en la circulación sanguínea a través del sistema linfático (Holen, 2012., Pecorino, 2012).

La forma de **transporte** de las células tumorales que entran en los vasos sanguíneos, es a través de la corriente sanguínea de forma “unidireccional”. Las células tumorales pueden viajar solas o formar grupos con plaquetas, llamados émbolos. Los émbolos pueden proteger a las células tumorales de las fuerzas presentes en el torrente sanguíneo. El transporte de las células tumorales a través de la circulación se torna difícil debido a la presencia de distintos factores que pueden provocar que perezcan. Las células tumorales que logran sobrevivir durante el transporte, hasta llegar al sitio objetivo, salen a partir del sistema vascular o linfático y se adhieren a órganos específicos, a este evento se le cómo **extravasación**. Una vez en el nuevo sitio, las células tumorales se establecen, inician y mantienen el crecimiento, que

implica el desarrollo de **angiogénesis** como proceso esencial para proporcionar nutrientes y oxígeno, de esta forma se da lugar a la **colonización metastásica** (Holen, 2012., Pecorino, 2012).



**Figura 1.** Pasos de la metástasis.

### 1.3.2.5 Metástasis ósea

Las células provenientes de ciertos tipos de tumores sólidos metastatizan en hueso e inducen lesiones osteolíticas y/u osteoblásticas (Weilbaecher, *et al*, 2011). En el caso de cáncer de mama, aproximadamente, más del 70% de los pacientes en un estadio avanzado pueden generar metástasis ósea. Cuando las células tumorales de la mama entran a los huesos, tiende a desequilibrar la remodelación ósea, causando una excesiva resorción o incremento en la formación (Fournier, *et al*, 2014). En la colonización metastásica ósea, están implicados una serie de pasos y factores del microambiente. Previo a la metástasis, los tumores primarios pueden dar pie a la formación de un nicho pre-metastásico. El nicho pre-metastásico hace referencia al acondicionamiento del sitio de metástasis. El tumor primario libera factores que migran directamente de células progenitoras hematopoyéticas a partir de la médula ósea a sitios específicos para el crecimiento metastásico, preparando el “suelo” para la subsecuente colonización de células tumorales. En la metástasis ósea, se prepara a la médula, mediante la producción de factores circulantes, que se dirigen a las células en el microambiente del hueso. Las células tumorales y/o fibroblastos senescentes secretan osteopontina (OPN), que facilita el reclutamiento de células de médula ósea y la migración de células tumorales (Holen, 2012., Weilbaecher, *et al*, 2011). Algunas células de cáncer en el hueso producen proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP; también conocida como

PTHLH) la cual, de acuerdo a los resultados obtenidos en un estudio realizado con ratones, tiene la capacidad de promover la resorción ósea (Guise, *et al*, 1996).

Durante la colonización metastásica, los osteoblastos y células estromales de la médula ósea atraen y regulan a células madre hematopoyéticas (HSCs), para proporcionar un nicho adecuado a las células tumorales a través de interacciones proteicas que incluyen integrinas, como  $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1); quimiocinas, como CXCL12-CXCR4 (facilitan la adhesión de células tumorales); BMPs, Notch, nestina y OPN. La adhesión requerida para la colonización es proporcionada cuando las integrinas de la superficie celular del tumor interactúan con proteínas de la matriz extracelular (ECM) expresadas en el microambiente óseo (Weilbaecher, *et al*, 2011). De igual forma, la interacción entre una proteína denominada anexina II con su receptor favorece la adhesión celular y la metástasis (Shiozawa, *et al*, 2008).

La invasión al hueso conlleva una desestabilización en el proceso de remodelación ósea. Se involucran diversas vías de señalización y la sobre expresión de factores como: PTHRP, que da lugar a una mayor resorción ósea comparada con la que normalmente debería existir; metaloproteinasas de la matriz (MMPs) implicadas en la cascada metastásica en general, más específicamente en la invasión al hueso; la vía de TGF- $\beta$  que modula factores pro-metastásicos y osteolíticos; la vía de Jagged1-Notch que promueve osteólisis tumoral; los factores de transcripción GLI2, RUNX2 y el factor de crecimiento  $1\alpha$  inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), implicados en la promoción de osteólisis tumoral y el crecimiento tumoral (Weilbaecher, *et al*, 2011).

### **1.3.2.6 Participación del microambiente óseo en el establecimiento de la metástasis**

En 1889, Stephen Paget propuso la teoría de “la semilla y el suelo” en la que plantea que la diseminación de las células tumorales no es un proceso aleatorio, más bien, es que ciertas células tumorales (la semilla) se ven favorecidas con la actividad metastásica y tienen una afinidad especial por el medio de ciertos órganos específicos (el suelo) que les proporcionan una ventaja. Paget llegó a la conclusión de que las metástasis se desarrollan cuando existe compatibilidad entre las células tumorales y el tejido diana de la misma forma que existe una compatibilidad entre “la semilla y la tierra fértil”, por lo tanto, sugirió que el sitio de la metástasis depende de la afinidad del tumor por el microambiente (Ribatti, *et al*, 2006; Vicent, *et al*, 2006). En 1997 Mundy y Guise introdujeron el concepto de “ciclo vicioso” para explicar cómo es que las células tumorales modifican el microambiente óseo para lograr su supervivencia y crecimiento, además, como es que a su vez el microambiente óseo les proporciona a las células

tumorales factores de crecimiento para promover el crecimiento de estas (Guise, 2002., Mundy, 1997, Mundy, 2002).

Las células tumorales interactúan con el microambiente del hueso a través de moléculas de la superficie celular. Las interacciones, pueden incluir factores locales y sistémicos, citocinas y sus receptores. Las células tumorales tienen la habilidad de producir una variedad de factores que regulan el volumen del hueso, y modifican la expresión de moléculas de células del estroma circundantes. (Pecorino, 2012., Weilbaecher, *et al*, 2011., Gnant, 2012., Holen, 2012). Entre las moléculas derivadas de las células tumorales se encuentran los factores moduladores de la actividad osteoclástica. Una de las moléculas que se asocia con la metástasis ósea es la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), la cual estimula la producción de RANKL, desencadenando la resorción ósea y por consecuencia la liberación de factores embebidos en la matriz ósea (Guise, *et al*, 2006., Mundy, 2002., Yoneda, *et al*, 2005). Dentro de los factores liberados, el TGF- $\beta$  tiene un papel importante porque tiene un mecanismo complejo de acción, debido a que puede actuar tanto en el tumor, como en células del estroma. El TGF- $\beta$  promueve la invasión, angiogénesis, desarrollo y progresión de la metástasis ósea por la inducción de la producción de PTHrP, IL-11 e IL-8 (Holen, 2012). Se ha reportado que TGF- $\beta$  incrementa la expresión de PTHrP en células de cáncer de mama, estimulando la metástasis ósea osteolítica (Käkönen, *et al*, 2002., Yin, *et al*, 1998). Por otra parte, hay estudios *in vivo* que demuestran que al inhibir la osteoclastogénesis o la función de los osteoclastos se reduce el crecimiento tumoral en el hueso (Fournier, *et al*, 2010., Morony, *et al*, 2001., Zhang, *et al*, 2001).

Existen otros factores que influyen en la metástasis ósea como COX-2, IL-6 y FGF (Holen, 2012). Los factores reguladores de la actividad osteoblástica también son moléculas derivadas de las células tumorales. Entre estos se encuentran, el potente vasoconstrictor entotelial-1(ET-1), la vía de señalización de Wnt, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y el sistema IGF. Otros factores importantes son los pro- angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), también están implicados los moduladores de la matriz extracelular tales como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), Catepsina K y uPA/uPAR (Holen, 2012).

### **1.3.2.7 TGF- $\beta$ y la metástasis ósea**

TGF- $\beta$  tiene la capacidad de promover y agravar la metástasis ósea a través de la promoción de genes específicos. Hay estudios que demuestran que la vía de señalización de TGF- $\beta$ -Smad regula directamente la expresión de factores proosteolíticos, como interleucina 11 (IL11), factores de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Kang, *et al*, 2003), metaloproteinasa-1 de matriz (MMP-1), CXCR4 (Dunn, *et al*,

2009., Kang & Massagué, 2004) y PTHrP (Käkönen, *et al*, 2002). PTHrP desempeña un papel importante en el desarrollo de las lesiones osteolíticas y se considera que es responsable de la hipercalcemia humoral de malignidad. TGF- $\beta$  induce la expresión de PTHrP que a su vez estimula la producción de RANKL y la baja regulación de OPG (Osteoprotegerina) lo cual induce la diferenciación de osteoclastos y la activación y promoción de metástasis óseas (Buijs, *et al*, 2011; Chiechi, *et al*, 2013). IL11 estimula la expresión de factores osteoclastogénicos como RANKL y el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) en los osteoblastos, asimismo estimula la resorción ósea (Buijs, *et al*, 2011). CXCR4, es un receptor de quimiocinas que se une al factor-1 derivado del estroma (SDF-1) producido por los osteoblastos y su expresión promueve el establecimiento de las células cancerosas al hueso. CTGF estimula la proliferación de osteoblastos, así como la angiogénesis, y MMP-1 promueve la metástasis ósea (Guisse, 2009., Lu, *et al*, 2009).

### **1.3.2.8 Inhibición de TGF- $\beta$ en hueso y metástasis ósea**

En presencia de metástasis ósea los niveles locales de TGF- $\beta$  se ven alterados, debido a una excesiva liberación de TGF- $\beta$  en el microambiente óseo durante la resorción ósea, por lo que se le considera el mediador central del denominado ciclo vicioso del crecimiento tumoral en hueso. El papel que desempeña TGF- $\beta$  en la progresión del cáncer y la metástasis ósea, lo convierte en un potente blanco terapéutico para tratar el cáncer y la metástasis ósea. Se han estado investigado una serie de inhibidores de TGF- $\beta$ , de entre los cuales se encuentran: trampas de ligando que incluyen anticuerpos monoclonales neutralizantes de TGF- $\beta$  y proteínas receptor señuelo solubles; inhibidores de la cinasa del receptor de TGF- $\beta$  y oligonucleótidos antisentido. Específicamente para metástasis ósea se han estado realizando una serie de investigaciones sobre posibles inhibidores de TGF- $\beta$ ; en 2007 Ehata y colaboradores reportaron el efecto de Ki26894, un inhibidor de la cinasa del receptor tipo I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I) en metástasis ósea. Para el estudio utilizaron una variante de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, una línea celular considerada altamente metastásica, la cual fue tratada con TGF- $\beta$ 3 y Ki26894. En este estudio se evaluó el efecto de Ki26894 sobre la señalización de TGF- $\beta$ 3, además fue medido el efecto de Ki26894 sobre la proliferación celular y se examinó la movilidad e invasión de MDA-231-D inducida por TGF- $\beta$ 3. Los resultados reportados fueron que Ki26894 bloquea la señalización de TGF- $\beta$  en la línea celular MDA-231-D, la cual fue detectada por la supresión de la fosforilación de Smad2, así mismo, Ki26894 disminuye la movilidad e invasión de la línea celular empleada. También se realizó un estudio *in vivo*, en donde se obtuvo que Ki26894 disminuye la metástasis ósea de las células de cáncer de mama (Ehata, *et al*, 2007).

Mediante un estudio efectuado por Biswas y colaboradores, se determinó la eficacia de 1D11, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  para prevenir la metástasis ósea de cáncer de mama. En el estudio se emplearon células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y células de tumor mamario murino 4T1, dichas células fueron inyectadas vía intracardiaca en ratones. A través de ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, obtuvieron que el tratamiento con el anticuerpo logro reducir el tumor a lo largo del hueso, se redujeron las lesiones osteolíticas y el área de lesión osteolítica, se incrementó el volumen óseo y la formación de la matriz mineralizada (Biswas, *et al*, 2011).

También se han reportado moléculas biológicamente activas que inactivan a TGF- $\beta$  o su señalización, como Halofuginona (Hfg). Juárez y colaboradores en 2012 publicaron un estudio acerca del efecto de Halofuginona en el establecimiento y progresión de la metástasis ósea de melanoma. Para el estudio evaluaron el efecto de Halofuginona con presencia o sin presencia de TGF- $\beta$ . Los resultados que obtuvieron a partir del modelo *in vitro* fue que Hfg inhibe la señalización de TGF- $\beta$  al inhibir la fosforilación de las proteínas Smad, también inhibe la proliferación de células de melanoma y reduce la expresión de los genes regulados por TGF- $\beta$  que incrementan la metástasis ósea, tales como PTHrP, CTGF, CXCR4 e ILL11. Para el estudio *in vivo*, emplearon ratones desnudos los cuales fueron inoculados con células de melanoma 1205Lu y tratados con Halofuginona. Se observó que el tratamiento diario sistemático de Hfg inhibe significativamente la formación de lesiones osteolíticas y metástasis óseas después de la inoculación intracardiaca con células 1205Lu (Chiechi, *et al*, 2013., Juárez, *et al*, 2012).

### **1.3.2.9 Regulación de TGF- $\beta$ por Betaglicano**

Existen correceptores de factores de crecimiento, los cuales son moléculas capaces de unirse al factor, pero que carecen de cualquier actividad de señalización catalítica sobre sí mismas. TGF- $\beta$  tiene un receptor tipo III (T $\beta$ RIII), también conocido como Betaglicano (BG). BG funge como un correceptor que modula la acción de diversos miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , tales como Inhibina A y bFGF.

El Betaglicano es un proteoglicano de membrana, que está presente en células epiteliales, sin embargo, se encuentra ausente en células endoteliales, mioblastos y linajes hematopoyéticos. BG está formado por un ectodominio, una región transmembranal, una región citoplasmática corta, cadenas de sulfato condroitín y heparán y tiene dos secuencias conservadas de Ser-Gly a las cuales se les denominan glicosaminoglicanos (GAG). Puede darse el caso de que se presente una mutación en la que la serina es cambiada por una alanina, no obstante, a pesar de esta mutación, el receptor puede unirse a TGF- $\beta$  e inhibina.

Cuando BG está presente, modula la interacción de TGF- $\beta$  con los receptores del tipo I y II de TGF- $\beta$ , cabe mencionar que BG tiene la habilidad de unirse con alta afinidad a todas las isoformas de TGF- $\beta$ , aunque la afinidad por TGF- $\beta$ 2 es la más alta. El complejo formado por BG + TGF- $\beta$  + receptor de TGF- $\beta$  del tipo II resulta en el potenciamiento de la señalización de TGF- $\beta$ , efecto conocido como “presentación de TGF- $\beta$  “. BG también puede asociarse con los receptores del tipo II de activina y BMP. Respecto a la función de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), aún no se conoce bien.

La región extracelular de betaglicano contiene dos dominios de unión a ligandos independientes que dividen la región en aproximadamente mitades iguales. El dominio E (para Endoglina-similar) y el dominio U (para Uromodulina-similar). Cuando los dominios se expresan como receptores de membrana truncados, o proteínas recombinantes solubles, son capaces de unirse a TGF- $\beta$  de manera similar al receptor del tipo salvaje.

La forma soluble de betaglicano ocurre naturalmente y es encontrada en suero y matrices extracelulares. El betaglicano de membrana es el precursor del betaglicano soluble (BGs), este último es generado debido a una escisión proteolítica de la región extracelular del BG de membrana, proceso comúnmente llamado “desprendimiento del ectodominio”.

Mientras que el BG de membrana potencia la unión de TGF- $\beta$  al receptor de TGF- $\beta$  tipo II, incrementando la actividad del factor, la forma soluble secuestra el ligando, actuando como un agente neutralizante de TGF- $\beta$ , convirtiéndolo en un potente antagonista de TGF- $\beta$  (López-Casillas, *et al*, 2008).

#### **1.4 Modelos utilizados para evaluar mecanismos de remodelación ósea, patologías y tratamientos**

Para elucidar los eventos de remodelación ósea tanto en condiciones normales como en distintas patologías; para el estudio de la diseminación y sobrevivencia de las células cancerosas en el hueso, así como la evaluación de tratamientos, se han empleado y desarrollado modelos para recrear las diversas condiciones

##### **1.4.1 Modelo *in vitro***

Los modelos *in vitro* han sido fundamentales para el estudio de procesos biológicos cuya finalidad ha sido mimetizar el microambiente *in vivo* para extrapolar los resultados de un experimento a un contexto biológico. Este modelo se caracteriza por el uso de cultivos y co-cultivos celulares, en el cual, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del ambiente se controlan de forma artificial, con la finalidad de simular el ambiente *in vivo* (Chong, 2015). Este tipo de modelos se han implementado para el estudio

específico de procesos involucrados en la remodelación, reparación y metástasis ósea. Se han empleado cultivos primarios de osteoblastos para inducir su diferenciación, así mismo, co-cultivos de osteoblastos con macrófagos de medula ósea (Hikita, *et al*, 2015), co-cultivos de colágeno mineralizado con osteoclastos (Krishnan, *et al*, 2013), cultivos de osteoclastos sobre superficies biocompatibles (Deguchi, *et al*, 2016), entre otros cultivos utilizando las distintas células óseas, con la finalidad de elucidar mecanismos de diferenciación, formación y resorción ósea. Por otra parte, se han utilizado co-cultivos de células de cáncer con células estromales de la medula ósea (Arrigoni, *et al*, 2014., Wang, *et al*, 2005), o con fibroblastos de hueso, co-cultivos de células endoteliales y del estroma, modelos de hueso vascularizado (Chong, 2015), para el estudio de metástasis ósea. Las ventajas que poseen estos modelos son: el bajo costo, la facilidad de manejo y la accesibilidad para la experimentación. Sin embargo, este modelo posee la desventaja de que la representación del microambiente del hueso es muy simplificada, con frecuencia es imposible visualizar la localización de proteínas y procesos en matriz calcificada, lo que limita el esclarecimiento de procesos y las posibles aplicaciones clínicas (Chong, 2015., Deguchi, *et al*, 2016).

#### **1.4.2 Modelo *in vivo***

Los modelos *in vivo* son cruciales para el estudio y comprensión de la remodelación ósea, patologías óseas y metástasis ósea, así como para la evaluación de tratamientos. Los modelos *in vivo* más empleados son los ratones, porque poseen similitudes fisiológicas y genéticas con los seres humanos (Chong, 2015., Simmons, *et al*, 2015). La ovariectomía empleada para estudiar la pérdida ósea relacionada con la deficiencia de estrógenos (Bouxsein, *et al*, 2005) es un ejemplo de modelo *in vivo* para estudiar mecanismos óseos. Por otro lado, para el estudio de metástasis ósea se emplean modelos xenoinjertos, los cuales consisten en implantar células tumorales en ratones inmunodeficientes, también se utiliza inoculación intracardiaca, intravenosa e intratibial de células tumorales en ratones, además del uso de ratones transgénicos (Holen & Lawson, 2014). Los modelos *in vivo* tienen la ventaja de proveer un ambiente que incluye las condiciones físico-químicas y fisiológicas aproximadas a las reales que no pueden ser replicadas *in vitro*, aunque se ven limitados por cuestiones éticas y de costos lo cual restringe el número de experimentos para obtener datos estadísticamente fiables (Chong, 2015., Curtin, *et al*, 2012., Gomes & Fernandes, 2011).

### 1.5 Modelos *ex vivo*

Recientemente el modelo *ex-vivo* ha sido empleado para la investigación de hueso y el estudio eficaz a nivel celular y molecular de las interacciones importantes en la morfogénesis y metástasis del cáncer. Este modelo se distingue por ser un tipo de cultivo constituido de tejidos biológicos de un organismo, manteniendo la organización tridimensional y en el caso del hueso conservando la diversidad celular, dichos tejidos son colocados en un medio con condiciones definidas que simulen de forma muy similar el microambiente natural. Algunos ejemplos de modelos *ex vivo* son: cultivos de la cabeza femoral de ratón para estudiar el metabolismo de cartílago y hueso, cultivos del metatarso de ratón para entender el desarrollo óseo y modelos de cultivo de una porción de mandíbula de rata para estudiar reparación ósea (Marino, *et al*, 2016). La principal ventaja de estos modelos, es el poder realizar experimentos en los que es factible representar de forma similar y controlada los eventos fisiológicos y físico-químicos que tienen lugar de forma natural en los organismos, permitiendo la investigación de mecanismos de crecimiento y, recambio óseo, carga mecánica e inclusive la interacción con otros tipos celulares. Además de superar las limitaciones éticas. A pesar de ser un modelo prometedor, se tiene la limitación de que aún no hay un modelo *ex-vivo* adecuado para simular las condiciones del microambiente óseo en condiciones normales, patológicas y en respuesta a las interacciones cáncer-hueso (Curtin, *et al*, 2012., Marino, *et al*, 2016).

## 2. Antecedentes

Sakai y colaboradores (2000) utilizaron un modelo *ex vivo* para investigar resorción ósea; el objetivo de su trabajo fue investigar si la liberación de activina a partir del hueso estaba acoplada con la resorción ósea. Para la investigación utilizaron calvarias de ratones y las cultivaron en presencia de varios estimuladores de resorción ósea, tales como la hormona paratiroidea (PTH), interleucina-1 $\beta$ , prostaglandina E<sub>2</sub>; el tiempo de cultivo fue de 72 horas. La actividad de activina fue medida a través de un bioensayo donde obtuvieron que la activina era acumulada en proporción del tiempo y al incremento dependiente de la dosis en el calcio liberado a partir del hueso en el medio. Estos resultados sugieren que la liberación de activina a partir del hueso está fuertemente acoplada a la resorción ósea.

Garret (2003) realizó un ensayo de cultivos de calvaria de ratón para evaluar el efecto en la formación ósea de diferentes agentes con actividad anabólica. El ensayo lo dividió en tres partes: el aislamiento de calvaria a partir de ratones de 4 días de edad; el cultivo de la calvaria en presencia de diferentes factores y componentes durante un periodo de 4 y 7 días; por último, la evaluación de la formación de hueso nuevo mediante análisis histológico. A partir de los cultivos realizados, se encontró que BMP2, Insulina, IGF-1, FGFa, FGFn, LIF y endotelina-1 (ET-1) estimulan la formación de hueso nuevo a los 4 días, sin embargo, se obtuvieron mejores resultados en el día 7.

Mohammad y colaboradores (2008) modificaron la técnica de cultivos de calvaria de ratón propuesta por Garrett en 2003. Para el ensayo se emplearon calvarias a partir de ratones con 4 días de edad y se evaluó el efecto en la formación ósea de BMP2, Insulina y ET-1 a diferentes concentraciones, en un periodo de cultivo de 7 días, al finalizar los cultivos los tejidos fueron procesados mediante histología y realizaron el análisis histomorfométrico correspondiente. El ensayo a los 7 días resultó en la formación de hueso nuevo y un incremento significativamente menor en el número de osteoblastos. En el día 4, observaron mayor número de proliferación de osteoblastos y menor formación ósea.

Nordstand y colaboradores (2009) establecieron y validaron un modelo *ex vivo*, para estudiar y comprender las interacciones entre el hueso y las células de cáncer de próstata. Para desarrollar el modelo utilizaron calvarias provenientes de ratones CsA de 4-7 días de edad, las líneas celulares de cáncer de próstata humano PC-3 y LNCaP y 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, un factor inductor de osteólisis. Los resultados obtenidos fueron los obtenidos de acuerdo al fenotipo de cada línea celular; las células PC-3 y D3 incrementaron la expresión de genes involucrados en la diferenciación, actividad y función de los osteoclastos (Rankl, CathK, Trap y MMP-9) y disminuyeron la expresión de genes asociados con la diferenciación de osteoblastos y la mineralización ósea (Alp, Ocl y Dkk-1); las células LNCaP activaron genes en la clavaría asociados con la diferenciación de osteoblastos y mineralización

Curtin y colaboradores (2012) desarrollaron y establecieron un modelo *ex vivo* tridimensional de metástasis, utilizando co-cultivos de calvarias provenientes de ratones CD-1 de 5-7 días de edad y cuatro líneas celulares: dos de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231) y dos de cáncer de próstata humano (PC-3 y LnCap). Los cultivos se pusieron en un sistema de tubo rotatorio a 37°C durante 8 días. Los resultados mostraron que en los cultivos de calvarias con células de cáncer bajo condiciones de hipoxia, las células presentan afinidad y especificidad por el endostio del hueso, donde se observó su colonización y proliferación concurrente con la diferenciación de células progenitoras de osteoclastos y resorción ósea. Por otro lado, en el modelo de formación ósea, las células de cáncer de mama siguieron mostrando inducción de resorción ósea, mientras que las células de cáncer de próstata promovieron la formación ósea.

En los años recientes, se han comenzado a emplear modelos *ex-vivo* para estudiar tratamientos y moléculas involucradas en metástasis ósea. Rana y colaboradores (2013) emplearon co-cultivos *ex-vivo* de osteoblastos provenientes de calvaria de ratón de la cepa C57BL/6J y células mononucleares de medula ósea de un ratón adulto, para probar si el tratamiento con doxorubicina podría afectar la formación de osteoclastos mediada por osteoblastos. Los cultivos fueron realizados en únicamente medio y en presencia de doxorubicina, 1D11 (un anticuerpo que bloquea las tres isoformas de TGF- $\beta$ ), o combinación de ambos. Los resultados mostraron un incremento estadísticamente significativo en el número de osteoclastos mediados por osteoblastos después del tratamiento con doxorubicina, y el tratamiento con 1D11 restaura el número de osteoclastos aun nivel normal. Con el resultado concluyen que doxorubicina posiblemente estimula a TGF- $\beta$ , que a su vez modula la proporción RANL/OPG, de tal forma que favorece la formación de osteoclastos, tanto directa como indirectamente.

Siclari y colaboradores (2014) utilizaron un co-cultivo *ex-vivo* de explantes de calvaria ósea provenientes de ratones C57BL/6 de 11 días de edad y células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 para evaluar el efecto de adrenomedulina (AM) en la metástasis ósea; también realizaron cultivos de calvaria en presencia y ausencia de AM y analizaron la formación de hueso nuevo. El periodo de cultivo empleado fue de 6 días. Se observó que AM incrementa la respuesta osteolítica en el hueso por las células de cáncer de mama, y que moléculas antagonistas de esta molécula disminuyen la expresión de marcadores de la actividad osteoclástica.

### 3. Justificación

El hueso es un tejido conectivo dinámico, que tiene diversas funciones; debido a sus funciones el hueso está expuesto continuamente a diversos estímulos por lo que está en constante remodelación. El ciclo de remodelación ósea está conformado por dos procesos: resorción y formación ósea. Para mantener la integridad del hueso los procesos de remodelación deben estar regulados y acoplados. Un desajuste en la remodelación ósea provoca un desbalance en la tasa de resorción o formación ósea, induciendo la aparición de diversas patologías óseas. También, existen enfermedades como el cáncer de mama, el cual afecta el ciclo de remodelación ósea en aproximadamente el 70% de los pacientes en etapa avanzada, debido a la metástasis ósea provocada por las células tumorales. La capacidad de invasión, migración y supervivencia de las células tumorales se ve influenciada por el microambiente del sitio metastásico, tal es el caso del microambiente óseo, en donde se origina una sobreexpresión de TGF- $\beta$  con capacidad de promover la metástasis ósea, aunque dicho efecto puede ser mitigado por la expresión de BGs.

Es de suma importancia esclarecer los mecanismos implicados en remodelación ósea para poder comprender las diversas patologías óseas y ofrecer posibles tratamientos para enfermedades como la osteoporosis; por otro lado, en la investigación sobre cáncer es primordial indagar minuciosamente en el proceso de la metástasis y su relación con el microambiente metastásico, sin embargo, los modelos tanto *in vitro* como *in vivo* que actualmente se emplean para el estudio de la biología ósea presentan diversas limitaciones, como la representación simplificada del microambiente y los costos, respectivamente

Existe una gran necesidad por el desarrollo de nuevos modelos experimentales que faciliten el estudio de mecanismos desregulados en las enfermedades óseas y que permitan realizar experimentos a bajo costo, a tiempos más cortos, reducir el número de animales, el sufrimiento causado por los procedimientos experimentales, así como evaluar líneas celulares tanto de ratón como humanas.

En este proyecto se desarrollaron dos modelos *ex vivo* con la finalidad de crear un ambiente artificial compaginado con tejido biológico. El primer modelo de formación ósea que permite evaluar mecanismos implicados en este proceso, además de ser apto para estudiar enfermedades óseas, asimismo ayuda a evaluar agentes anabólicos o moléculas estimuladoras de formación ósea con potencial terapéutico para ser empleadas en enfermedades de resorción ósea. Un segundo modelo de microambiente tumoral óseo, donde se recrearon las condiciones del microambiente metastásico lo más parecidas a las condiciones naturales para que en el futuro permita realizar experimentos de evaluación de mecanismos de resorción, metástasis ósea y posibilite la evaluación de agentes inhibidores de ambos procesos.

## 4. Hipótesis

La implementación y estandarización de dos modelos *ex-vivo*; un modelo utilizando cultivos de calvarias, posibilitará recrear eventos de formación ósea para estudiar enfermedades óseas, así como la evaluación de moléculas con potencial terapéutico. En un modelo *ex vivo* utilizando co-cultivos de calvaria y células cancerosas, permitirá recrear las condiciones del microambiente óseo necesarias para el crecimiento de las células óseas y cancerígenas, facilitando el estudio de los mecanismos de resorción y metástasis ósea, así como la búsqueda y evaluación de agentes inhibidores de estos procesos.

## 5. Objetivos

### 5.1 . Objetivo general

Desarrollar modelos de cultivo *ex vivo* para el estudio de la formación ósea y la interacción de las células cancerosas con el hueso.

### 5.2 . Objetivos específicos

1. Realizar la extracción y el cultivo de calvaria de ratón en condiciones óptimas.
2. Estandarizar el modelo de formación ósea evaluando la inducción de formación de hueso nuevo.
3. Estandarizar el modelo del microambiente tumoral óseo mediante la interacción de las células cancerosas con el hueso.
4. Caracterizar ambos modelos *ex vivo* por histología y evaluar la expresión de genes involucrados en remodelación ósea.
5. Evaluar el efecto de betaglicano soluble recombinante en ambos modelos *ex vivo* como inhibidor de la vía del TGF- $\beta$ .

## Capítulo 2

---

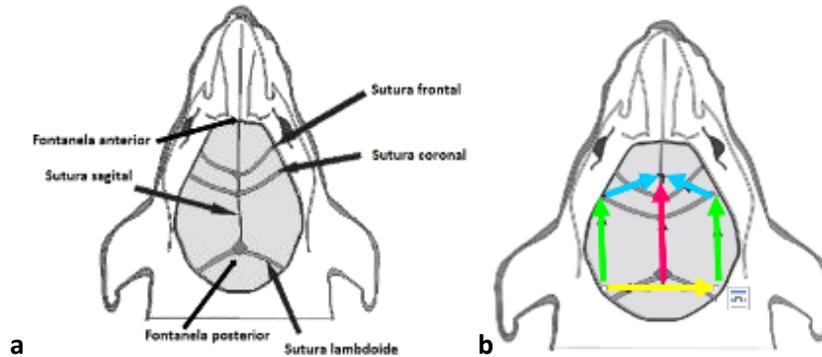
### 6. Materiales y Métodos

#### 6.1 . Disección de calvaria

Los ratones fueron obtenidos a partir de ratones hembra BALB/c AnNhsd (Harlan-Envigo) o FVB CIEA (UPEAL-Cinvestav) preñadas, las cuales se obtuvieron a partir de cruzas puestas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica. Los ratones usualmente nacen en el día 21-22 de gestación y las camadas obtenidas oscilan entre 5-9 ratones. Por lo anterior, se esperó alrededor de un mes a partir de poner la crua para obtener a los ratones. El manejo de los ratones se realizó conforme a la norma mexicana NOM-062-Z00-1999.

Para los ensayos realizados, las calvarias fueron disectadas a partir de ratones BALB/c de 4-5 días de edad y ratones FVB de 5 días de edad. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de cuidado apropiadas con alimento y agua *ad libitum*. La disección de calvaria de ratón se realizó bajo condiciones estériles y conforme al protocolo descrito por Mohammad y colaboradores (2008) con las siguientes modificaciones.

Los ratones se sumergieron en etanol al 95% durante 2 segundos y después se sacrificaron por decapitación con ayuda de tijeras estériles. La cabeza se colocó en una caja Petri preparada previamente con PBS 1X, con la finalidad de mantenerla hidratada. La cabeza se transfirió a otra caja Petri, para realizar la extracción de la calvaria. El pliegue del cuero cabelludo fue retirado con ayuda de las pinzas, subsecuentemente, en un extremo de una de las suturas lambdoides se penetra con las microtijeras y se inició con un corte recto a través de las suturas lambdoides, después, a partir de cada uno de los extremos de las suturas lambdoides se realizaron cortes rectos en dirección a la sutura coronal, aproximadamente hasta el nivel de los ojos, en un ángulo de 45° se realizaron otros cortes rectos para conectar el final del corte con el centro de la fontanela anterior, se procedió a extraer la calvaria con las pinzas de punta fina curva, una vez extraída se realizó un corte recto con el bisturí desde la fontanela anterior hasta la fontanela posterior a través de la sutura sagital (Figura 2). Al obtener las hemicalvarias estas se colocaron en una caja Petri preparada previamente con PBS 1x.



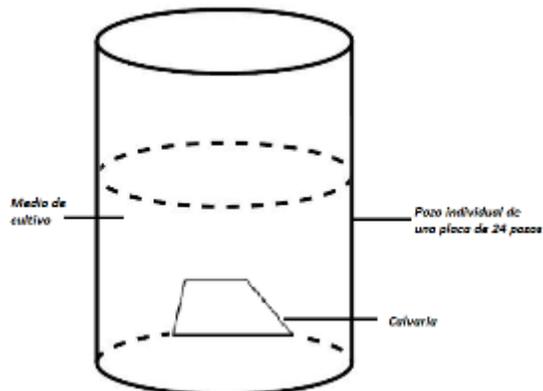
**Figura 2.** Anatomía de la calvaria. a) Identificación de las suturas. b) Diagrama de los cortes (Modificada de Mohammad, *et al*, 2008).

## 6.2 Cultivo de calvaria

Se realizaron tres tipos de cultivos; para el modelo de formación ósea se designó un tipo de cultivo de calvaria, mientras que para el modelo de microambiente tumoral óseo se designaron dos tipos de cultivo, un co-cultivo de calvaria en presencia de células de cáncer y un cultivo de calvaria en presencia de medio condicionado.

### 6.2.1 Pre-incubación de hemicalvarias

Las hemicalvarias se transfirieron a pozos individuales de una placa de 24, y se adiciono 1 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 0.1 % de albúmina de suero bovino (BSA) y 1% de antibiótico (Figura 3). Las calvarias se preincubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar el tiempo de preincubación el medio que contenían los pozos con las calvarias fue retirado y se adiciono el medio correspondiente a la condición a evaluar.



**Figura 3.** Cultivo de calvaria.

### **6.3 Modelo de remodelación ósea**

#### **6.3.1 Cultivo de calvaria con insulina**

Para el modelo de remodelación ósea se utilizaron 3 ratones de la cepa Balb/c de 5 días de edad y 6 ratones de la cepa FVB de 5 días de edad. Las hemicalvarias obtenidas de cada cepa de ratones fueron divididas en dos grupos, el grupo control y el grupo tratado con insulina. A cada pozo con cada hemicalvaria correspondiente al grupo control se le adiciono medio medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 0.1 % de albúmina de suero bovino (BSA), y 1% de antibiótico, mientras que a cada hemicalvaria perteneciente al grupo cultivado con insulina se le adiciono medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 0.1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 1% de antibiótico e insulina a una concentración de 50 µg/ml. La incubación de las calvarias se realizó durante 7 días a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 3 días.

### **6.4 Modelo de microambiente tumoral óseo**

#### **6.4.1 Cultivo celular**

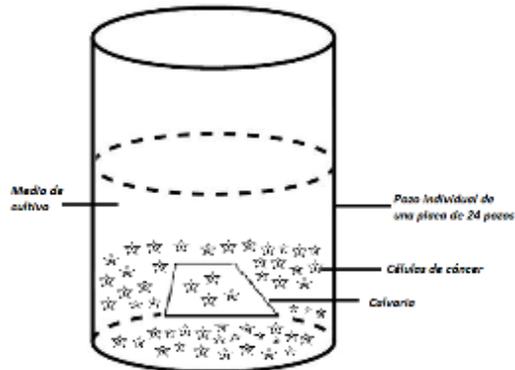
Se utilizaron dos líneas celulares humanas de cáncer de mama para validar el modelo del microambiente tumoral óseo: MDA-MB-231 triple negativo (ER, PR y HER negativo) y MCF-7 doble positivo (ER y PR positivo). Las células de ambas líneas celulares se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo de las líneas celulares se cambió cada 2-3 días.

#### **6.4.2 Co-Cultivos: Interacción directa entre las células de cáncer y el hueso**

Los co-cultivos realizados fueron: con calvarias provenientes de 6 ratones de la cepa Balb/c de 4 días de edad y la línea celular MDA-MB-231; calvarias de 6 ratones de 5 días de edad de la cepa FVB y la línea celular MDA-MB-231; calvarias de 6 ratones de la cepa Balb/c de 5 días de edad y la línea celular MCF-7.

Al concluir el periodo de preincubación de los cultivos de las calvarias, el medio fue retirado de los cultivos y se adiciono medio DMEM suplementado con 2 % de FBS y 1% de antibiótico en los cultivos control mientras que para los co-cultivos, se adicionaron 500,00 células re suspendidas en medio DMEM suplementado con 2 % de FBS y 1% de antibiótico en cada una de las hemicalvarias contenidas en los pozos individuales de la placa de 24 pozos no tratada para cultivo (Corning) (Figura 4). La incubación de los co-

cultivos se realizó durante 7 días a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. En el día 1 de incubación las calvarias se transfirieron a un nuevo pozo individual de una placa de 24 pozos y se les adiciono 1 ml de medio DMEM suplementado con 2 % de FBS y 1% de antibiótico y se continuó con la incubación. El medio se cambió cada 3 días.



**Figura 4.** Co-cultivo.

### 6.4.3 Cultivo de calvaria en presencia de medio condicionado: Efecto indirecto de las células de cáncer en el hueso

El medio condicionado se preparó, a partir de los cultivos celulares de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 con confluencia óptima (~80-100%), se retiró el medio de cultivo normal, seguido de un par de lavados con PBS 1x y la adición de medio de cultivo DMEM libre de suero fetal bovino más 1% de antibiótico. Las células se incubaron durante 48 horas con el medio libre de suero, al culmino de este tiempo el medio fue retirado y colocado en un tubo falcón. El medio condicionado obtenido se centrifugó a 1000 RPM durante 10 minutos a 4°C, posterior a esto se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugo a 2500 rpm durante 15 minutos, finalmente se filtró y almaceno a -20°C para su uso posterior.

Se realizaron cultivos con hemicalvarias provenientes de 6 ratones Balb/c y 6 ratones FVB de 5 días de edad, en presencia de medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231; cultivos de hemicalvarias de 6 ratones Balb/c de 4 días de edad, en presencia de medio condicionado de la línea celular MCF-7.

Después de la pre-incubación se retiró el medio que contenía cada pozo con cada hemicalvaria y se le adiciono 1 ml de medio condicionado a cada pozo. La incubación de las hemicalvarias se realizó durante 7 días a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 3 días.

## 6.5 Validación de los modelos por histología

Después del cultivo, las hemicalvarias se envolvieron en papel china y se colocaron dentro de cassettes histológicos y fueron fijadas en formalina tamponada neutra al 10% en un cuarto frío durante 24 horas. Posterior a la fijación, los cassettes con las calvarias fueron colocados en PBS 1X en agitación durante 30 minutos. Las calvarias dentro de los cassettes fueron desmineralizadas en EDTA 10% en un cuarto frío durante 48 horas.

Para el análisis de las hemicalvarias murinas, se utilizaron técnicas de histología por medio del uso de las tinciones de hematoxilina-eosina para visualizar las áreas de formación o resorción ósea según sea fuera el caso. El protocolo a seguir para la tinción de hematoxilina-eosina, consiste en una deshidratación del tejido a través de una serie de alcoholes al 96 y 100%, procesamiento a través de xileno al 100% y colocarlo en parafina fundida en un procesador automático de tejidos. Los tejidos fueron embebidos en parafina en un molde de metal previo a ser seccionados. Se realizaron cortes de 4 mm con un micrótopo a diferentes niveles a través del tejido y se montaron en los portaobjetos. Para mejorar la adhesión de los cortes de los tejidos a los portaobjetos, se introdujeron en una estufa y se dejaron durante 20 minutos. Los cortes de los tejidos se rehidrataron en xileno al 100%, una serie de alcoholes 100, 95, 80, 70%, y agua. Las secciones de los tejidos se tiñeron con hematoxilina, se lavaron con agua del grifo, se les colocó solución saturada de carbonato de litio, se lavaron de nuevo con agua del grifo, se les colocó alcohol al 96%, se tiñeron con eosina y finalmente fueron deshidratados en una serie de alcoholes del 96 y 100% y se colocaron en xileno. Las secciones fueron montadas con medio de montaje y bajo un cubreobjetos. Una vez montadas las muestras se observaron en un microscopio Nikon eclipse E200 y se tomaron fotografías con una cámara digital Infinity 1 e Infinity Analyze un software de imágenes. El análisis histomorfométrico se realizó mediante el software ImageJ.

## 6.6 Validación de los modelos por PCR cuantitativa en tiempo real

Al culminar con la estandarización de condiciones, los modelos se validaron mediante 1) la evaluación de la expresión de los genes Col1 $\alpha$ , Runx2 y ALP, para el modelo de formación ósea, 2) la expresión de los genes RANKL-OPG, en ambos modelos y 3) evaluando el efecto del betaglicano soluble en la expresión de los genes de Col1 $\alpha$ , Runx2, ALP y RANKL-OPG, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El betaglicano se utilizó como proteína recombinante (la cuál fue producida y donada para nuestros experimentos por el Dr. López-Casillas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM). El betaglicano se empleó como inhibidor de TGF- $\beta$  y fue adicionado a los cultivos de calvaria solos y en combinación con células cancerosas.

### **6.6.1 Extracción del ARN**

Al finalizar el periodo del cultivo o co-cultivo, el medio de cultivo fue removido a partir de cada pozo y las hemicalvarias fueron removidas y colocadas en tubos de 1.5 ml. A cada hemicalvaria se le colocó 100  $\mu\text{L}$  de trizol o 119  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis proveniente del kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep (sigma) con 1.19  $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol. Para la homogeneización de los tejidos se empleó el sistema FastPrep-245G y perlas de 1 mm de zirconia/silica (BioSpec). Las hemicalvarias se pasaron a tubos de rosca de 2 ml junto con el trizol o buffer de lisis y a cada tubo se le adicionaron 70 mg de perlas. El programa para homogeneizar los tejidos consistió en 3 ciclos de 30 segundos cada uno a una velocidad de 6.0, con una pausa de 5 minutos entre cada ciclo, durante los 5 minutos las muestras fueron colocadas en hielo. La extracción de ARN se realizó con el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep (sigma) y con base al protocolo del kit o con base al protocolo de trizol usando el kit. Para el protocolo de trizol, después homogeneizar el tejido las muestras fueron homogeneizadas a 12,000g durante 10 minutos a 4°C, para remover materiales insolubles, se les adicionó 20  $\mu\text{L}$  de cloroformo a cada tubo con una hemicalvaria y se mezcló vigorosamente por 15 segundos para posteriormente incubar durante 3 minutos y continuar con una centrifugación a 12,000g durante 15 minutos a 4°C, la fase clara obtenida a partir de la centrifugación se transfirió al tubo 1 con columna que viene en el kit y se continuó con el protocolo del Kit. El protocolo para extracción mediante kit se realizó conforme a las instrucciones del fabricante, utilizando el tratamiento con DNasa sobre la columna para eliminar la contaminación de ADN genómico. El ARN de cada una de las muestras se eluyó a partir de la columna usando 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de buffer de elución y se almacenó a -80°C. La concentración del ARN y la lectura de absorbancia a 260/280 nm fueron cuantificadas mediante espectrofotometría con Nanodrop LITE (Thermo Scientific). La lectura de absorbancia se consideró entre 1.8 y 2.1, debido a que de acuerdo al kit de extracción es el rango que indica una pureza aceptable de las muestras. La integridad y el tamaño de la distribución del ARN total purificado se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

### **6.6.2 Retrotranscripción del ARN**

A partir del ARN extraído se realizó PCR transcriptasa inversa para formar ADNc. Se realizaron dos mixes para la reacción, el mix 1 de la reacción consiste de 1  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10mM (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT (Thermo scientific), 500 ng/ $\mu\text{L}$  de ARN y de ser el caso se complementó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Thermo scientific Ambion) para tener un volumen de 13.7  $\mu\text{L}$  por reacción, el mix 1 se colocó en el termociclador a 65°C durante 5 minutos para permitir el primer alineamiento, posteriormente al mix 1 se le colocó el mix 2 que constó de 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5x (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1M (Invitrogen) y 0.3 de enzima Super Script II

Reverse Transcriptase (Invitrogen), la reacción fue incubada a 42°C durante 1h para completar la transcripción. Los ADNc fueron almacenados a -20°C.

### 6.6.3 Evaluación de la expresión de genes involucrados en remodelación ósea mediante

El ADNc se utilizó para realizar PCR cuantitativa en tiempo real y evaluar la expresión de genes asociados a la remodelación ósea y comparar la expresión entre las diferentes muestras sometidas a las diversas condiciones. El mix de la RTPCR contenía 1.7 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 0.4 µl de oligo en dirección 5' (forward primer) (sentido), 0.4 µl de primer reverse (antisentido) y 5µl de Hot-START-IT SYBER Green 2x (Affymetrix). Se utilizaron placas de 96 pozos (Axygen) para realizar la PCR en tiempo real. Para la distribución en la placa se colocaron primero 2.5 µl de cDNA y después 7.5 µl del mix, posterior a colocar el cDNA y el mix correspondiente, la placa se cubrió y se centrifugo a 4°C durante 5 minutos a 1000 g, al término de la centrifugación la placa se colocó dentro del termociclador (Applied Biosystems) y se programaron un total de 40 ciclos en el software 7500 v2.0.6. Los genes a evaluar fueron Col1 $\alpha$ , Runx2, Fosfatasa alcalina (Alp), Osteoprotegerina (Opg) y Rankl; las secuencias de los genes a evaluar se obtuvieron del trabajo reportado por McGee-Lawrence y colaboradores (2013) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Secuencias de primers usados en las reacciones de RT-PCR.

Nombre del gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
Fosfatasa alcalina	CACAGATCCCAAAGCACCT	GGGATGGAGGAGAGAAGGTC
Osteoprotegerina/Opg	CCAAGAGCCCAGTGTTTCTT	CCAAGCCAGCCATTGTTAAT
Rankl	GCTGGGACCTGCAAATAAGT	TTGCACAGAAAACATTACACCTG
Runx2	GGCACAGACAGAAGCTTGATGA	GAATGCGCCCTAAATCACTGA
Col1 $\alpha$ 1	GCTTCACCTACAGCACCTTGT	TGACTGTCTTGCCCAAGTTC

### 6.7 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en los modelos *ex vivo*

Una vez validados los modelos de formación y microambiente tumoral óseo mediante histología y evaluación de la expresión de genes involucrados en remodelación ósea, se utilizaron ambos modelos *ex vivo* para evaluar el efecto que tiene betaglicano soluble (BGs) un inhibidor de TGF- $\beta$ , en el hueso de la calvaria y en hueso de calvaria cultivado en presencia de células de cáncer.

### **6.7.1 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en hueso de calvaria murina**

Para evaluar el efecto de BGs en los cultivos solos de calvarias, se utilizaron hemicalvarias provenientes de 8 ratones de la cepa Balb/c de 4 días de edad, las cuales fueron disectadas conforme al protocolo. Se evaluaron dos concentraciones de BGs: 5µg/ml y 10µg/ml; las hemicalvarias obtenidas a partir de la disección de los ratones se dividieron en 3 grupos: el grupo del control negativo, el grupo de cultivo con 5µg/ml de BGs y el grupo de cultivo con 10µg/ml de BGs. La pre-incubación de los tejidos se realizó de acuerdo al protocolo establecido. Después del periodo de pre-incubación, a los pozos que contenían las hemicalvarias del grupo control se les adiciono medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 0.1 % de albúmina de suero bovino (BSA), y 1% de antibiótico; a los pozos que contenían las hemicalvarias a evaluar con BGs se les adiciono medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 0.1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 1% de antibiótico y la concentración correspondiente de BGs. La incubación de las calvarias se realizó durante 7 días a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 3 días. Al culminar el periodo de incubación las hemicalvarias fueron procesadas para histología y para extracción de ARN de acuerdo a los protocolos establecidos.

### **6.7.2 Evaluación del efecto de betaglicano soluble en co-cultivos de hueso de calvaria y células MDA-MB-231**

Se empleó el modelo de microambiente tumoral óseo de interacción directa para evaluar el efecto de BGs. Se utilizaron hemicalvarias provenientes de 10 ratones de la cepa Balb/c de 4 días de edad, los cuales fueron eutanizados y disectados conforme a los protocolos establecidos, las hemicalvarias obtenidas fueron divididas en 4 grupos: el grupo del control negativo, el grupo del control positivo que en este caso fue medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231, el grupo de co-cultivo en ausencia de BGs y el grupo de co-cultivo en presencia de BGs. La pre-incubación de los tejidos se realizó de acuerdo al protocolo establecido. Después de la pre-incubación de las calvarias, el medio fue retirado de los pozos y se adiciono el medio correspondiente a cada pozo, como se describe en el cultivo de las hemicalvarias conforme al protocolo establecido para cultivos en presencia de medio condicionado y co-cultivos, la única variante fue para el grupo de co-cultivo en presencia de BGs, para este se adicionaron 5µg/ml de BGs al medio de cultivo empleado. Las condiciones de incubación y procesamiento de las hemicalvarias post incubación, se realizaron conforme a los protocolos establecidos.

## 6.8 Estadística

Los datos fueron analizados utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney, prueba estadística no pareada t test y la prueba estadística de Kruskal Wallis con post test Dunns, el análisis se realizó con GraphPad Prism 5, se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

## Capítulo 3

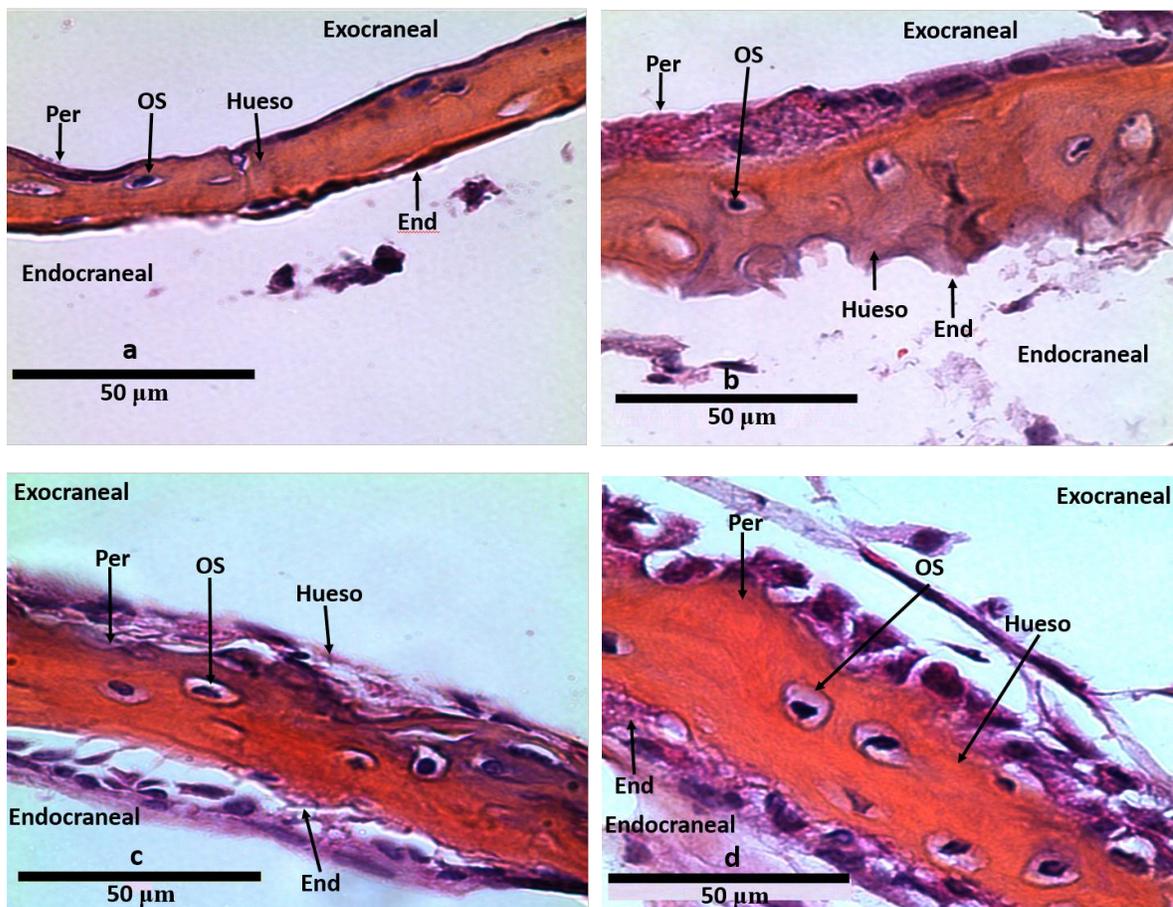
---

### 7 Resultados

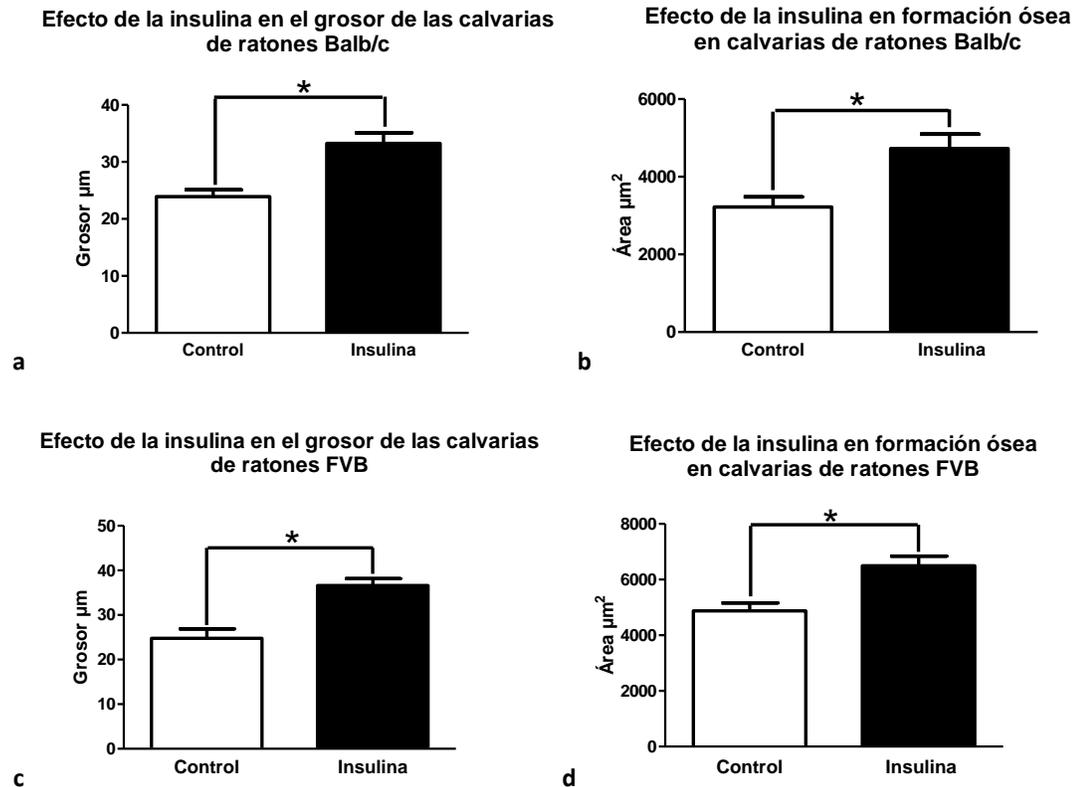
#### 7.1 Histología y análisis histomorfométrico del modelo de formación ósea

##### 7.1.1 Efecto de la insulina en calvarias de ratones Balb/c y FVB

Para evaluar el efecto de la insulina en la formación de hueso nuevo se utilizaron hemicalvarias provenientes de ratones Balb/c, además con el objetivo de determinar si el uso de una cepa diferente de ratones podría afectar el efecto de la insulina en la formación de hueso nuevo, se realizó un experimento con ratones de la cepa FVB. La estructura observada en las secciones teñidas con H&E muestran la integridad de la estructura de los tejidos tanto control como los cultivados en presencia de insulina, exhibiendo la presencia de osteocitos dentro del hueso de los tejidos de ambos grupos y ambas cepas; en color naranja se observa el hueso, indicando un aumento de hueso en los tejidos tratados con insulina comparados con los tejidos control (Figura 5). El análisis histomorfométrico realizado tanto para el grosor y área ósea de las hemicalvarias del grupo control y el grupo tratado con insulina, indican un aumento significativo para ambos parámetros en los tejidos tratados con insulina comparados con el control (Figura 6). Los resultados obtenidos a partir de la histología indican que la insulina a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  induce la formación ósea en calvaria de ratones Balb/c y FVB, bajo las condiciones estandarizadas y empleadas en este experimento, también indican que el uso de diferentes cepas no influye en el efecto de la insulina en formación ósea.



**Figura 5.** Secciones de Hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E. a) Hueso de calvaria control proveniente de ratones Balb/c. b) Calvaria de ratones Balb/c cultivada en presencia de 50 µg/ml insulina. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Calvaria de ratones FVB cultivada en presencia de 50 µg/ml insulina. *Per*, periostio; *End*, Endostio; *OS*, osteocito Aumento 40x.



**Figura 6.** Análisis histomorfométrico del a) grosor de las hemicalvarias de ratones Balb/c, b) área ósea de las hemicalvarias de ratones Balb/c, c) grosor de las hemicalvarias de ratones FVB y d) área ósea de las hemicalvarias de ratones FVB, cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Los cambios estadísticamente significativos obtenidos con la prueba estadística Mann Whitney U, se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

## 7.2 Expresión de genes involucrados en remodelación ósea

Para validar el modelo de formación ósea se evaluó la expresión de Runx2, Alpl y Col1 $\alpha$ 1, que son genes involucrados en la formación ósea, también se evaluó la expresión de Rankl y Opg, genes críticos en el proceso de remodelación ósea. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

### 7.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN

La extracción de ARN se realizó con el método descrito en la metodología del kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep. En las tablas 2 y 3 se muestra el rendimiento del ARN total obtenido de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB, tanto del grupo control como del grupo cultivado en presencia de insulina; de igual forma se presentan las relaciones de absorbancia 260/280 de cada muestra, indicando una pureza aceptable.

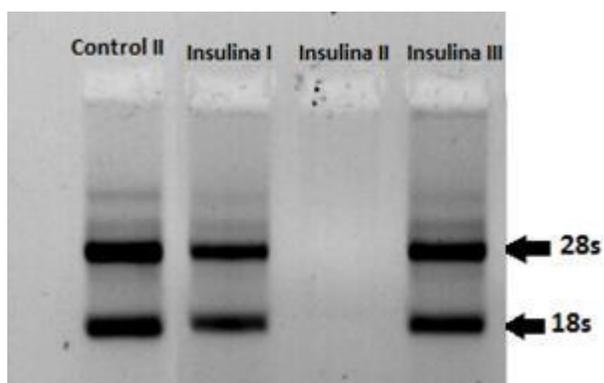
**Tabla 2.** Cuantificación del ARN proveniente de las hemicalvarias de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Elución en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  utilizado para PCR cuantitativa.

Muestra	Cantidad de ARN total (ng/ $\mu\text{l}$ )	Relación A260/A280
Control I	43.8	1.89
Control II	50.7	1.97
Insulina I	39.1	1.89
Insulina II	20.1	1.79
Insulina III	40.8	1.91

**Tabla 3.** Cuantificación del ARN proveniente de las hemicalvarias de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Elución en un volumen de 30  $\mu\text{l}$  utilizado para su análisis en gel.

Muestra	Cantidad de ARN (ng/ $\mu\text{l}$ )	Relación A260/A280
Control I	24.3	1.98
Control II	21.3	1.98
Insulina I	16.7	1.96
Insulina II	8.0	1.76
Insulina III	19.6	2.01

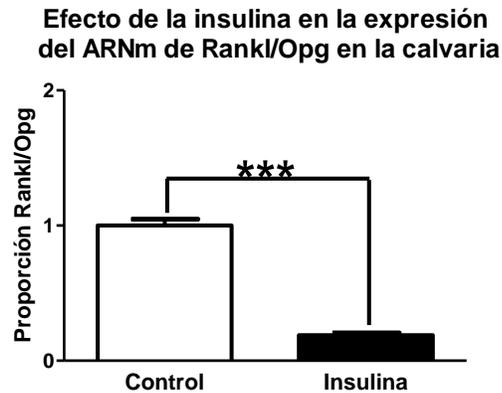
La integridad del ARN se analizó tomando 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra a partir de la elución del volumen de 30  $\mu\text{l}$ . El ARN se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la Figura 7 se muestra el resultado del gel, se observan de manera definida las bandas de los ARN's ribosomales 28s y 18s, esto indica que el ARN obtenido esta integro, sin embargo, en la muestra que corresponde a la hemicalvaria con insulina II no se observa banda alguna, esto puede deberse a la baja concentración de ARN colocada para realizar la electroforesis.



**Figura 7.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias cultivadas en ausencia y presencia de insulina.

### 7.2.2 Expresión del ARNm del sistema RANKL/OPG de calvarias provenientes de ratones FVB en el modelo de formación ósea

Los resultados obtenidos muestran un decremento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) en la expresión de la proporción de RANKL/OPG del 81% en las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina comparadas con las hemicalvarias cultivadas en ausencia de insulina (Figura 8).



**Figura 8.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones FVB cultivados en ausencia y presencia de insulina. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

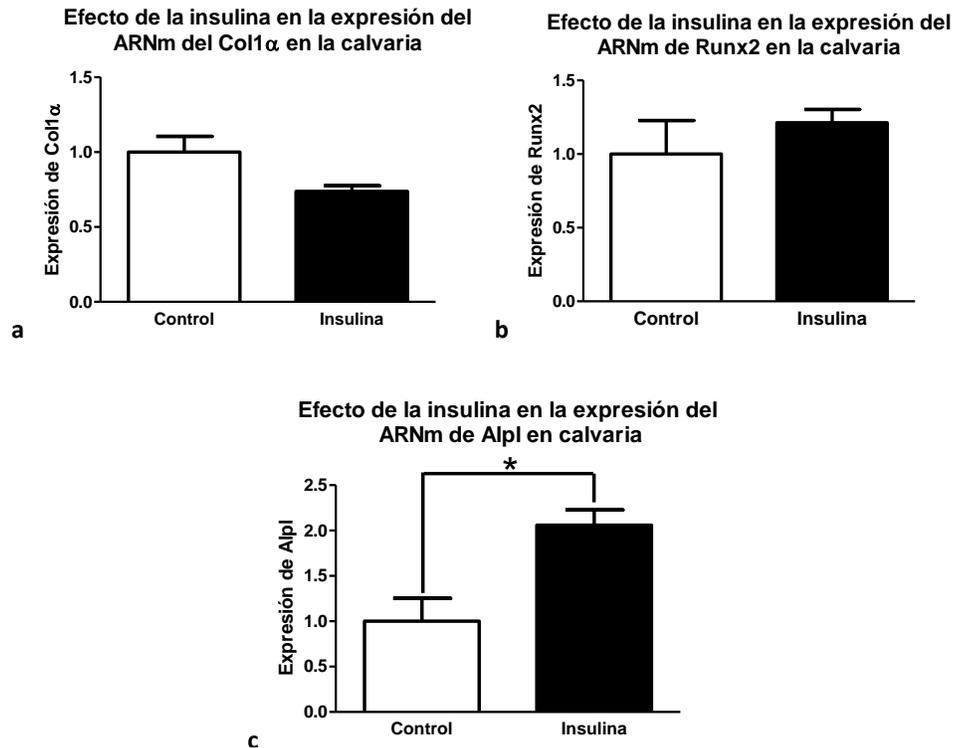
### 7.2.3 Expresión del ARNm de Col1 $\alpha$ , Runx2 y Alpl en calvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina

La expresión relativa del ARNm de Col1 $\alpha$ , Runx2 y Alpl, con respecto a la expresión del gen constitutivo RPL32 se muestra en la Figura 9.

Con base a los resultados obtenidos existe un decremento en la expresión relativa de colágeno tipo 1 del 26% en las hemicalvarias cultivadas con insulina comparadas con las hemicalvarias cultivadas en ausencia de insulina, aunque esta disminución no es significativa (Figura 9a).

Runx2 presenta un incremento en su expresión del 21% comparado con el control, por lo cual este aumento no es significativo (Figura 9b).

El nivel de expresión relativa del ARNm de Alpl de las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina, incrementa significativamente en un 100% comparada con la expresión de las hemicalvarias cultivadas en ausencia de insulina (Figura 9c).



**Figura 9.** Expresión relativa del ARNm de a) Col1 $\alpha$ , b) Runx2 y c) Alpl de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de insulina. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

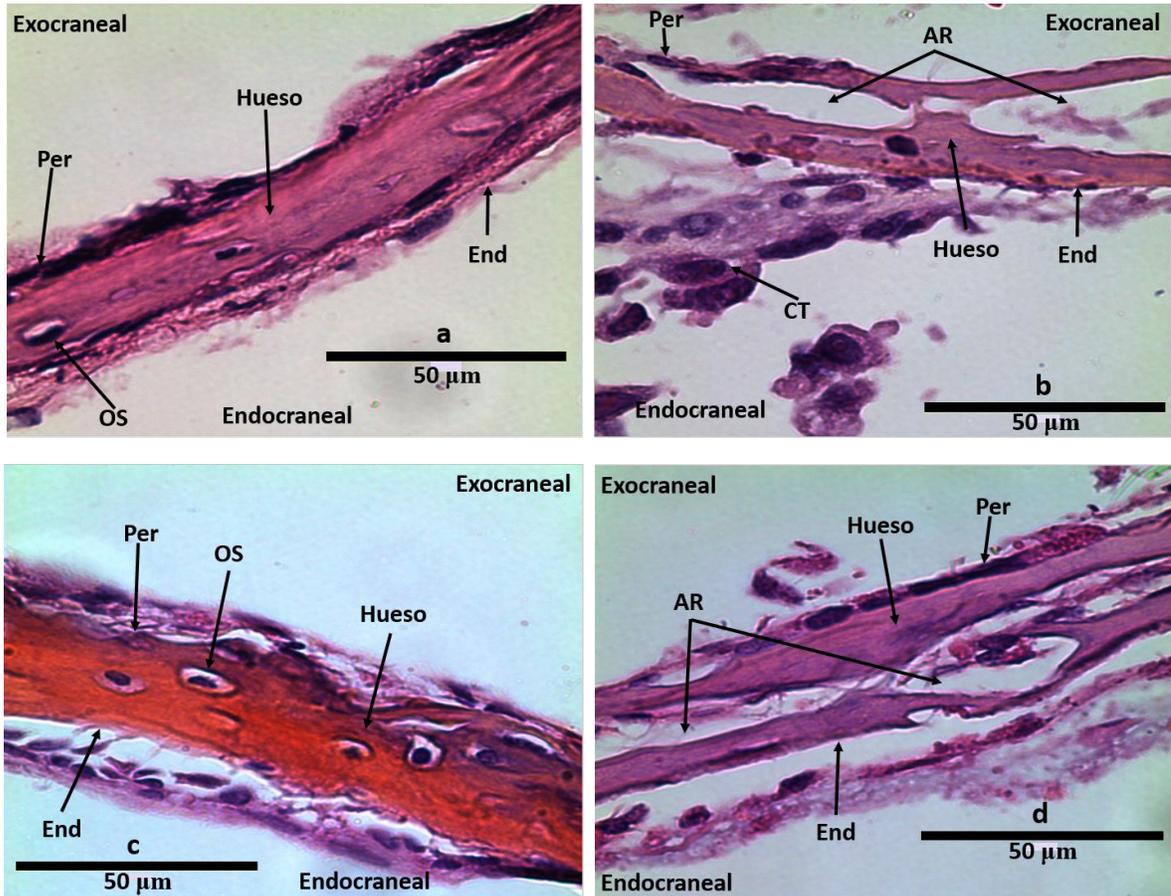
### 7.3 Histología y análisis histomorfométrico del modelo de microambiente tumoral óseo

#### 7.3.1 Modelo de interacción directa entre las células de cáncer y el hueso

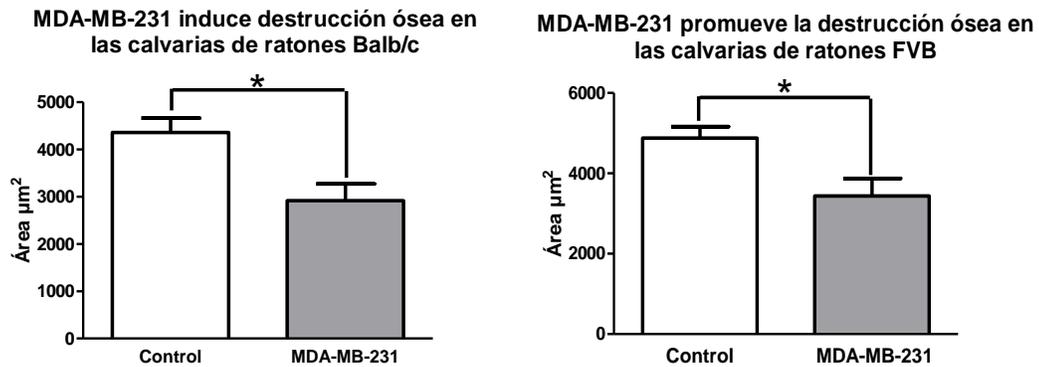
##### 7.3.1.1 Efecto de las células MDA-MB-231 en calvarias provenientes de ratones Balb/c y FVB

Con la finalidad de determinar el efecto de la línea celular MDA-MB-231 en el hueso de calvaria murina y evaluar si existe una diferencia del efecto si se emplean cepas distintas de ratones, se realizaron co-cultivos utilizando esta línea celular y ratones de la cepa Balb/c y FVB. Los resultados obtenidos mediante la técnica de tinción H&E realizada para las secciones de las hemicalvarias, cultivadas en ausencia y presencia de células de cáncer de mama MDA-MB-231, muestran que las hemicalvarias cultivadas en presencia de las células presentan resorción ósea, además, en el caso de las hemicalvarias de ratones Balb/c se observa la presencia de células de cáncer, mientras que las calvarias cultivadas únicamente con medio mantuvieron su arquitectura sin daño alguno (Figura 11). La cuantificación del área ósea de las secciones de hemicalvarias cultivadas tanto en presencia como en ausencia de las células MDA-MB-231 se realizó mediante análisis histomorfométrico, los resultados obtenidos muestran un decremento significativo en área de las hemicalvarias cultivadas con células de cáncer MDA-MB-231 comparadas con

las calvarias control, lo cual indica que la cantidad de células colocadas en los cultivos son suficientes para generar un efecto en el hueso además que dicho efecto no cambia al emplear cepas de ratones diferentes (Figura 12).



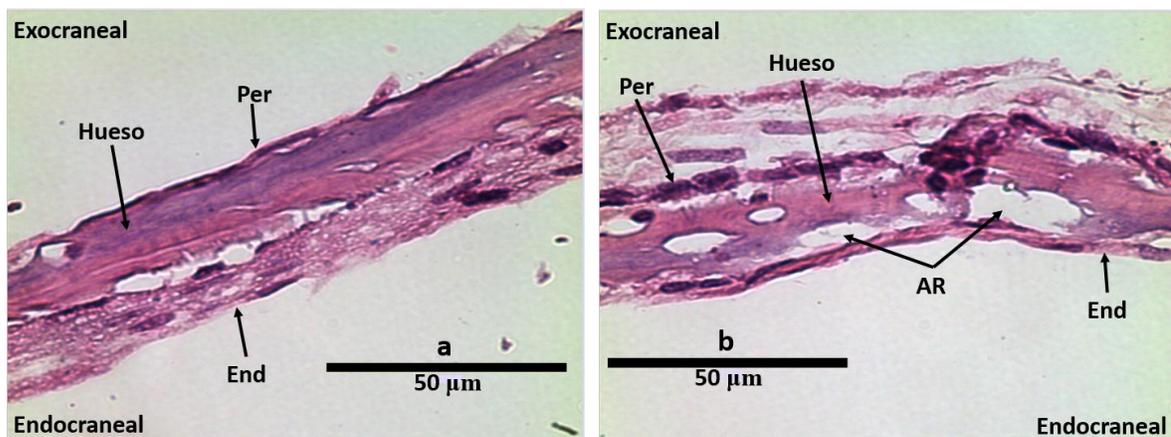
**Figura 10.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control de ratones Balb/c. b) Co-cultivo de hemicalvarias de ratones Balb/c con células MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Co-cultivo de hemicalvarias de ratones FVB con células MDA-MB-231. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción; CT, células tumorales. Aumento 40x.



**Figura 11.** Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. Prueba estadística no pareada t test, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

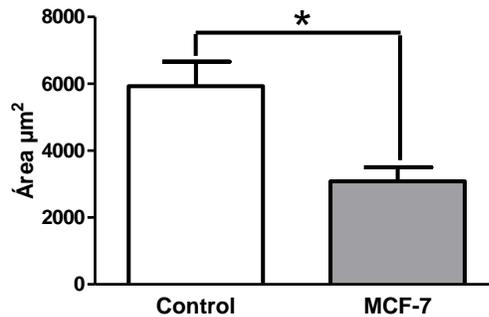
### 7.3.1.2 Efecto de las células MCF-7 en calvarias provenientes de ratones Balb/c

Para estandarizar el modelo de interacción directa de células de cáncer-hueso, pero con otra línea celular se empleó la línea MCF-7. Los resultados obtenidos a partir de histología, se observa que a nivel estructural las hemicalvarias puestas en co-cultivo con células MCF-7 se encuentran dañadas, presentando resorción ósea, mientras que las hemicalvarias cultivadas únicamente con medio presentan su estructura íntegra (Figura 13). Los resultados del análisis histomorfométrico del área de tejido óseo indican un decremento significativo en el área ósea de las hemicalvarias puestas en co-cultivo con células de cáncer MCF-7 comparadas con las calvarias control (Figura 14), estos resultados muestran un efecto en la resorción ósea por parte de las células MCF-7 en el hueso de calvaria de ratones Balb/c.



**Figura 12.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Co-cultivo de calvaria con células MCF-7. *Per*, periostio; *End*, endostio; *LV*, laguna vacía; *AR*, áreas de resorción. Aumento 40x.

### MCF7 induce destrucción ósea en la calvaria

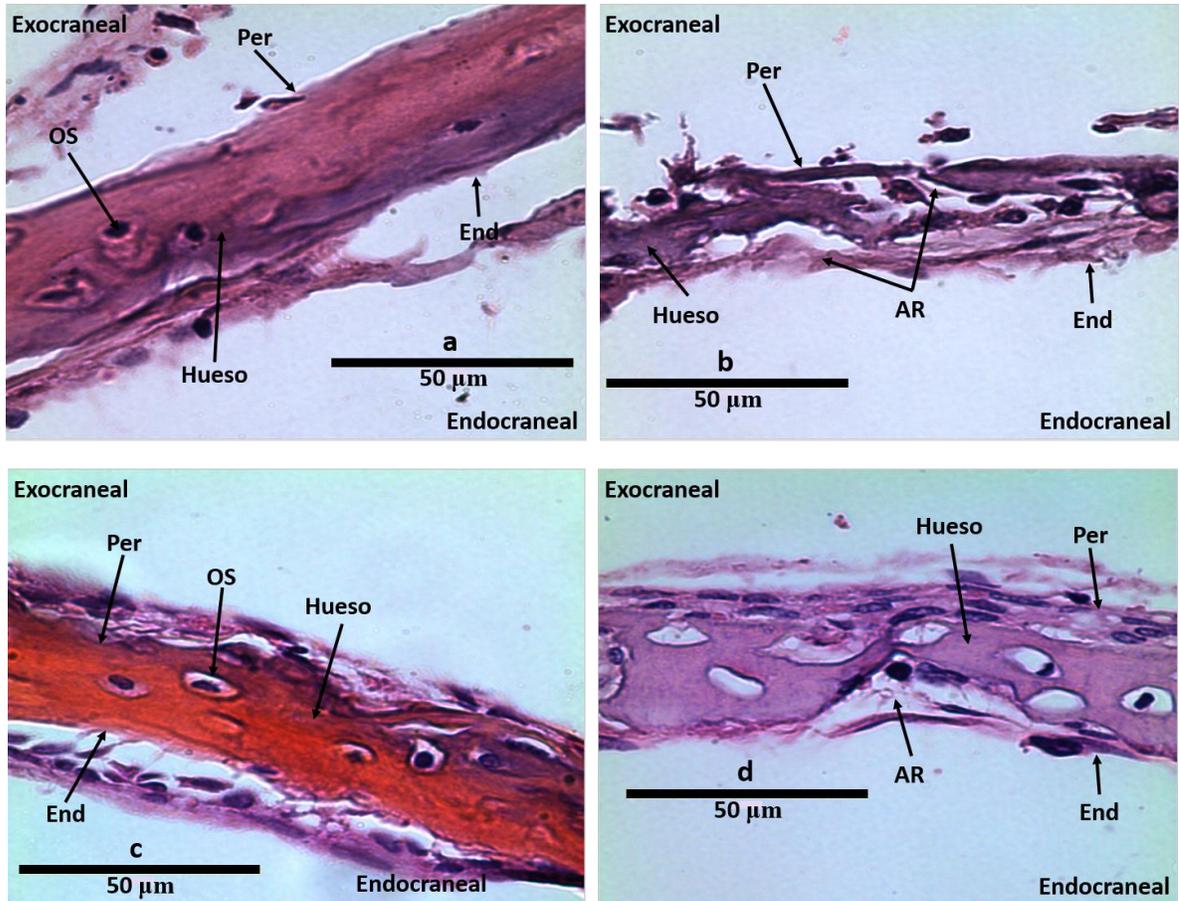


**Figura 13.** Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7. Prueba estadística Unpaired t test, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

## 7.3.2 Modelo del efecto indirecto (factores secretados) de las células de cáncer en el hueso

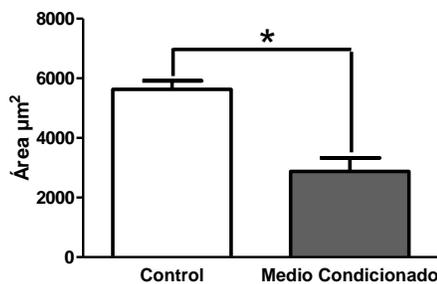
### 7.3.2.1 Efecto del medio condicionado proveniente de las células MDA-MB-231 en calvarias de ratones Balb/c y FVB

Para evaluar el efecto de los factores secretados de las células de cáncer MDA-MB-231 en el medio condicionado sobre el hueso de calvaria murina y determinar que el efecto del emdio condicionado no se ve alterado al emplear una cepa de ratón distinta, se utilizaron cultivos de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB. Con base a los resultados histológicos, a nivel estructural se presenta resorción ósea en las hemicalvarias cultivadas en presencia de medio condicionado, mientras que en las hemicalvarias del grupo control se mantuvo integra la estructura ósea, en el caso de ambas cepas (Figura 15). El análisis histomorfométrico realizado para el área ósea de las hemicalvarias, indica que la medida del área es consistente con lo observado estructuralmente, los resultados muestran una disminución significativa en el área ósea de los tejidos cultivados en presencia de medio condicionado comparada con el área de las hemicalvarias del grupo control, de igual manera los resultados indican que el uso de diferentes cepas no cambia el efecto del medio condicionado proveniente de la línea celularMDA-MB-231 sobre le hueso de calvaria murina (Figura 16).

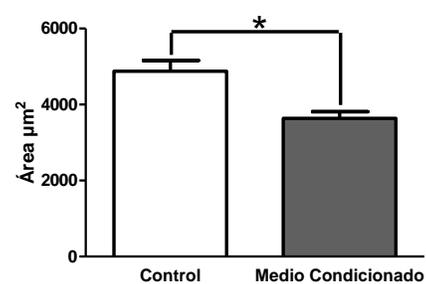


**Figura 14.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control de ratones Balb/c. b) Hueso de calvaria de ratones Balb/c cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria control de ratones FVB. d) Hueso de calvaria de ratones FVB cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231. Per, periostio; End, endostio; OS, osteocito; AR, áreas de resorción. Aumento 40x.

**Efecto del medio condicionado en resorción ósea de las calvarias de ratones Balb/c**



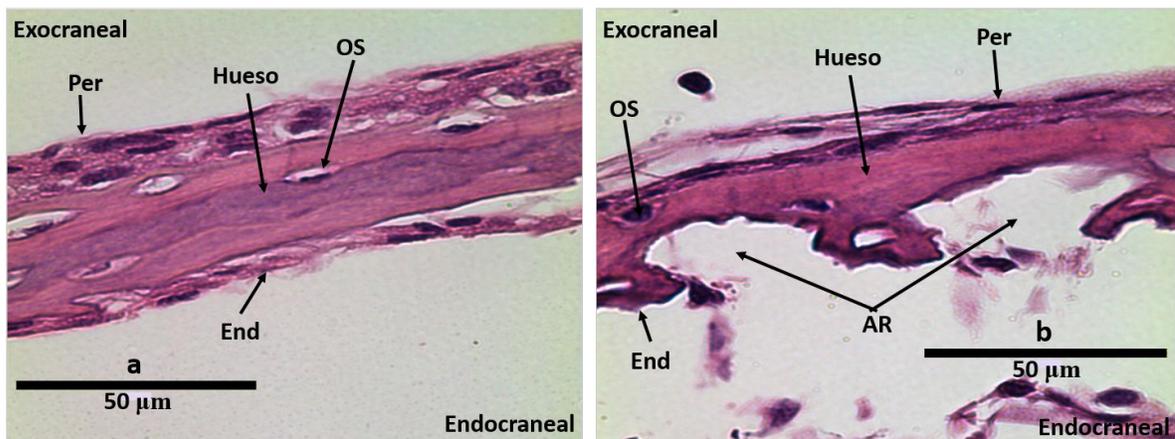
**Efecto del medio condicionado en resorción ósea de las calvarias de ratones FVB**



**Figura 15.** Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

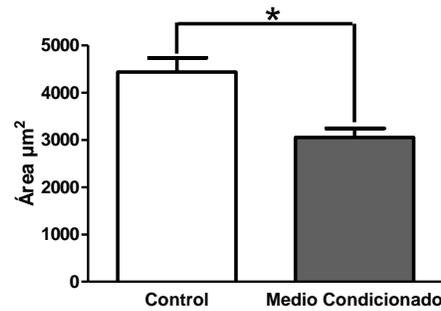
### 7.3.2.2 Efecto del medio condicionado proveniente de las células MCF-7 en calvarias de ratones Balb/c

Para caracterizar el efecto de los factores secretados en el medio condicionado de la línea celular MCF-7 se realizaron cultivos con hueso de calvaria de ratones Balb/c. Los resultados obtenidos a partir del proceso histológico muestran que las estructuras óseas de las hemicalvarias cultivadas en presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7 presentan zonas de resorción ósea, viéndose afectada su estructura comparada con la estructura de las hemicalvarias cultivadas en medio normal que se mantuvo ileso (Figura 17). Se realizó el análisis histomorfométrico para determinar el área ósea de las hemicalvarias cultivadas tanto en ausencia como en presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7; los resultados muestran una disminución en el área ósea de las hemicalvarias cultivadas en presencia de medio condicionado comparada con el área de las hemicalvarias control (Figura 18), por lo que se puede decir que las células MCF-7 promueven la destrucción ósea del hueso de la calvaria murina mediante los factores que secretan en el medio.



**Figura 16.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Hueso de calvaria cultivado en presencia de medio condicionado de la línea celular MCF-7. *Per*, periostio; *End*, endostio; *OS*, osteocito; *AR*, áreas de resorción. Aumento 40x.

### Efecto del Medio Condicionado en la Resorción Ósea



**Figura 17.** Análisis histomorfométrico del área ósea de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

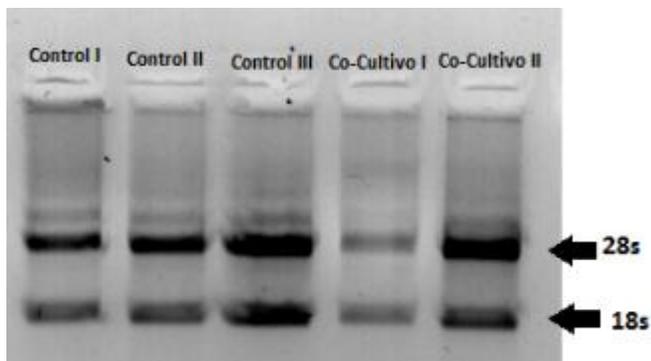
## 7.4 Expresión del sistema RANKL/OPG en el modelo de microambiente tumoral óseo

### 7.4.1 Efecto directo de las células MDA-MB-231 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvarias

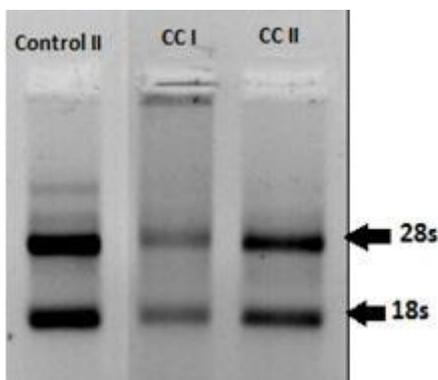
#### 7.4.1.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN de calvarias de ratones Balb/c y FVB

La extracción de ARN tanto para las hemicalvarias del grupo control como las cultivadas en presencia de las células MDA-MB-231 se realizó conforme a el método descrito en la metodología. La concentración del ARN total y pureza de cada muestra se analizaron mediante espectrofotometría con Nanodrop LITE (Thermo Scientific), los valores obtenidos de las concentraciones fueron de 68.3-179.1 ng/µl para los ARN provenientes de las hemicalvarias de ratones Balb/c y 31.6-50.7 ng/µl para los ARN de las hemicalvarias de ratones FVB y los valores de absorbancia de la relación 260/280 de cada muestra indicaron una pureza aceptable.

La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa. En las Figuras 18 y 20 se muestran los gels de agarosa que permiten observar de forma definida las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s, indicando la integridad del ARN obtenido



**Figura 18.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231.

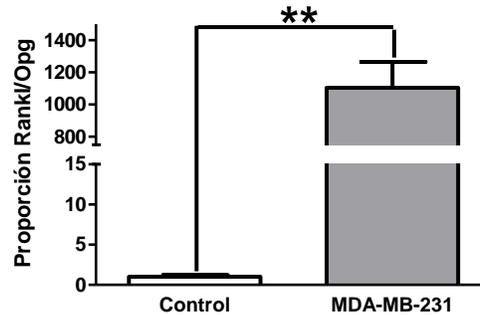


**Figura 19.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones FVB que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231.

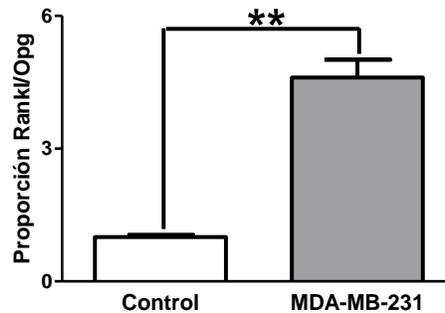
#### **7.4.1.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas con células MDA-MB-231**

Los resultados del análisis de la expresión de la proporción RANKL/OPG muestra un incremento altamente significativo ( $p < 0.01$ ) en la expresión de la proporción Rankl/Opg del 110,387% y 361% en las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB respectivamente, puestas en co-cultivo con células MDA-MB-231 comparadas con las hemicalvarias cultivadas únicamente con medio (Figura 21).

**Efecto de MDA-MB-231 en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en las calvarias de ratones Balb/c**



**Efecto de MDA-MB-231 en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en las calvarias de ratones FVB**



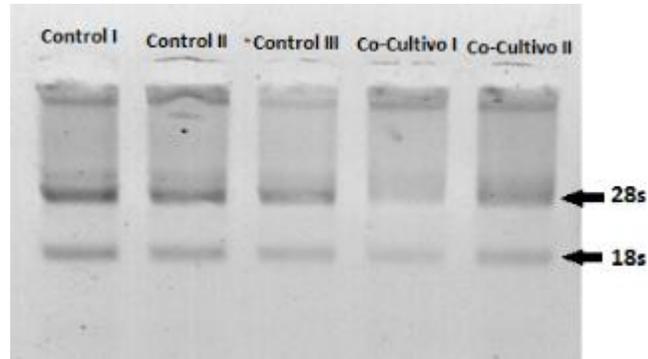
**Figura 20.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas en ausencia y presencia de células MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*  $p < 0.01$ ).

## 7.4.2 Efecto directo de las células MCF-7 en la expresión del sistema RANKL/OPG en calvarias

### 7.4.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante la metodología descrita anteriormente. Los valores de los rendimientos de ARN total obtenido de cada muestra fueron 41.8-161.5 ng/ $\mu$ l y los valores de las absorbancias de la relación 260/280 indicaron una pureza aceptable.

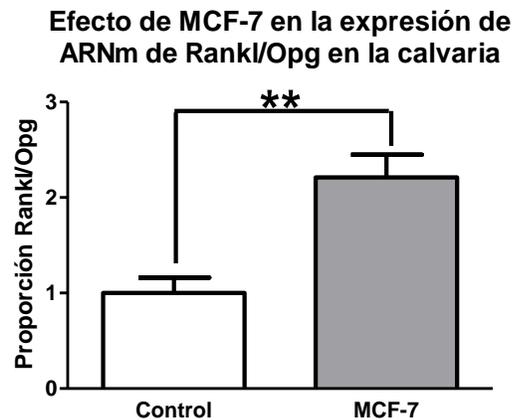
La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa. En la Figura 22 se muestra el resultado del gel, se observan de manera definida las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s, indicando su integridad.



**Figura 21.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7.

#### 7.4.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con células MCF-7

De acuerdo al análisis realizado se observa un aumento altamente significativo ( $p < 0.01$ ) en la expresión de la proporción RANKL/OPG del 120% en las hemicalvarias que se co-cultivaron con células MCF-7 comparadas con las hemicalvarias control (Figura 23).



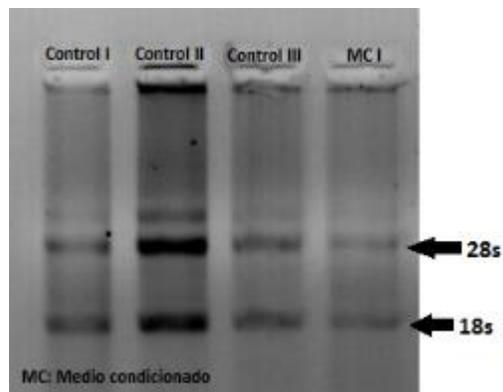
**Figura 22.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de células MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*  $p < 0.01$ ).

### 7.4.3 Efecto indirecto (factores secretados) de las células MDA-MB-231 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvarias

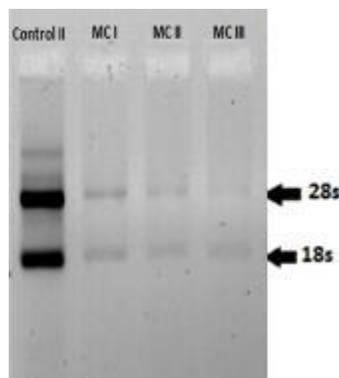
#### 7.4.3.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN de hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB

La extracción de ARN se realizó conforme a la metodología descrita para el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep. Los valores de las concentraciones obtenidos fueron 18.3-108.6 ng/ $\mu$ l y 29.6-50.7 ng/ $\mu$ l, para las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB respectivamente, por otro lado, los valores de la relación de absorbancia 260/280 se encitraron arriba de 1.8, indicando una pureza aceptable de las muestras.

Para evaluar la integridad del ARN se realizó electroforesis en geles de agarosa. Los geles presentan de forma definida las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s, indicando la integridad del ARN obtenido (Figura 24 y 25).



**Figura 23.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231.

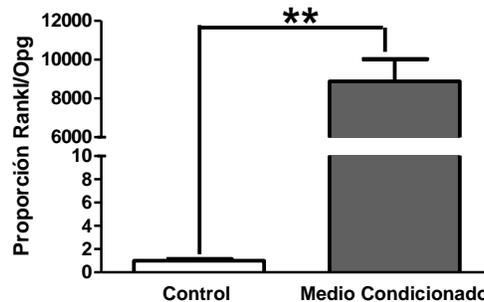


**Figura 24.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones FVB que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231.

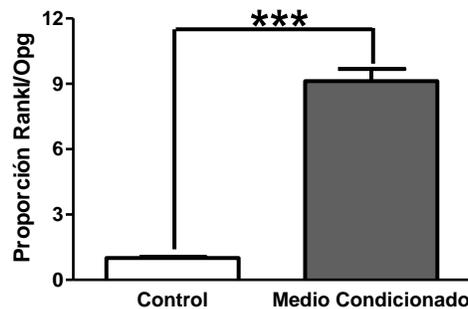
### 7.4.3.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c y FVB cultivadas con medio condicionado de las células MDA-MB-231

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe un incremento altamente significativo ( $p < 0.01$ ) en la expresión de la proporción de RANKL/OPG del 888,448% y 812% en las hemicalvarias de ratones Balb/c y FVB respectivamente cultivadas con medio condicionado comparada con la expresión de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias control (Figura 26). Los resultados indican que al hacer una proporción mayor existe una mayor diferenciación de osteoclastos.

**Efecto del medio condicionado en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en las calvarias de ratones Balb/c**



**Efecto del medio condicionado en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en las calvarias de ratones FVB**



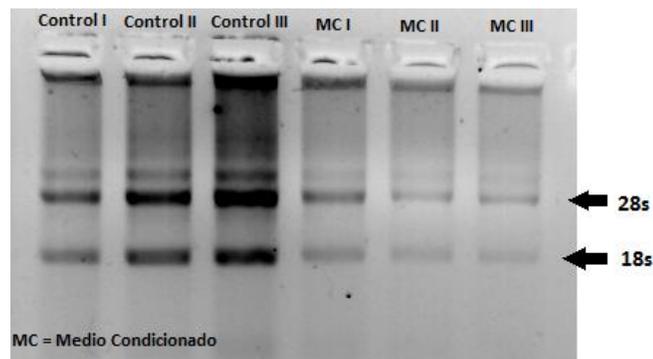
**Figura 25.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*  $p < 0.01$ ).

#### 7.4.4 Efecto indirecto (factores secretados) de las células MCF-7 en la expresión del sistema Rankl/Opg en calvaria murina

##### 7.4.4.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo conforme a la metodología descrita anteriormente. El rendimiento del ARN total obtenido y la pureza se midieron mediante espectrofotometría con Nanodrop LITE (Thermo Scientific), las concentraciones de ARN fueron 19.0-80.2 ng/ $\mu$ l. Los valores de la absorbancia de la relación 260/280 indicaron una pureza aceptable de las muestras.

La integridad se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la Figura 27 se muestra el gel obtenido en donde se observan de manera definida las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s, indicando la integridad del ARN.

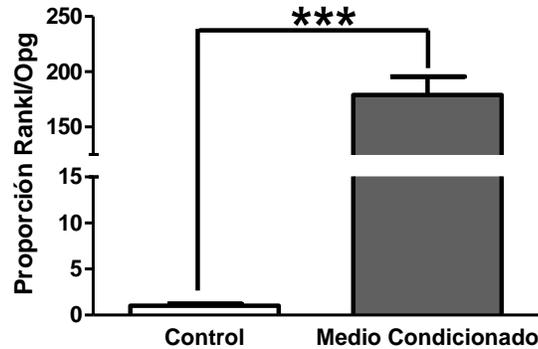


**Figura 26.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7.

##### 7.4.4.2 Expresión de Rankl y Opg en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con medio condicionado de las células MCF-7

Los datos obtenidos muestran un aumento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) del 17,798% en la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias cultivadas con medio proveniente de las células MCF-7 comparadas con las hemicalvarias cultivadas con medio normal (Figura 28).

### Efecto del medio condicionado en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en la calvaria

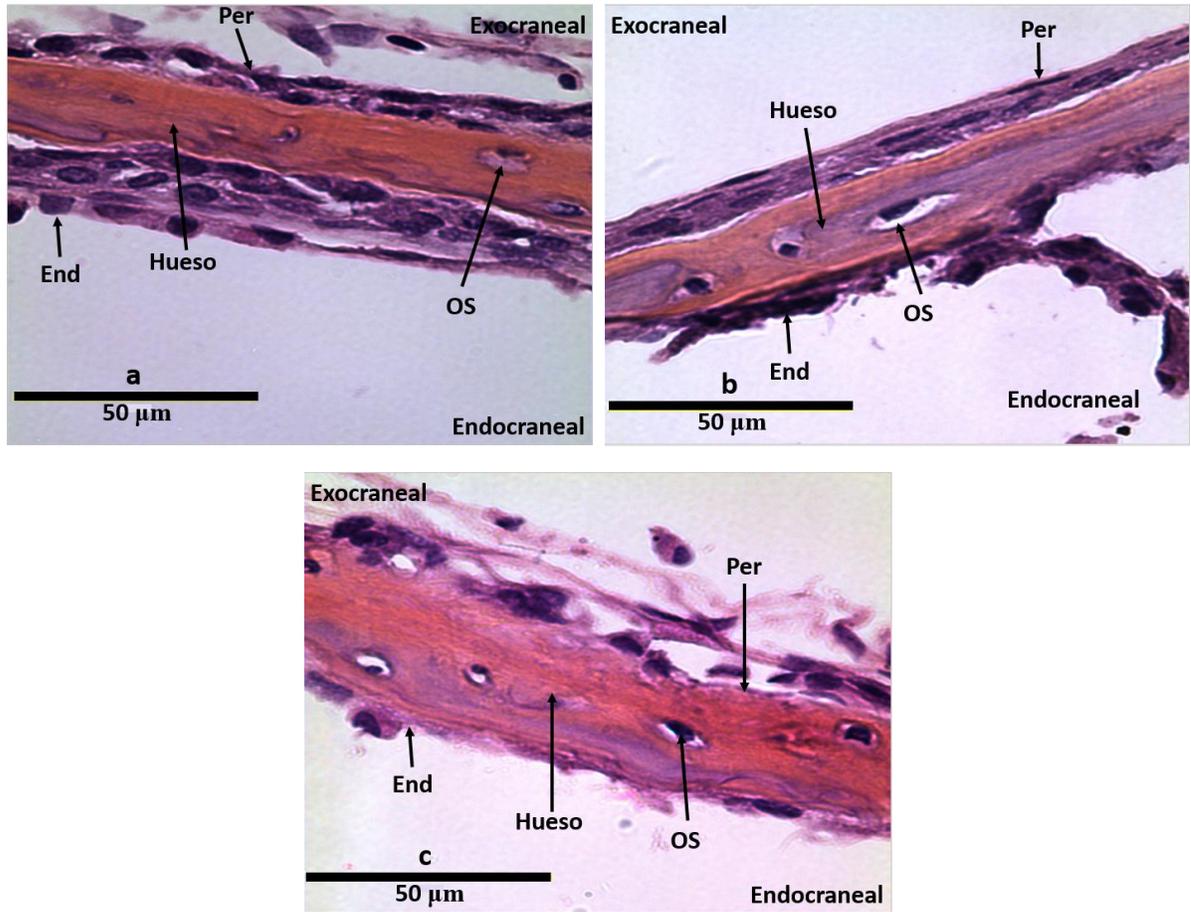


**Figura 27.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia del medio condicionado proveniente de la línea celular MCF-7. Prueba estadística Mann-Whitney U, los cambios significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

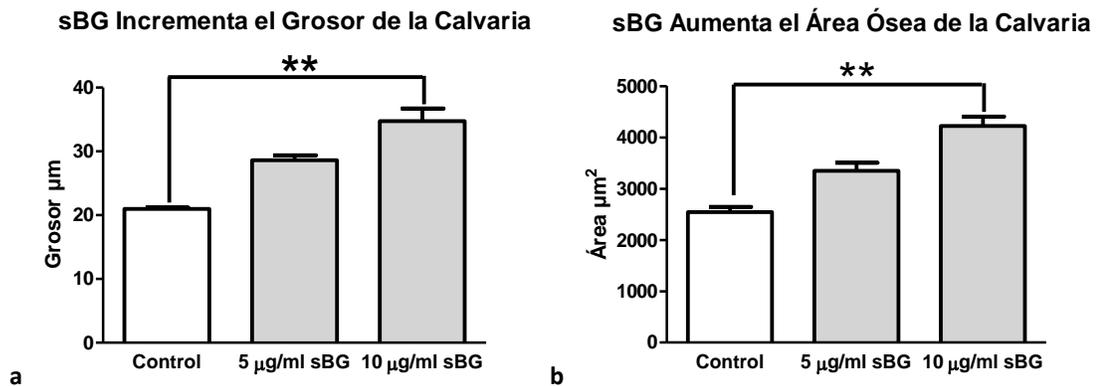
## 7.5 Efecto de betaglicano soluble en cultivos de calvarias de ratones Balb/c.

### 7.5.1 Histología y análisis histomorfométrico de calvarias cultivadas en presencia de BGs

Para evaluar el efecto de BGs, una vez validado el modelo de formación ósea, se emplearon hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en presencia de BGs. Los resultados obtenidos a partir de las estructuras de las calvarias teñidas con H&E muestran que todas las hemicalvarias tanto las del grupo control como las tratadas con las diferentes concentraciones de BGs, mantuvieron su arquitectura además de presentar osteocitos dentro del hueso sin ninguna alteración; en una coloración naranja se observa el hueso, indicando una mayor cantidad de hueso en la hemicalvaria cultivada en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  BGs comparada con el control, no obstante se observa mayor cantidad de hueso en la hemicalvaria cultivada en presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  BGs comparada con el control y con la hemicalvaria cultivada en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 29). El análisis histomorfométrico del grosor y áreas óseas, muestran que las hemicalvarias cultivadas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de BGs presentan mayor grosor y área del hueso respecto a el grosor y área de las calvarias control y que las hemicalvarias cultivadas con una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de BGs incrementan de forma altamente significativa tanto en el grosor como en el área de hueso comparado con el grosor y área de las calvarias control, además de tener un mayor grosor y área que las hemicalvarias cultivadas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de BGs (Figura 30). Los resultados sugieren que BGs induce la formación de hueso nuevo en hemicalvarias murinas.



**Figura 28.** Secciones de hemicalvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Sección de hueso de calvaria cultivada con 5 µg/ml de BGs. c) Sección de hueso de calvaria cultivada con 10 µg/ml de BGs. *Per*, periostio; *End*, endostio; *OS*, osteocito. Aumento 40x



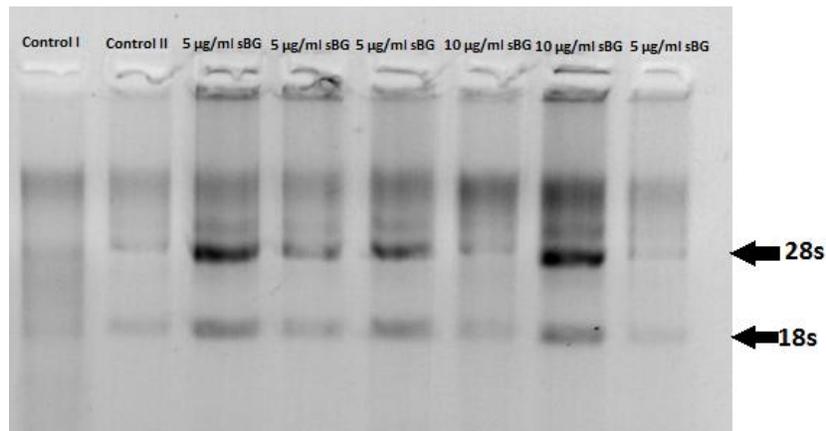
**Figura 29.** Análisis histomorfométrico del a) grosor y b) área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de BGs a concentraciones de 5 µg/ml y 10 µg/ml. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns. Los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\*\* $p < 0.01$ ).

## 7.5.2 Expresión de genes involucrados en remodelación ósea en calvarias cultivadas en presencia de BGs

### 7.5.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN

Para evaluar el efecto de BGs en la expresión de genes primero se realizó la extracción de ARN de acuerdo a la metodología descrita para el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep. La concentración de ARN total y la pureza se analizaron mediante espectrofotometría con Nanodrop LITE (Thermo); los valores de las concentraciones de ARN total oscilaron entre 40.2-79.4 ng/ $\mu$ l; respecto a los valores de la absorbancia 260/280 se encontraron arriba de 1.8 por lo que se consideró una pureza aceptable del ARN.

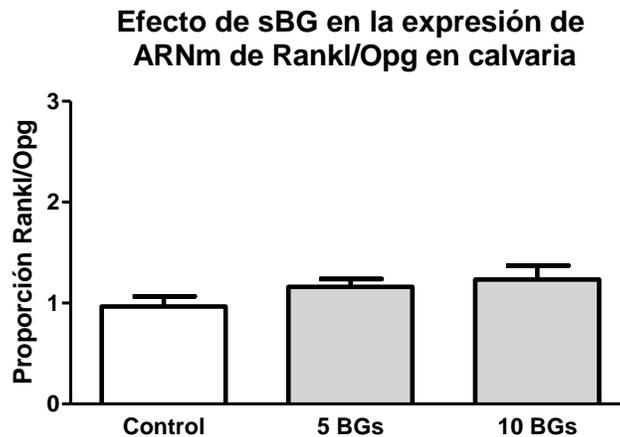
La integridad del ARN se evaluó con electroforesis en un gel. En la Figura 38 se muestra el gel donde se observan las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s, indicando la integridad del ARN extraído.



**Figura 30.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de BGs.

### 7.5.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas en presencia de BGs

Los datos obtenidos no muestran un aumento o reducción significativa en la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias cultivadas con 5  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml de BGs respecto a las hemicalvarias cultivadas únicamente con medio (Figura 32).



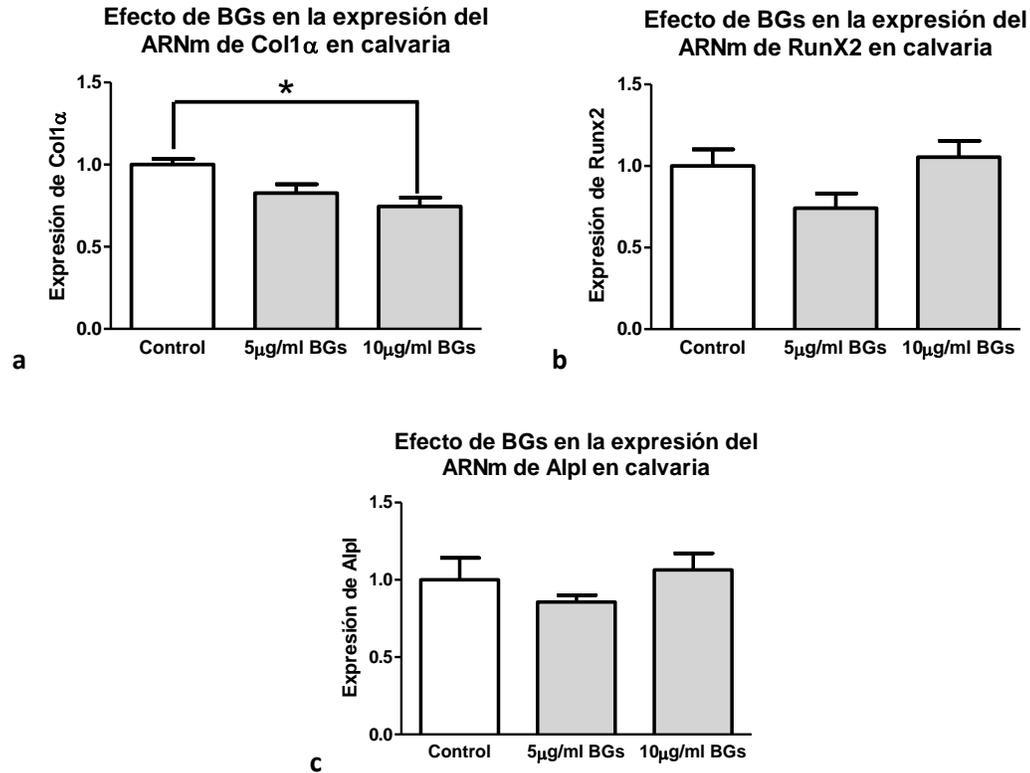
**Figura 31.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns.

### 7.5.2.3 Expresión de Col1 $\alpha$ , Runx2 y Alpl en calvarias cultivadas con BGs

Para complementar el análisis del efecto de BGs en cultivos de calvaria de ratones Balb/c, se evaluó la expresión de Col1 $\alpha$ , Runx2 y Alpl, los cuales fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo RPL32. Los resultados obtenidos de la expresión relativa de colágeno tipo 1 muestran un ligero decremento no significativo en la expresión de ARNm en las hemicalvarias cultivadas con 5 $\mu$ g/ml de BGs respecto a la expresión de las hemicalvarias control; por otro lado, la expresión relativa de colágeno 1 en las hemicalvarias cultivadas con 10 $\mu$ g/ml de BGs disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) en un 25% respecto a la expresión de las calvarias control (Figura 33a).

La expresión relativa de Runx2 muestra una ligera reducción del 25% en los tejidos cultivados con 5 $\mu$ g/ml de BGs comparados con el control, mientras que se observa un mínimo incremento en la expresión del 5% en los tejidos cultivados con 10 $\mu$ g/ml de BGs comparados con el control, no obstante, la reducción e incremento para ambos casos no son significativos (Figura 33b).

Con base a los resultados se presenta una ligera pero no significativa reducción en la expresión de Alpl del 14% en los cultivos 5 $\mu$ g/ml de BGs respecto a la expresión de las hemicalvarias control, y en los cultivos con 10 $\mu$ g/ml de BGs se presenta un ligero, pero no significativo aumento en su expresión del 6% con respecto a las hemicalvarias control (Figura 33c).



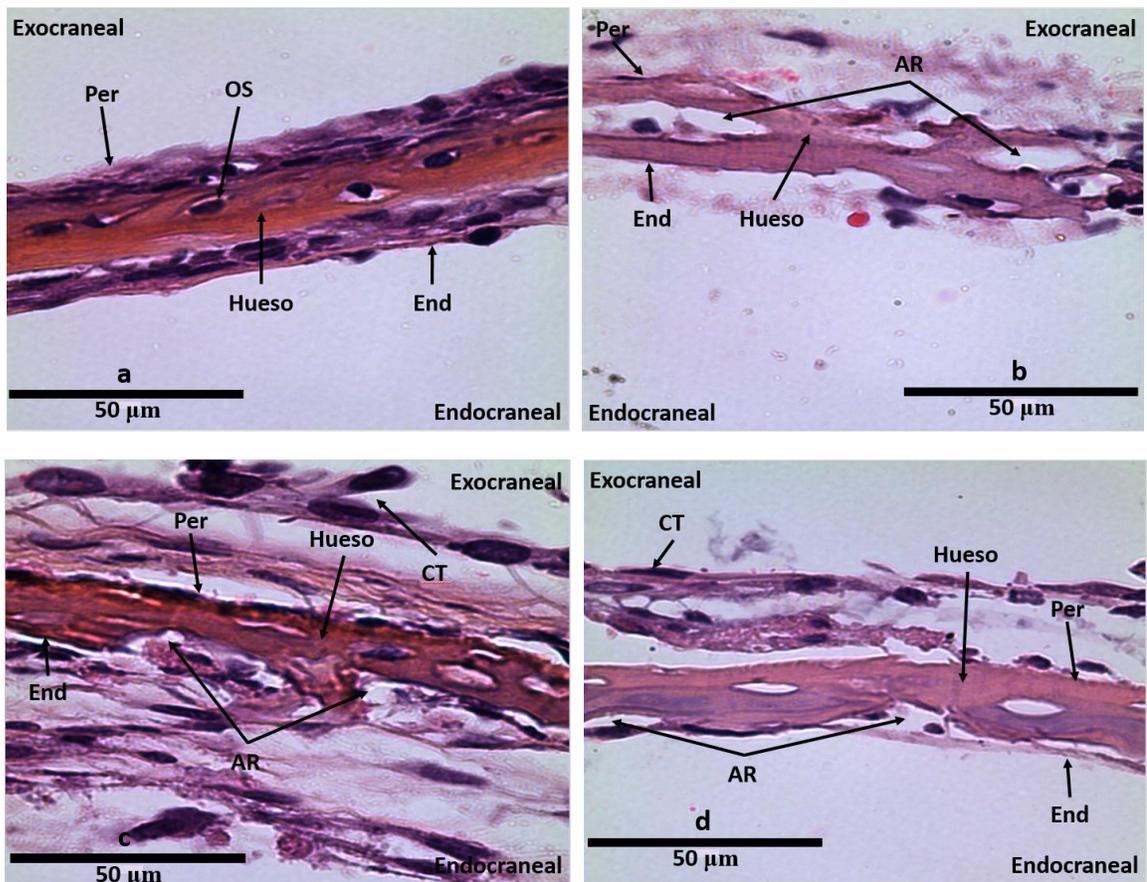
**Figura 32.** Expresión relativa del RNAm de a) Col1 $\alpha$ , b) Runx2 y c) Alpl de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en ausencia y presencia de BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns. Los cambios significativos se muestran en asteriscos (\* $p$ <0.05).

## 7.6 Efecto de betaglicano soluble en co-cultivos de calvarias provenientes de ratones Balb/c con células MDA-MB-231

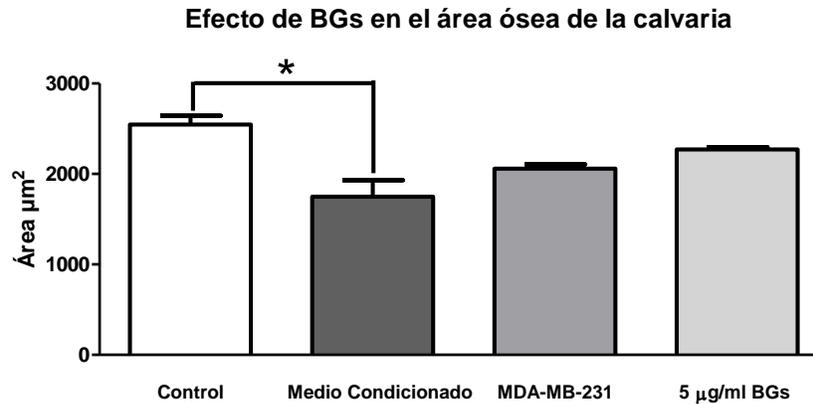
### 7.6.1 Histología y análisis histomorfométrico de calvarias cultivadas con células MDA-MB-231 en presencia y ausencia de BGs

Para evaluar el efecto de BGs en el hueso de calvaria murina cultivada con células de cáncer, se utilizaron hemicalvarias de ratones Balb/c y la línea celular MDA-MB-231. Los resultados obtenidos permiten observar que las estructuras óseas de las hemicalvarias cultivadas únicamente con medio y que fueron teñidas mediante la técnica H&E se mantuvieron intactas, mientras que las estructuras de las hemicalvarias cultivadas con medio condicionado y en presencia de células MDA-MB-231 se encuentran dañadas al presentar resorción ósea, estos resultados eran los esperados para estas condiciones; por otro lado las estructuras de las hemicalvarias cultivadas con células de cáncer MDA-MB-231 en presencia de 5 $\mu$ g/ml de BGs presentan un menor grado de daño óseo al mostrar una reducción de la resorción ósea comparadas con las de las estructuras de hemicalvarias cultivadas con medio condicionado y en co-cultivo con células sin BGs (Figura 34). El análisis histomorfométrico para las hemicalvarias cultivadas en presencia

de medio condicionado indica una reducción significativa del área ósea comparadas con las hemicalvarias control. Respecto al área de las hemicalvarias cultivadas en presencia de células MDA-MB-231 se observa un decremento del área ósea comparada con el área ósea de las hemicalvarias control, aunque este no es significativo. En cuanto a el área ósea de las hemicalvarias puestas en co-cultivo con células MDA-MB-231 en presencia de BGs, existe un incremento no significativo del área ósea comparada con el área de las hemicalvarias en co-cultivo sin la presencia de BGs. Asimismo, las hemicalvarias en co-cultivo en presencia de BGs presentan un ligero pero no significativo decremento del área ósea comparada con el área de las hemicalvarias control (Figura 35).



**Figura 33.** Secciones de calvarias de ratones Balb/c teñidas con H&E a) Hueso de calvaria control. b) Hueso de calvaria cultivada con medio condicionado proveniente de células MDA-MB-231. c) Hueso de calvaria cultivada con células MDA-MB-231. d) Hueso de calvaria cultivada con células MDA-MB-231 en presencia de BGs. *Per*, periostio; *End*, endostio; *OS*, osteocito; *AR*, áreas de resorción; *CT*, células tumorales. Aumento 40x.



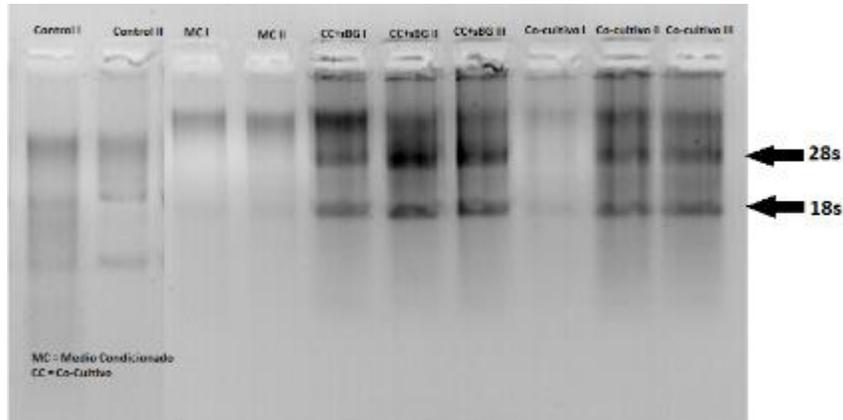
**Figura 34.** Análisis histomorfométrico del área de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células MDA-MB-231 y células MDA-MB-231 más BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns, los cambios estadísticamente significativos se muestran en asteriscos (\* $p < 0.05$ ).

## 7.6.2 Evaluación de la expresión de RANKL y OPG

### 7.6.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del ARN

Para evaluar la expresión de los genes de RANKL y OPG se realizó la extracción de ARN de las hemicalvarias de acuerdo a la metodología descrita. Las concentraciones de ARN total extraído se midieron a través del Nanodrop LITE (Thermo Scientific), los valores de las concentraciones fueron 27.7-97.1 ng/ $\mu\text{l}$ , también se analizó la pureza y los valores de la absorbancia de la relación 260/280 se encontraron por arriba de 1.8, indicando una pureza aceptable del ARN extraído.

Mediante electroforesis en un gel de agarosa se evaluó la integridad de ARN total extraído. Las bandas mostradas en el gel corresponden a los ARN ribosomales 28s y 18s, estas bandas indican la integridad del ARN total (Figura 36). Las bandas de los controles aparecen más abajo que las de las otras muestras, es se debe a que las muestras de los controles se corrieron en otro gel.

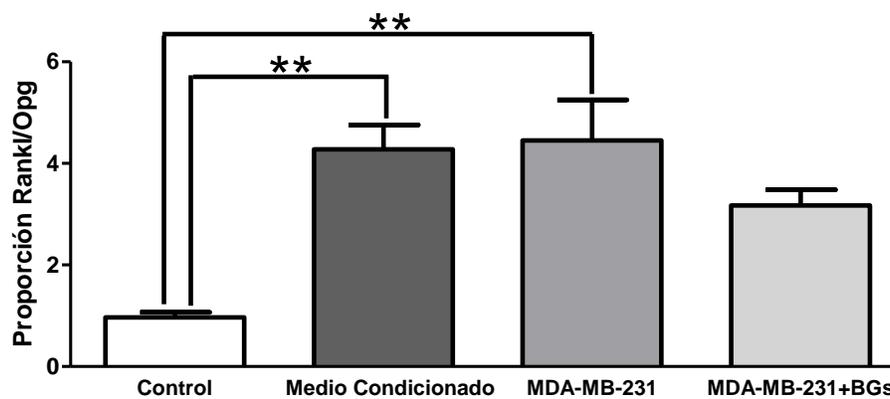


**Figura 35.** Integridad del ARN total en gel de agarosa al 2%, extraído de las hemicalvarias de ratones Balb/c que fueron cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células MDA-MB-231 y células MDA-MB-231 más BGs.

### 7.6.2.2 Expresión de la proporción RANKL/OPG en calvarias de ratones Balb/c cultivadas con células MDA-MB-231 en presencia de BGs

Los datos obtenidos a partir de la PCR cuantitativa en tiempo real indican un aumento altamente significativo ( $p < 0.01$ ) en la expresión de la proporción RANKL/OPG del 330% en las hemicalvarias cultivadas con medio condicionado proveniente de las células MDA-MB-231 y del 350% en las hemicalvarias cultivadas con células MDA-MB-231, comparadas con la proporción de RANKL/OPG de las hemicalvarias control. El incremento en la proporción de RANKL/OPG para las hemicalvarias cultivadas en presencia de medio condicionado y las puestas en co-cultivo, eran resultados esperados. Los resultados de las hemicalvarias en co-cultivo con células MDA-MB-231 más BGs, indican un incremento, aunque no significativo en la proporción RANKL/OPG del 220%<sup>2</sup> respecto a la proporción de las hemicalvarias control. Por otro lado, la expresión de la proporción de RANKL/OPG de los co-cultivos con BGs indica un decremento no significativo del 128% comparada con la proporción de los co-cultivos en ausencia de BGs (Figura 37). Los resultados indican que BGs compensa la resorción ósea causada por las células de cáncer.

### Efecto de BGs en la expresión de ARNm de Rankl/Opg en la calvaria



**Figura 36.** Expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas en ausencia y presencia de medio condicionado, células mDA-MB-231 y células MDA-MB231 más BGs. Prueba estadística Kruskal-Wallis post test Dunns, los cambios significativos se muestran en asteriscos ( $p < 0.01$ ).

## Capítulo 4

---

### 8 Discusión

#### 8.1 Modelo de formación ósea en calvaria murina

Las diversas patologías óseas representan un problema de salud pública principalmente aquellas donde existe pérdida ósea. Actualmente se cuenta con fármacos que inhiben la resorción ósea, sin embargo, continúa existiendo la necesidad de agentes anabólicos que ayuden a estudiar y comprender los mecanismos involucrados en formación ósea, y que puedan incrementar la formación ósea (Mundy, *et al*, 1999). Los modelos *in vivo* empleados para evaluar posibles moléculas terapéuticas y los mecanismos implicados en remodelación ósea se ven limitados en cuestiones éticas y de costos lo que restringe el número de experimentos a realizar durante un estudio, por lo cual el presente trabajo se enfocó en desarrollar un modelo *ex vivo* de formación ósea permitiendo trabajar en condiciones definidas y controladas, pero simulando el microambiente *in vivo*.

El análisis histológico e histomorfométrico para el modelo *ex vivo* de formación ósea muestra un incremento significativo en el grosor del hueso y áreas óseas en las hemicalvarias provenientes de ratones Balb/c cultivadas en presencia de insulina comparadas con las hemicalvarias controles cultivadas únicamente con medio (Figura 5). Existe mayor cantidad de hueso en la hemicalvaria cultivada con insulina comparada con la hemicalvaria control y con esto se demostró que la insulina a una concentración de 50 µg/ml con un periodo de incubación de 7 días induce la formación de hueso nuevo en calvarias provenientes de ratones Balb/c, estos datos concuerdan con lo reportado por Garrett (2003), Mohammad y colaboradores (2008). De manera similar, al evaluar el efecto de la insulina en el hueso de calvarias provenientes de ratones FVB, se observó un incremento significativo tanto en el grosor del hueso como en el área ósea de las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina comparadas con las hemicalvarias control (Figura 5), mostrando mayor cantidad de hueso en la hemicalvaria cultivada con insulina comparada con la hemicalvaria control, demostrando con estos datos que el efecto de la insulina es independiente de la cepa.

El análisis de la expresión de la proporción de RANKL/OPG indica una disminución significativa en las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas en presencia de insulina comparadas con el control. En un estudio para evaluar el efecto de la insulina sobre la expresión de RANKL y OPG, se utilizaron células de osteosarcoma y monocitos humanos, a partir de los datos obtenidos se reportó que la insulina disminuye la expresión del ARNm de RANKL y aumenta la expresión del ARNm de OPG, además que no se observó la formación de osteoclastos en los monocitos, por lo que sus datos sugieren que la insulina

modula la diferenciación de osteoclastos mediante la alteración de la expresión de RANKL y OPG en los osteoblastos (Wang & Zhong, 2013). Los resultados obtenidos de la disminución de la expresión de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina, concuerdan con lo reportado en el estudio mencionado. Con base a lo anterior es posible decir que en las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina hay menor diferenciación de osteoclastos lo que implica que haya una menor tasa de resorción ósea comparada con la tasa de formación ósea y por consecuencia haya un incremento en la formación de hueso, lo cual es congruente con los resultados obtenidos de histomorfometría, confirmando que las condiciones empleadas para estimular formación ósea son factibles.

Por otra parte, existen un estudio donde se menciona que tanto los precursores de osteoblastos como los osteoblastos maduros expresan diferentes isoformas del receptor de insulina, sugiriendo que la insulina tiene un papel crítico en la diferenciación de osteoblastos a partir de las células del estroma de la médula ósea (Klein, 2014). Entonces, para complementar los resultados obtenidos a partir de histomorfometría y el análisis de expresión de la proporción de RANKL/OPG, se analizó la expresión de Colágeno tipo 1, el cual está involucrado en las primeras etapas de diferenciación de osteoblastos y Runx2, un regulador crítico de la diferenciación de osteoblastos y formación ósea (Lian & Stein, 2003). También se evaluó la expresión de fosfatasa alcalina (Alp), una enzima involucrada en la biomineralización por lo que es un marcador de la diferenciación de los osteoblastos (Kim, *et al*, 2004., Robison, 1923). Los resultados obtenidos mostraron que en las hemicalvarias de ratones FVB el tratamiento con insulina no tuvo efecto significativo en la expresión relativa de colágeno tipo 1 y Runx2, con respecto a las expresiones para ambos genes en las hemicalvarias control; no obstante hay un incremento significativo en la expresión de Alp en las hemicalvarias cultivadas en presencia de insulina comparada con la expresión en las hemicalvarias control, indicando que posiblemente en el día 7 las hemicalvarias se encuentran en transición de maduración osteoblástica y biomineralización ósea, produciendo un incremento en la formación ósea. Los resultados obtenidos a partir de la expresión relativa de estos genes involucrados en formación ósea son consistentes con los resultados obtenidos en el análisis histomorfométrico y en la expresión de la proporción de RANKL/OPG. Lo anterior, demuestra que se lograron establecer las condiciones necesarias para inducir la formación de hueso nuevo en calvaria murina mediante el uso de insulina, con lo cual queda estandarizado y validado el modelo, permitiendo su uso para estudiar mecanismos implicados en formación ósea y sirviendo la insulina como control para evaluar otros agentes anabólicos.

## 8.2 Modelo de resorción ósea y microambiente tumoral

La habilidad de las células cancerosas para metastizar y sobrevivir depende de su interacción con el microambiente del hueso (Pecorino, 2012., Weilbaecher, *et al*, 2011., Gnant, 2012., Holen, 2012). Además del modelo de formación de hueso desarrollado, a la par se estandarizo un modelo *ex vivo* para recrear las condiciones del microambiente metastásico lo más similares posibles *in vivo*, y de esta manera contar con un modelo experimental que nos permita evaluar diferentes mecanismos y tratamientos que modulen al hueso en un ambiente controlado que supere las limitaciones que tienen los modelos *in vivo*.

### 8.2.1 Efecto directo de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en calvaria murina

Los resultados obtenidos en el co-cultivo de células cancerígenas en contacto directo con el hueso, muestran que las condiciones son las adecuadas para inducir resorción ósea en el hueso de calvaria murina, recreando las condiciones *in vivo*. El análisis histológico de las secciones de hemicalvarias cultivadas con células de la línea MDA-MB-231 mostradas en la Figura 11, evidencian la presencia de resorción ósea, mientras que las hemicalvarias cultivadas en medio solo no presentan resorción. Los resultados obtenidos a partir del análisis histomorfométrico son consistentes con los resultados obtenidos por Curtin y colaboradores (2012), en donde evaluaron el efecto de de MDA-MB-231 y MCF en hueso de calvaria de ratones CD-1 de 5-7 días de edad, observando a nivel estructural la presencia de resorción ósea.

En cuanto a la expresión de ARNm de la proporción RANKL/OPG las hemicalvarias provenientes de ratones Balb/c cultivadas con la línea celular MDA-MB-231 presentan un incremento significativo comparadas con las hemicalvarias cultivadas únicamente con medio, los datos obtenidos son similares a los reportados en un estudio en donde se utilizó esta línea celular en co-cultivo con células del estroma de medula ósea, induciendo la expresión de RANKL mientras que la expresión de OPG fue inhibida, incrementado la formación osteoclástica de las células del estroma en presencia de células de cáncer (Park, *et al*, 2003). Los resultados obtenidos de la expresión de la proporción RANKL/OPG sugieren que la interacción directa de las células MDA-MB-231 con el hueso de calvaria murina estimulan la expresión de RANKL y a su vez la resorción ósea, además estos datos corroboran los resultados obtenidos a partir del análisis histomorfométrico y lo observado en la Figura 11, demostrando así, que el modelo establecido en el presente trabajo puede ser empleado para investigar mecanismos de metástasis ósea osteolítica y evaluar posibles inhibidores de este proceso.

Del mismo modo, las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas con células MDA-MB-231 presentaron resorción ósea comparadas con sus respectivos controles (Figura 11), además la

expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG de las hemicalvarias provenientes de ratones FVB cultivadas con la línea celular MDA-MB-231 se ve incrementada significativamente en comparación con la expresión de las hemicalvarias control, indicando la estimulación de resorción ósea. Demostrando así que el efecto de la línea celular MDA-MB-231 en interacción con el hueso de calvaria murina es independiente de la cepa de ratón utilizada. Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio al evaluar ambas cepas de ratón y con base a el trabajo reportado por Curtin y colaboradores (2012) corroboran que las condiciones establecidas para este modelo permiten reproducir los resultados, confirmando que el modelo establecido puede ser empleado para fines de investigación.

Por otro lado, se evaluaron co-cultivos con hemicalvarias de ratones Balb/c cultivadas con células MCF-7. De manera similar que con la línea MDA-MB-231, los resultados mostraron que el contacto con MCF-7 produce resorción ósea. Respecto a la expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG, las hemicalvarias cultivadas con células MCF-7 presentaron un aumento significativo, indicando un aumento en la resorción ósea, lo cual es consistente con los datos obtenidos a partir del análisis histomorfométrico. Estos datos concuerdan con estudios previos reportados, en donde la línea celular MCF-7 en co-cultivo con monocitos induce la expresión de RANKL y con esto la osteoclastogénesis y resorción ósea (Nicolin, *et al*, 2008), tomando juntos estos resultados demuestran que tanto las células MCF-7 al igual que las células MDA-MB-231 en interacción directa con el hueso de calvaria murina son capaces de inducir la expresión de RANKL y en consecuencia la resorción ósea, demostrando con esto la eficiencia del modelo establecido.

### **8.2.2 Efecto indirecto (factores liberados) de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en calvaria murina**

El efecto indirecto de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 se evaluó cultivando el medio condicionado de estas células en presencia de calvaria murino de ratones Balb/c y FVB. El medio condicionado de estas líneas celulares estimuló la resorción ósea en las hemicalvarias de ratones de ambas cepas. De igual manera, la expresión de la proporción RANKL/OPG mostró un incremento significativo comparada con la expresión de las hemicalvarias control en ambas cepas y no presentó diferencias entre el medio condicionado entre las dos líneas celulares utilizadas. Indicando así que existe un incremento en la tasa de resorción ósea en las hemicalvarias cultivadas en presencia de medio condicionado y que no se requiere de la interacción directa con el hueso para estimular la resorción ósea. Lo anterior sugiere que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 secretan factores al medio con la capacidad de estimular la resorción ósea. Estos datos son consistentes con los datos de histomorfometría y con lo reportado en la

literatura acerca de la estimulación de resorción ósea mediante el uso de medio condicionado proveniente de las líneas celulares MDA-MB-231 (Curtin y colaboradores, 2012).

### 8.3 Efecto de BGs en calvaria murina

El TGF- $\beta$  es un factor crítico en el proceso de remodelación ósea, debido a que desempeña un papel importante en el acoplamiento de la resorción ósea y formación ósea, influyendo en la expresión y función tanto de osteoblastos como de osteoclastos (Buijs, *et al*, 2011; Chiechi, *et al*, 2013., Saharinen, *et al*, 1999). El TGF- $\beta$  promueve la proliferación de células osteoprogenitoras y favorece las primeras etapas de diferenciación a osteoblastos, sin embargo, también inhibe las etapas posteriores a la diferenciación osteoblástica mediante la represión de la expresión de Runx2 (Barnes, *et al*, 1999., Bostrom & Asnis, 1998., Janssens, *et al*, 2005); por otro lado TGF- $\beta$  también regula el proceso de remodelación ósea mediante la vía de RANKL/OPG y mediante la secreción de prostaglandinas (Dallas, *et al*, 2002., Quinn, *et al*, 2001). Una desregulación en la expresión y función de TGF- $\beta$  conlleva a diversas patologías, por ejemplo, en la osteoporosis en donde se ha reportado la presencia de un incremento en la expresión de TGF- $\beta$  (Erlebacher & Derynck, 1996); por lo cual, para validar el modelo de formación ósea, en el presente trabajo se evaluó el efecto de betaglicano soluble (BGs), el cual es el receptor III del TGF- $\beta$  y un potente antagonista de la señalización (López-Casillas, *et al*, 2008).

El tratamiento de hemicalvarias de ratones Balb/c con BGs 10  $\mu$ g/ml resultó en un incremento significativo en el grosor y área ósea, mientras que no se observaron diferencias con la dosis de BGs 5 $\mu$ g/ml. La expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG en las hemicalvarias tratados con 5 $\mu$ g/ml ó con 10 $\mu$ g/ml de BGs comparadas con hemicalvarias control no muestran ninguna diferencia significativa. Los datos concuerdan con lo reportado por Mohammad y colaboradores (2009) en donde el tratamiento de calvaria con SD208, un inhibidor del receptor tipo I del TGF- $\beta$ , no mostro cambios en la expresión de la proporción RANKL/OPG, pero promovió la diferenciación osteoblástica y formación ósea. De modo similar, se evaluó la expresión de colágeno tipo I, Runx2 y Alp. La expresión de colágeno tipo I disminuyó con el tratamiento de BGs 10  $\mu$ g/ml, mientras que no hubo cambios en el ARNm de Runx2 y Alp. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de TGF- $\beta$  tiene efecto en otras vías de señalización que regulan la diferenciación y función tanto de osteoblastos y osteoclastos, por ejemplo, la vía de ephrin B2 y EphB4, los cuales están implicados en el acoplamiento de la actividad de osteoclastos y osteoblastos, BMP y de Wnt, vías de señalización involucradas en remodelación ósea, en donde se ha reportado que BGs tiene un efecto (Collen, 2007). El efecto de BGs en hueso no ha sido reportado, por lo que se abre la posibilidad de estudiar con más detalle los efectos y mecanismos de BGs en el proceso de formación ósea mediante el

uso del modelo *ex vivo* establecido en el presente trabajo. Un abordaje experimental para estudiar el efecto de BGs, podría ser el realizar un ensayo cultivando calvaria murina con BGs a distintas concentraciones y a distintos tiempos de incubación, de igual forma evaluar la expresión de genes regulados en las distintas vías involucradas en formación ósea.

#### **8.4 Efecto de BGs en co-cultivo de calvaria murina y células MDA-MB-231**

El TGF- $\beta$  es el regulador central del ciclo vicioso de la metástasis ósea, convirtiéndolo en un potente blanco terapéutico (Chiechi, *et al*, 2013., Ehata, *et al*, 2007). Para validar el modelo de co-cultivo de calvaria y células cancerosas evaluamos el efecto del betaglicano soluble, un agente neutralizante de TGF- $\beta$ . (López-Casillas, *et al*, 2008). Estudios anteriores han reportado que betaglicano soluble suprime la tumorigenicidad, progresión, angiogénesis y crecimiento tumoral de células de cáncer de mama (Bandyopadhyay, *et al*, 2002., Dong, *et al*, 2007., Sun & Chen, 1997).

Las hemicalvarias cultivadas con células MDA-MB-231 y BGs 5 $\mu$ g/ml comparadas con las hemicalvarias control mostraron un incremento no significativo en la expresión de la proporción RANKL/OPG. Las hemicalvarias cultivadas con medio condicionado y únicamente con células MDA-MB-231 mostraron una disminución no significativa, siendo congruente con los resultados obtenidos del análisis histomorfométrico. Estos datos y los obtenidos en el modelo de formación ósea, sugieren que betaglicano soluble compensa la excesiva resorción ósea causada por la presencia de células de cáncer mediante la inducción de la diferenciación de osteoblastos y estimulación de formación ósea, además que posiblemente betaglicano disminuye la invasión de las células de cáncer de mama en el hueso de la calvaria murina. No obstante, para corroborar esto se deben realizar más análisis, hacer una curva dosis respuesta BGs y realizar la evaluación de los distintos mecanismos implicados en el proceso de metástasis ósea.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo confirman que los modelos *ex vivo* desarrollados para evaluar la formación ósea, resorción ósea y microambiente tumoral son factibles y confiables para el estudio de mecanismos implicados en metástasis ósea, y evaluación de posibles moléculas terapéuticas.

## Capítulo 5

---

### 9 Conclusiones

Se lograron establecer y estandarizar las condiciones adecuadas de los cultivos de calvarias y las condiciones del procesamiento de los tejidos para los modelos *ex vivo*, el de remodelación ósea y el modelo del microambiente tumoral óseo.

La insulina a una concentración de 50 µg/ml promueve la formación ósea de hueso nuevo de acuerdo a la estructura analizada por histomorfometría y disminuye la expresión del ARNm de la proporción de RANKL/OPG, con base a el análisis realizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Las células de cáncer de mama humano de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 en co-cultivos con la calvaria de ratón promueven la resorción ósea con base a el análisis histomorfométrico e inducen un incremento en la expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG.

El medio condicionado proveniente de las líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7 induce la destrucción ósea mediante la estimulación en la diferenciación y maduración de osteoclastos.

El uso de diferentes cepas de ratones no influye en el efecto en el hueso de la calvaria de la insulina, medio condicionado y de células de cáncer.

Betaglicano soluble induce la formación de hueso nuevo de acuerdo a la estructura analizada por histomorfometría. Betaglicano soluble al estimular la formación ósea no afecta la expresión del ARNm de la proporción RANKL/OPG por lo que es posible que al inhibir a TGF-β, active otras vías de señalización alternas y promueva la función de otros factores proosteoblásticos.

Betaglicano soluble compensa la excesiva resorción ósea en hueso de calvaria provocada por las células de cáncer de mama MDA-MB-231, disminuyendo las áreas de resorción ósea.

La estandarización de modelos *ex vivo* para el estudio de remodelación ósea y metástasis ósea proporcionará a nuestro grupo un modelo rápido y económico para la evaluación de procesos de remodelación ósea y evaluar la interacción de células cancerosas con el hueso, así como la posibilidad de evaluar agentes terapéuticos antiresortivos.

## Literatura citada

- Adler, C. P. (2013). Bone Diseases: macroscopic, histological, and radiological diagnosis of structural changes. *Springer*. Germany.
- Allori, A. C., Sillon, A. M & Warren, S. M. (2008). Biological basis of bone formation, remodeling, and repair; part II: Extracellular matrix. *Tissue engineering part b*. 14 (3), 275-283.
- American Cancer Society. (2014). Breast cancer. Recuperado el 18 de junio de 2015, de: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>.
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S & Rifkin, D. B. (2004). Integrin  $\alpha_v\beta_6$ -mediated activation of latent TGF- $\beta$  requires the latent TGF- $\beta$  binding protein-1. *The journal of cell biology*. 165 (5), 723-734.
- Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, C., Gamboa, C., Lara, F., Pérez, V & Villarreal, P. (2011). Oncoguía: Cáncer de mama. *Cancerología*, 6,77-86.
- Arrigoni. C., Luca, P. D., Gilardi, M., Previdi, S., Broggin, M & Moretti, M. (2014). Direct but not indirect co-culture with osteogenically differentiated human bone marrow stromal cells increases RANKL/OPG ratio in human breast cancer cells generating bone metastases. *Molecular cancer*. 13(1), 238-243.
- Baht, G. S., Hunter, G. K & Goldberg, H. A. (2008). Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix biology*. 27 (7), 600-608.
- Balemans, W., Wesenbeeck, L V & Hul, W. V. A (2005). Clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcified tissue international*. 77 (5), 263-274.
- Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Malik, S. N., Kreisberg, J., Brattain, M. G., Sprague, E. A., Luo, J., Casillas, F. L & Sun, L-Z. (2002). Extracellular domain of TGF- $\beta$  type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene*. 21 (22), 3541-3551.
- Bandyopadhyay, A., Casillas, F. L., Malik, S. N., Montiel, J. L., Mendoza, V., Yang, J & Sun, L-Z. (2002). Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human. *Cancer research*. 62 (16), 4690-4695.
- Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld & Einhorn, T. A. (1999). Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of bone and mineral research*. 14 (11), 1805-1815.
- Brickley, M & Ives, R. (2010). The bioarcheology of metabolic bone disease. *Elsevier*. Oxford, London, San Diego & Burlington.
- Biswas, S., Nyman, S. J., Alvarez, J., Chakrabarti, A., Ayres, A., Sterling, J., Edwards, J., Rana, T., Johnson, R., Perrien, D. S., Lonning, S., Shyr, Y., Matrisian, L. M & Mundy, G. R. (2011). Anti-transforming growth factor  $\beta$  antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone. *Plos one*. 6(11), e27090.
- Bostrom, M & Asnis, P. (1998). Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clinical orthopaedics & related research fracture healing enhancement* (355s) Supplement, S124-S131.

- Bouxsein, M. L., Myers, K. S., Shultz, K. L., Donahue, L., Rosen, C. J & Beamer, W. G. (2005). Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *Journal of bone and mineral research*. 20(7), 1085-1092.
- Boyce, B & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 473 (2), 139-146.
- Boyce, B. (2012). Bone biology and pathology. In: Coleman, RE., Abrahamsson, P-A & Hadji, P. (Eds). *Handbook of cancer-related bone disease*. (pp. 3-21).
- Buckwalter, J. A., City, I., Glimcher., Cooper, R. R & Recker, R. (1995). Bone biology. *The journal of bone and joint surgery*. 77 (8), 1256-1275.
- Buijs, J.T., Stayrook, K.R & Guise, T.A. (2011). TGF- $\beta$  in the bone microenvironment: role in breast cancer metastases. *Cancer microenvironment*. 4 (3), 261-281.
- Centrella, M., Casanovich, S., Kim, J., Pham, T., Rosen, V., Wozney, J & McCarthy, T. L. (1995). Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor  $\beta$  induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *Molecular and cellular biology*. 15 (6), 3273-3281.
- Chiechi, A., Waning, D.L., Stayrook, K.R., Buijs, J.T., Guise, T.A & Mohammad, K.S. (2013). Role of TGF- $\beta$  in breast cancer bone metastases. *Advances in bioscience and biotechnology*. 4 (10c), 15-30.
- Chong, S.K.M. (2015). Experimental models of bone metastasis: Opportunities for the study of cancer dormancy. *Advanced drug delivery reviews*. 94 (1), 141-150.
- Clark, R. K. (2005). *Anatomy and physiology: understanding the human body*. Jones & Bartlett Learning. 474 pp.
- Collen Kirkbride, K. (2007). Elucidating the role of the transforming growth factor- $\beta$  type III receptor in bone morphogenetic protein signaling. PhD thesis in the department of pharmacology and cancer biology. Duke University. 188 pp.
- Crane, J.L., Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling. *The journal of clinical investigation*. 124 (2), 466-472.
- Connolly, E. C., Freimuth, J & Akhurst, R.J. (2012). Complexities of TGF- $\beta$  targeted cancer therapy. *International journal of biological sciences*, 8(7), 964-978.
- Curtin, P., Youm, H & Salih Erdjan. (2012). Three-dimensional cancer-bone metastasis model using *ex-vivo* co-cultures of live calvaria bones and cancer cells. *Biomaterials*. 33(4), 1065-1078.
- Dallas, S. L., Rosser, J. L., Mundy, G. R & Bonewald, L. F. (2002). Proteolysis of latent Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-binding protein-1 by osteoclasts. *The journal of biological chemistry*. 277 (24), 21352-21360.
- Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A & Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-

- associated factors and activation of NF-kappa B and c-Jun in terminal kinase. *Journal of biological chemistry*. 273 (32), 20551-20555.
- Del Fatorre, A., Cappariello, A & Teti, A. (2008). Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*. 42 (1), 19-29.
- Deguchi, T., Alanne, M. H., Fazeli, E., Fagerlund, K. M., Pennanen, P., Lehenkari, P., Hänninen, P. E, Peltonen, J & Näreaja, T. (2016). *In vitro* model of bone to facilitate measurement of adhesion forces and super-resolution imaging of osteoclasts. *Scientific reports*. 6 (22585), 1-13.
- Demers, L. M. (2001). Bone-specific alkaline phosphatase. In: Eastell, R., Baumann, M., Hoyle, N. R & Wiczorek, L. (Eds). *Bone markers: biochemical and clinical perspectives*. Martin Dunitz. United Kingdom. (pp. 27-38).
- Dempster, D.W. (2005). Bone structure and function. In: Maricic, M. J & Gluck, O. S. (Eds). *Bone disease in rheumatology*. (pp. 3-7).
- Dong, M., How, T., Kirkbride, K. C., Gordon, K. J., Lee, J. D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B. J., Marks, J. R & Blobe, G. C. (2007). The type III TGF- $\beta$  receptor suppresses breast cancer progression. *The journal of clinical investigation*. 117 (1), 206-217.
- Dougall, W. C. (2011). Molecular Pathways: Osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clinical cancer research*. 18 (2), 326-335.
- Dunn, L. K., Mohammad, K. S., Fournier, P. G. J., Mckenna, R. C., Davis, H. W., Niewolna, M., Peng, X. H., Chirgwin, J. M & Guise, T. A. (2009). Hypoxia and TGF- $\beta$  drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. *Plos one*. 4(9), 6896.
- Ebeling, P. R. (2001). Potential candidates for bone turnover markers- N-telopeptide cross-links of type I collagen (NTX). In: Eastell, R., Baumann, M., Hoyle, N. R & Wiczorek, L. (Eds). *Bone markers: biochemical and clinical perspectives*. Martin Dunitz. United Kingdom. (pp. 27-38).
- Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, t., Ogata, E., Miyazono, Kohei., Shimizu, K & Imamura, T. (2007). Ki26894, a novel transforming growth factor- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor, inhibits *in vitro* invasion and *in vivo* bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer science*. 98 (1), 127-133.
- Erlebacher, A & Derynck, R. (1996). Increased Expression of TGF- $\beta$ 2 in osteoblast results in an osteoporosis-like phenotype. *The journal of cell biology*. 132 (1&2), 195-210.
- Fournier, P. G., Stresing, V., Ebetino, F. H & Clézardin, P. (2010). How do bisphosphonates inhibit bone metastasis *in vivo*?. *Neoplasia*. 12(7), 571-578.
- Fournier, P. G.J., Juárez, P & Guise, T. A. (2014). Tumor-bone interactions: there is no place like bone. In: Heymann, D. (Eds). *Bone cancer: Primary bone cancers and bone metastases*. (pp. 13-28).
- Garret, R. (2003). Assessing bone formation using mouse calvarial organ cultures. In: Helfrich, M. H & Ralston, S. H. (Eds). *Bone research protocols*. Humana press. Totowa, New Jersey. (pp. 183-198).

- Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T & 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.
- Guise, T. A. (2002). The vicious cycle of bone metastases. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2(6), 570-572.
- Guise, T. A. (2006). Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clinical cancer research*. 12(20), 6213-62-16.
- Guise, T. A. (2009). Breaking down bone: new insight into site-specific mechanisms of breast cancer osteolysis mediated by metalloproteinases. *Genes development*. 23(18), 2117-2123.
- GLOBOCAN. (2012). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Recuperado el 18 de junio de 2015, de: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- Gnant, M. (2012). Bone health in breast cancer. In: Coleman, RE., Abrahamsson, P-A & Hadji, P. (Eds). *Handbook of cancer-related bone disease*. Bioscientifica. Bristol, UK. (pp. 115-140).
- Gomes, P. S & Fernandes, M. H. (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals*. 45 (1), 14-24
- Gorter, D & Dijke, P. (2013). Signal transduction cascades controlling osteoblast differentiation. In: John Wiley & Sons. (Eds). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. (pp. 15-20). ASBMR.
- Hanahan, D & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell press*, 100 (1), 57-70.
- Harvey, N., Dennison, E & Cooper, C. (2008). Epidemiology of osteoporotic fractures. In: John Wiley & Sons. (Eds). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. (pp. 198-202). ASBMR.
- Hikita, A., Limura, T., Oshima, Y., Saitou, T., Yamamoto, S & Imamura, T. (2015). Analyses of bone modeling and remodeling using in vitro reconstitution system with two-photon microscopy. *Bone*. 76(1), 5-17.
- Holen, I. (2012). Pathophysiology of bone metastases. In: Coleman, RE., Abrahamsson, P-A & Hadji, P. (Eds). *Handbook of cancer-related bone disease*. (pp. 37-56).
- Holen, I & Lawson, M. A. (2014). *In vivo* models used in studies of bone metastases. In: Heymann, D. (Eds). *Bone cancer: primary bone cancers and bone metastases*. (pp. 503-518).
- Houston, B., Sterwart, A. J & Farquharson, C. (2004). PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralization in bone and cartilage. *Bone*. 34 (4), 629-637.
- INEGI. (2013). Mortalidad: Causas de defunción. Recuperado el 26 junio de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>
- International Osteoporosis Foundation (IOF). Facts and statistics. Recuperado el 06 de octubre de 2016, de <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics#category-14>

- Janssens, K., Dijke, P., Janssens, S & Hul, W. V. (2005). Transforming Growth factor- $\beta$ 1 to the Bone. *Endocrine reviews*. 26 (6), 743-774.
- Juárez, P., Mohammad, K. S., Yin, J. J., Fournier, P. GJ., Mckenna, R. C., Davis, W. H., Peng, X. H., Niewolna, M., Javelaud, D., Chirgwin, J. M., Mauviel, A & Guise, T. A. (2012). Halofuginone inhibits the establishment and progression of melanoma bone metastases. *Cancer res*. 72 (23), 6247-6256.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cardo, C. C., Guise, T. A & Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell*. 3(6), 537-549.
- Kang, Y & Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 118(3), 277-279.
- Käkönen, S-M., Selander, K. S., Chirgwin, J. M., Yin, J. J., Burns, S., Rankin, W. A., Grubbs, B. G., Dallas, M., Cui, Y & Guise, T. A. (2002). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *The journal of biological chemistry*. 277(27), 24571-24578.
- Kim, Y. J., Lee, M. -H., Wozney, J. M., Cho, J. -Y & Ryoo, H. -M. (2004). Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dix5 and repressed by Msx2. *The journal of biological chemistry*. 279 (49), 50773-50780.
- Klein, G. (2014). Insulin and bone: recent developments. *World journal of diabetes*. 5(1), 14-16.
- Kobayashi, H., Gao, Y. -H., Ueta, C., Yamaguchi, A & Komori, T. (2000). Multilineage differentiation of *Cbfa1*-deficient calvarial cells *in vitro*. *biochemical and biophysical research communications*. 273 (2), 630-636.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, H., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. -H., Inda, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89 (5), 755-764.
- Kong, Y-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H-L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oloveira-dos-Santos, A., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, J. W & Penninger, J. M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397 (6717), 315-323.
- Kostenuik, P. J., Nguyen, H. Q., McCabe, J., Warmington, K. S., Kurahara, C., Sun, N., Chen, C., Li, L., Cattley, R. C., Van, G., Scully, S., Elliott, R., Grisanti, M., Morony, S., Tan, H. L., Asuncion, F., Li, X., Ominsky, M. S., Stolina, M., Dwyer, D., Dougall, W. C., Hawkins, N., Boyle, W. J., Simonet, W. S & Sullivan, J. K. (2009). Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *Journal of bone and mineral research*. 24 (2), 182-195.
- Krishnan, V., Vogler, E. A., Sosnoski, D. M & Mastro, A. M. (2013). *In vitro* mimics of bone remodeling and the vicious cycle of cancer in bone. *Journal of cellular physiology*. 229(4), 453-462.

- Lemaire, V., Tobin, F. L., Greller, L. D., Cho, C. R & Suva, L. J. (2004). Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *Journal of theoretical biology*. 229 (3), 293-309.
- Lian, J. B & Stein, G. S. (2003). Runx2/Cbfa1: A multifunctional regulator of bone formation. *Current pharmaceutical design*. 9 (32), 2677-2685.
- López, C.F., Vilchis, L. M. M., Esparza, L.J., Ponce, C. M. V., Velasco, L. N. G., Juárez, P., Montiel, J.L & Mendoza, V. (2008). Regulation of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily by betaglycan. In: Jakowlew, S.B (Ed). *Basic and clinical biology*. (pp. 451-461). Humana press Inc.
- Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Poznak, C. V., Fleisher, M., Reiss, M., Massagué, J & Kang, Y. (2009). ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes development*. 23(16), 1882-1894.
- Massagué, J. (1998). TGF- $\beta$  signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 67 (1), 753-791.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat rev mol cell biol*. 1 (3), 169-178.
- Mata, Ll. J. (2010). Remodelado óseo. Sociedad Española de Reumatología. (Eds). *Manual de enfermedades óseas*. (Capítulo 2). Ed. Médica panamericana.
- McGee-Lawrence, M. E., Bradley, E. W., Dudakovic, A., Carlson, S. W., Ryan, Z. C., Kumar, R., Dadsetan, M., Yaszemski, M. J., Chen, Q., An, K-N & Westendorf, J. J. (2013). Histone deacetylase 3 is required for maintenance of bone mass during aging. *Bone*. 52 (1), 296-307.
- Mohammad, K. S., Chirgwin, J.M & Guise, T.A. (2008). Assessing new bone formation in neonatal calvarial organ cultures. *Methods mol biol*. 455 (1), 37-50.
- Mohammad, K. S., Chen, C. G., Balooch, G., Stebbins, E., Mckenna, C. R., Davis, H., Niewolna, M., Peng, X. H., Nguyen, D. H. N., Lonova-Martin, S. S., Bracey, J. W., Hogue, W. R., Wong, D. H., Ritchie, R. O., Suva, L. J., Derynck, R., Guise, T. A & Alliston Tamara. (2009). Pharmacologic inhibition of the TGF- $\beta$  type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *Plos one*. 4(4), e5275.
- Morony, S., Capparelli, C., Sarosi, I., Lacey, D.L., Dunstan, C. R & Kostenuik, P. J. (2001). Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer research*. 61(11), 4432-4436.
- Mundy, G. R. (1997). Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*. 80(8), 1546-1556.
- Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini G., Boyce B., Zhao, M & Gutierrez, G. (1999). Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by stains. *Science*. 286(5446), 1946-1949.
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews cancer*. 2(8), 584-593.
- National Cancer Institute (NCH). (2009). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. Recuperado el 18 de junio de 2015, de: <http://www.cancer.gov/types/breast/adjuvant-fact-sheet>

- National Cancer Institute (NCH). (2009). Metastatic cancer. Recuperado el 16 de noviembre de 2015, de: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/metastatic-fact-sheet>
- Nicolin, V., Bortul, R., Bareggi, R., Baldini, G., Martinelli, B & Narducci. (2008). Breast adenocarcinoma MCF-7 cell line induces spontaneous osteoclastogénesis via a RANK-ligand-dependent-pathway. *Acta histochemical*. 110 (5), 388-396.
- Nordstrand, A., Nilsson, J., Tieva, A., Wikström, P., Lerner, U. H & Widmark, A. (2009). Establishment and validation of an *in vitro* co-culture model to study the interactions between bone and prostate cancer cells. *Clin exp metastasis*. 26 (8), 945-953.
- Pardee A. B. & Stein G.S. (2011). *The biology and treatment of cancer: understanding cancer*. John Wiley & Sons. 287 pp.
- Park, H-R., Min, S-K., Cho, H-D., Kim, D-H., Shin, H. S & Park, Y. E. (2003). Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis. *J Korean med sci*. 18 (4), 541-546.
- Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer. mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford University Press. 365 pp.
- Pelengaris S. & Khan M. (2013). *The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside*. John Wiley & Sons. 632 pp.
- Quinn, J. M., Itoh, K., Udagawa, N., Häusler, K., Yasuda, H., Shima, N., Mizuno, A., Higashio, K., Takahashi, N., Suda, T., Martin, J & Gillespie, M. T. (2001). Transforming growth factor  $\beta$  affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *Journal of bone and mineral research*. 16 (10), 1787-1794.
- Rana, T., Chakrabarti, A., Freeman, M & Biswas, S. Doxorubicin-mediated bone loss in breast cancer bone metastases is driven by an interplay between oxidative stress and induction of TGF- $\beta$ . (2013). *Plos one*. 8 (10), e78043.
- Ribatti, D., Mangialardi, G & Vacca, A. Stephen Paget and the "seed and soil" theory of metastatic dissemination. (2006). *Clin exp med*. 6 (4), 145-149.
- Robey, P. G & Boskey, A.L. (2008). The composition of bone. In: John Wiley & Sons. (Eds). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. (pp. 32-37). ASBMR.
- Robison, R. (1923). The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochemical Journal*. 17 (2), 286-293.
- Ross, F. P. (2008). Osteoclast biology and bone resorption. In: John Wiley & Sons. (Eds). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. (pp. 16-21). ASBMR.
- Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology*. 27 (8):1229-1241.
- Russell, G. (2001). Introduction: bone metabolism and its regulation. In: Eastell, R., Baumann, M., Hoyle, N. R & Wiczorek, L. (Eds). *Bone markers: biochemical and clinical perspectives*. Martin Dunitz. United Kingdom. (pp. 1-26).

- Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Taipale, J & Keski-Oja, J. (1999). Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)- structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine growth factor rev.* 10 (2), 99-117.
- Sakai, R., Eto, Y., Hirafuji, M & Shinoda, H. (2000). Activin release from bone coupled to bone resorption in organ culture of neonatal mouse calvaria. *bone.* 26 (3), 235-240.
- Saunders, C & Jassal, S. (2009). *Breast cancer.* OUP Oxford. 147 pp.
- Schär, B. K., Otto, V. I & Hänseler, E. (1997). Simultaneous detection of all four alkaline phosphatase isoenzymes in human germ cell tumors using reverse transcription-PCR. *Cancer research.* 57 (17), 3841-3846.
- Shi, Y & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113 (6), 685-700.
- Shiozawa, Y., Havens, A. M., Jung, Y., Ziegler, A. M., Pedersen, E. A., Wang, J., Wang, J., Lu, G., Roodman, G. D., Loberg, R. D., Pienta, K. J & Taichman, R. S. (2008). Annexin II /annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry.* 105(2), 370-380.
- Siclari, V. A., Mohammad, K. S., Tompkins, D. R., Davis, H., McKenna, C. R., Peng, X., Wessner, L.L., Niewolna., Guise, T., Suvannasankha, A & Chirgwin, J.M. (2014). Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis. *Breast cancer research.* 16 (6), 458-472.
- Simmons, J.H., Hildreth, B.E., Supsavhad, W., Elshafae, S.M., hassan, B.B., Dirksen, W.P., Toribio, R.e & Rosol, T.J. (2015). Animal models of bone metastasis. *Veterinary pathology.* 1-17.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 89 (2), 309-319.
- Stark, Z & Savarirayan. (2009). Osteopetrosis. *Osphanet journal of rare diseases.* 4 (5), 1-12.
- Taipale, J & Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11 (1), 51-59.
- Sun, L & Chen, C. (1997). Expression of transforming growth factor  $\beta$  type III receptor suppress tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *The journal of biological chemistry.* 272 (40), 25367-25372.
- Takai, H., Kanematsu, M., Yanos, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K & Yamada, Y. (1998). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *The journal of biological chemistry.* 273 (42), 27091-27096.
- Tashjian, A. H., Voelkel, E. F., Lazzaro, M., Singer, F. R., Roberts, A. B., Derynck, R., Winkler, M. E & Levine, L. (1985).  $\alpha$  and  $\beta$  human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.* 82 (13), 4535-4538.

- Teitelbaum, S. L & Ross, F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat rev Genet.* 4 (8), 638-649.
- Thirunavukkarasu, K., Miles, R. R., Halladay, D. L., Yang, X., Galvin, R. J., Chandrasekhar, S., Martin, J. T & Onyia, J. E. (2001). Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *The journal of biological chemistry.* 276 (39), 36241-36250.
- Tolar, J., Teitelbaum, S. L & Orchard, P. J. (2004). Osteopetrosis. *The england journal of medicine.* 351 (27), 2839-2849.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M. T., Martin, J. T., Higashio, K & Suda, T. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblast is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology.* 141 (9), 3478-3484.
- Vicent, S., Ravelo, D. L., Antón, I., Hernández, I., Martínez, S., Rivas, J., Gúrpide, A & Lecanda, F. (2006). Las metástasis óseas del cáncer. *An.Sist. Sanit. Navar.* 29 (2), 177-188.
- Wang, R., Xu, J., Juliette, L., Castilleja, A., Love, J., Sung, S-Y., Zhau, H. E., Goodwin, T. J & Chung, L. W. K. (2005). Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Seminars in cancer biology.* *Seminars in cancer biology.* *Seminars in cancer biology.* 15(5), 353-364.
- Wang, H & Zhong, X. (2013). Insulin effect on RANKL and OPG expression in human osteoblast-like MG63 cells. *Turkish journal of medical sciences.* 43(4), 631-636.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A & McCauley, L. K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat rev cancer.* 11 (6), 411-425.
- Weinberg R. (2013). *The biology of Cancer*, (2<sup>nd</sup> ed.) Garland Science. 960 pp.
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R & Guise, T. A. (1998). TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *The journal of clinical investigation.* 103(2), 197-206.
- Yoneda, T., Hiraga, T. (2005). Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochemical and biophysical research communications.* 328(3), 679-687.
- Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D. L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J & Keller, E. T. (2001). *The journal of clinical investigation.* 107(10), 1235-1244.