

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**OSCAR ANDRES VEGA VILLA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magíster en Ciencias Médicas y Biológicas** con **mención en Biología Celular** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Diciembre de 2011.

**Prof. Dr. Mario Galido D.**  
Director de Tesis  
Programa de Biología Celular y Molecular  
ICBM Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Prof. Dr. Julio Tapia.**  
Codirector de Tesis  
Programa de Biología Celular y Molecular  
ICBM, Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DR. NORBEL GALANTI.**  
Presidente Comisión de Examen

**PROF. DRA. LISETTE LEYTON**

**PROF. DR. JUAN PABLO RODRIGUEZ**

**PROF. DRA. MILENA VILLARROEL**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



# **RUNX2 PROMUEVE LA PROGRESION TUMORAL EN OSTEOSARCOMA**

**OSCAR ANDRES VEGA VILLA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MEDICAS Y  
BIOLÓGICAS, MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR**

**Director de Tesis: Dr. Mario Galindo Díaz.**

**Codirector de Tesis: Dr. Julio Tapia.**

**Santiago, Chile**

**2011**

*Dedicado a Cecilia y Magdalena*

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
Epidemiología.....	3
Generalidades de la enfermedad.....	3
Relevancia clínica.....	4
Tratamiento.....	4
Pronóstico.....	5
Runx2 y Diferenciación Ósea.....	7
Runx2 y Osteosarcoma.....	10
Vía Wnt-canónica.....	14
Vía Wnt-canónica y diferenciación ósea.....	17
Vía Wnt-canónica y Osteosarcoma.....	19
HIPOTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	23
Cultivos celulares.....	23
RT-PCR.....	26

Obtención del cDNA.....	26
PCR semicuantitativa.....	26
Western blot.....	29
Inmunocitoquímica.....	31
Tratamiento con SB216367 y Cloruro de Litio.....	32
Transducción con Adenovirus.....	33
Transfección con siRNA.....	34
Ensayos de Migración e Invasión.....	35
RESULTADOS.....	37
Objetivo 1.....	37
Análisis de los niveles de mensajeros de Runx2, $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.....	37
Objetivo 2.....	48
Análisis del nivel de expresión proteica de Runx2, $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.....	48
Objetivo 3.....	56
Análisis del nivel de expresión de Runx2 y algunos de sus genes blancos al sobreactivar la vía Wnt-canónica.....	56
Objetivo 4.....	61
Efecto de la modulación de la expresión de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma en parámetros de migración e invasividad.....	61
DISCUSION.....	76

Vía Wnt/ $\beta$ -catenina regula la expresión de Runx2.....	76
Elevados niveles del factor de transcripción Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma se correlaciona con una mayor capacidad de migración e invasión.....	78
Efecto antiproliferativo y pro-tumoral de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma.....	80
Runx2 promueve migración e invasión en osteosarcoma.....	83
CONCLUSIONES.....	86
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	87
Tablas.....	87
Figuras.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	89

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Homología entre los miembros de la familia RUNX.....	7
<b>Figura 2.</b> Runx2: Función antiproliferativa y ciclo celular.....	9
<b>Figura 3.</b> Rol de Runx2 en metástasis ósea en cáncer de mama.....	13
<b>Figura 4.</b> Componentes de la vía de señalización Wnt-canónica.....	15
<b>Figura 5.</b> La vía Wnt-canónica regula la expresión del gen Runx2 .....	18
<b>Figura 6.</b> Modelo Propuesto para estudiar la función de Runx2 en progresión tumoral en osteosarcoma.....	22
<b>Figura 7.</b> Niveles de mRNA de Runx2 y marcadores de Diferenciación ósea.....	39
<b>Figura 8.</b> Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.....	41
<b>Figura 9.</b> Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.....	42
<b>Figura 10.</b> Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.....	43
<b>Figura 11.</b> Niveles de mRNA de genes blancos de vía Wnt-canónica y Runx2.....	46
<b>Figura 12.</b> Niveles de mRNA de genes blancos de vía Wnt-canónica y Runx2.....	47
<b>Figura 13.</b> Niveles de proteína de Runx2, isoformas MASNS y MRIVP y $\beta$ -catenina.....	51

<b>Figura 14.</b> Análisis de expresión de Runx2 mediante Inmunocitoquímica.....	52
<b>Figura 15.</b> Análisis de expresión de $\beta$ -catenina mediante Inmunocitoquímica.....	53
<b>Figura 16.</b> Niveles de proteína de genes blancos de Runx2 y de la vía Wnt-canónica.....	54
<b>Figura 17.</b> Resumen de los niveles de mensajero de componentes de la vía Wnt- canónica y niveles proteicos de Runx2, $\beta$ -catenina, OPN, COX-2 y survivina.....	55
<b>Figura 18.</b> Efecto del tratamiento con litio y SB216763 en los niveles de mensajero de Runx2.....	57
<b>Figura 19.</b> Efecto del tratamiento con SB216763 en los niveles de proteína para $\beta$ -catenina, Runx2, survivina y OPN.....	59
<b>Figura 20.</b> Efecto del tratamiento con SB216763 en los niveles de proteína para $\beta$ -catenina, Runx2 y OPN.....	60
<b>Figura 21.</b> Capacidad de migración e invasión de las líneas celulares de OS <i>in vitro</i> .....	63
<b>Figura 22.</b> Evaluación de la sobreexpresión de Runx2-GFP en líneas celulares de OS .....	65
<b>Figura 23.</b> Efecto de sobreexpresión de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.....	68
<b>Figura 24.</b> Efecto de sobreexpresión de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.....	69



<b>Figura 25.</b> Silenciamiento de Runx2 mediante siRNA en líneas celulares de OS.....	71
<b>Figura 26.</b> Efecto del silenciamiento de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.....	74
<b>Figura 27.</b> Efecto del silenciamiento de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.....	75

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Condiciones de cultivo de líneas celulares de osteosarcoma humano según especificaciones del fabricante ATCC.....	24
<b>Tabla II.</b> Resumen de ensayos de xenotransplantes publicados, utilizando líneas celulares humanas de osteosarcoma en modelo murino inmunosuprimido.....	25
<b>Tabla III.</b> Secuencia de partidores utilizados.....	28

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

<b>Tabla Supl. I.</b> Estatus de genes de p53 y Rb.....	87
<b>Tabla Supl. II.</b> Ensayo de metástasis pulmonares con líneas celulares de OS en ratones NOD-SCID.....	87
<b>Figura Supl. I.</b> Curva de crecimiento en líneas celulares de Osteosarcoma y línea de control hFOB.....	88

## ABREVIATURAS

AdV	Vector adenoviral
AP	Fosfatasa alcalina
BMP	Proteína morfogénica del hueso
BSP	Sialoproteína ósea
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia, a partir de un mRNA
Cdk	Quinasas dependientes de ciclina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DKK1	Proteína Dickkopf
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
Fz	Receptores Frizzled
G <sub>0</sub>	Gap 0 del ciclo celular, período de reposo proliferativo
G <sub>1</sub>	Gap 1 del ciclo celular
G <sub>2</sub>	Gap 2 del ciclo celular
GFP	Proteína fluorescente verde
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico, tipo mensajero
OC	Osteocalcina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPN	Osteopontina
OS	Osteosarcoma
PCP	Polaridad celular plana
RANKL	Ligando de RANK
RHD	Dominio homólogo a Runt

S	Fase del ciclo celular asociada a la síntesis del DNA
SDS	Dodecil sulfato de sodio
siRNA	RNA pequeño interferente
SLE	Sobrevida libre de enfermedad
TM	Temperatura de hibridación
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

### **PALABRAS CLAVES**

Runx2	Migración	Invasión
Metástasis	siRNA	Osteosarcoma

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Compañeros de Laboratorio**

Francisco Villanueva

Nelson Varela

Héctor Araya

Claudia Lucero

Mariana Osorio

Karina Villegas

Alejandra Aránguiz

### **Doctores**

Julio Tapia

Julieta González

Marcelo Antonelli

y especialmente a

**Dr. Mario Galindo**

por hacer posible el desarrollo

de esta Tesis.

## RESUMEN

El Osteosarcoma (OS) es el tumor sólido maligno más frecuente en la infancia y la adolescencia, corresponde al 20% de todos los tumores óseos y al 5% de los cánceres pediátricos. Los tratamientos actuales logran tasas de supervivencia a 5 años de 75% en pacientes sin metástasis, mientras que el 80% de los pacientes con enfermedad metastásica recaen a pesar del tratamiento efectuado. Runx2 es un factor de transcripción maestro que regula el proceso de diferenciación osteogénica, aunque este factor también promueve progresión tumoral en células de cáncer de próstata y de mama. Recientemente, se demostró la amplificación del gen Runx2 en pacientes con OS, así como la expresión aumentada de la proteína Runx2 en líneas celulares de OS.

En esta tesis se propuso la hipótesis que el factor de transcripción Runx2 promueve migración e invasión en líneas celulares de osteosarcoma. Así, el objetivo general del proyecto fue definir el rol de Runx2 en los procesos de progresión tumoral en osteosarcoma.

Para estudiar el rol de Runx2 sobre parámetros de progresión tumoral en líneas celulares de osteosarcoma, se moduló la expresión de Runx2 y se estudió su efecto en migración e invasividad. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de Runx2 mediante adenovirus produjo un aumento en la capacidad de migración e invasión de líneas celulares de OS con bajos niveles de Runx2. El silenciamiento de Runx2 mediante siRNA disminuyó la capacidad de migración e invasión en líneas celulares de OS. De esta forma, hemos demostrado por primera vez que Runx2 promueve progresión tumoral en líneas celulares de OS.

## **ABSTRACT**

Osteosarcoma (OS) is the most common malignant solid tumor in childhood and adolescence and represents 20% of all bone tumors and 5% of childhood cancers. Survival rates after five years are at 75% in patients without metastases, while 80% of patients with metastatic disease relapse despite the treatment. Runx2 is a master transcription factor that regulates the osteogenic differentiation process. However, this factor also functions as tumor promoter in prostate cancer cells and breast cancer. Runx2 gene amplification in patients with OS, as well as increased expression of Runx2 protein in OS cell line have recently been demonstrated.

To this project, we hypothesized that the transcription factor Runx2 promotes migration and invasion in OS cell lines. Thus, the general aim was to define the role of Runx2 in osteosarcoma tumor progression processes.

To study the role of Runx2 on parameters involved in tumor progression of OS cell lines, we modulated the expression of Runx2 and studied the outcome of this modifications on cell migration and invasiveness. Our results demonstrated that overexpression of Runx2 by adenovirus in OS cell lines with low levels of Runx2 increased cell migration and invasion. Runx2 silencing by siRNA in OS cell lines decreased their ability to migrate and invade. Thus, we have demonstrated for the first time that Runx2 promotes tumor progression in OS cell lines.

## **INTRODUCCIÓN**

### ***Epidemiología***

El osteosarcoma (OS) es el tumor óseo sólido maligno óseo más frecuente en niños y adolescentes, lo que corresponde al 20% de todos los tumores óseos y al 5% de los cánceres pediátricos[3], representando el tercer tipo de cáncer en este grupo etario después de la leucemia y el linfoma. En EEUU presenta una incidencia de 4,4 casos por millón de habitantes al año en personas hasta los 24 años, lo que equivale a 450 casos nuevos al año[4]. Esta enfermedad presenta una distribución etaria bimodal, es decir, con dos puntas de incidencia, la principal durante la segunda década de la vida, coincidente con la fase de crecimiento acelerado de la adolescencia, lo que sugiere una relación entre el rápido crecimiento óseo y el desarrollo de tumor[5]; y otra de menor incidencia en ancianos, asociada a la enfermedad de Paget[6].

### ***Generalidades de la enfermedad***

Su ubicación más típica es en la metáfisis de huesos largos como fémur distal, tibia proximal y húmero, que son los sitios de mayor crecimiento óseo, que explicaría la mayor incidencia de la enfermedad en adolescentes[5], aunque puede presentarse en otros huesos[7].

El OS se caracteriza histológicamente por la producción directa de hueso o tejido osteoide. La OMS clasifica histológicamente los tumores en medulares (centrales) y periféricos (superficiales), cada uno de los cuales posee una subclasificación. Los OS medulares se subdividen en osteosarcomas centrales convencionales (más común), telangiectásicos, intraóseos bien diferenciados y de células pequeñas. Mientras que los OS



periféricos presentan los subtipos parosteal (yuxtacortical), perióstico y superficial[8].

### ***Relevancia Clínica***

Al momento del diagnóstico, el 80 % de los tumores se encuentran localizados y un 20 % presentan metástasis detectable por radiografía.

Antes de la década del 70 el único tratamiento disponible para el OS de alto grado era la amputación, con tasas de letalidad del 80% en los casos de enfermedad metastásica asociada principalmente a los pulmones[7]. Actualmente, el tratamiento incluye cirugía conservadora asociada a quimioterapia en el 90-95% de los casos. Estos tratamientos logran tasas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años de 60 a 80 % en pacientes con enfermedad no metastásica[9,10].

### ***Tratamiento***

En Chile, a partir de 1987 se comenzaron a utilizar 2 protocolos de tratamiento en el Programa Nacional de Drogas Antineoplásicas (PINDA), el protocolo Osteo87 y el Osteo92, desarrollados entre 1987-1991 y entre 1992-1998, respectivamente. Los pacientes fueron categorizados en riesgo estándar, medio, alto y con metástasis. Todos fueron tratados con cirugía conservadora y distintos esquemas de quimioterapia, logrando tasas de SLE a 5 años de 27/64 pacientes para Osteo87 y 39/72 pacientes para Osteo92[11]. Así, la SLE a 5 años mejoró de 0 a 65% entre 1969 y 1991. Sin embargo, la SLE a 5 años para pacientes con metástasis fue nula.

Entre julio 2003 y mayo de 2006 se llevó a cabo el “Estudio Clínico sobre el Tratamiento de Osteosarcoma con Quimioterapia Intensiva utilizando Ifosfamida, Carboplatino y Doxorrubicina” (OS99), del Programa Nacional de Drogas Antineoplásicas (PINDA), que se desarrolló en conjunto con el Hospital St. Jude Children`s Research Hospital, Memphis, USA. Se condujo en forma simultánea un protocolo de primera línea de tratamiento, que enroló 72 pacientes, de los cuales 22 (31%) fueron tratados en Chile en el Hospital Luis Calvo Mackenna. Los pacientes recibieron 12 ciclos de quimioterapia más cirugía (amputación o cirugía conservadora) como tratamiento local. Los análisis preliminares mostraron una evolución similar y tolerancia al tratamiento entre los dos centros. La SLE a 2 años fue de 78.5% para pacientes tratados en el Hospital Luis Calvo Mackenna (mediana de seguimiento 1.6 años) y 74.3% para pacientes tratados en el Hospital St. Jude (mediana de seguimiento 4 años)[12].

### ***Pronóstico***

El pronóstico de los pacientes con OS que se presentan sin enfermedad metastásica al diagnóstico es de un 65-75% de sobrevida libre de eventos a largo plazo. No obstante, esto implica que el 25-35% de los pacientes sin metástasis y un 80% de los pacientes con metástasis inicial, recaerán independientemente del tratamiento efectuado.

En la actualidad, no existe una sola estrategia aceptada para manejar a los pacientes con OS recurrente, pero todos los reportes enfatizan la necesidad de la resección quirúrgica completa de todos los sitios con enfermedad clínicamente detectable, incluidos las metástasis en hueso y pulmón[13]. Surge

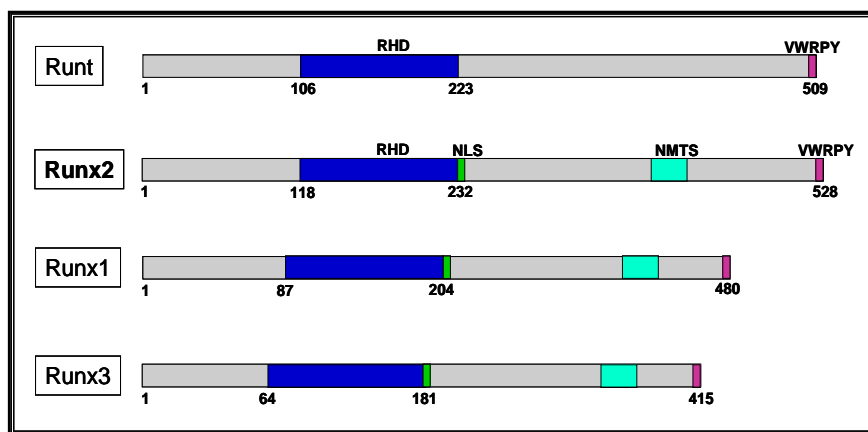
entonces la necesidad de nuevos enfoques para el tratamiento de los pacientes con metástasis al diagnóstico y enfermedad recurrente

El estudio de las características genéticas del OS, su etiología a nivel molecular y una mejor comprensión del proceso de generación de metástasis son materias claves que contribuirán a la caracterización de estos pacientes, determinar marcadores pronósticos y generación de nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, estudios recientes buscan determinar la importancia del factor de transcripción Runx2 y la vía de señalización Wnt-canónica en la etiología del OS.

## Runx2 y Diferenciación Ósea

Runx2 es un miembro de la familia de factores de transcripción Runx, homólogos al factor de transcripción *runt*, descrito originalmente en *Drosófila*[14]. Los tres factores RUNX contienen un dominio conservado de 128 aminoácidos, RHD (Runt Homology Domain) (figura 1), que es el responsable de la unión al DNA y heterodimerización con su cofactor Cbf $\beta$ [15]. Runx2 es un factor de transcripción maestro que regula el compromiso de linaje, la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras y preosteoblastos. Además, controla la senescencia, apoptosis y funciones anabólicas en osteoblastos.

Este factor actúa como efector subnuclear de múltiples vías de señalización interactuando con cofactores como TGF $\beta$ /BMP2-Smad, Src/Yes-Yap, FGF-MAPK, CDK-pRB, c-Jun/c-Fos, Groucho/TLE y TWIST[16-23].



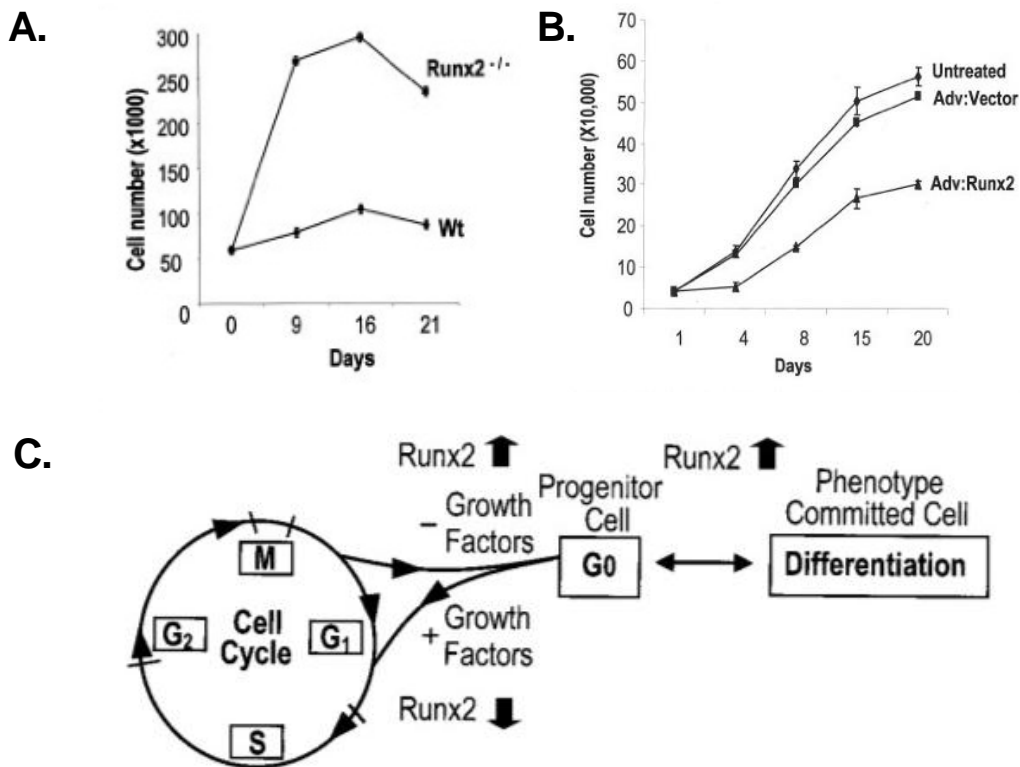
**Figura1. Homología entre los miembros de la familia RUNX.**

Las tres proteínas RUNX poseen más de un 50 % de identidad en la secuencia de aminoácidos y más de un 93% de identidad dentro del dominio RHD. Abreviaciones: RHD. Dominio homólogo a runt; NLS, señal de localización nuclear; NMTS, señal de unión a la matriz nuclear (ésta es propia de la familia de proteínas RUNX y representa un dominio esencial para la función transcripcional de Runx respecto a su localización subnuclear); VWRPY, secuencia conservada de aminoácidos para la interacción con TLE/Groucho (Adaptado de Lian, 2004[24]).

El rol fundamental de Runx2 en el proceso de osteogénesis es evidente en células mesenquimáticas pluripotenciales que son reclutadas y determinadas a progresar a través de la diferenciación osteoblástica[25, 26]. La capacidad de Runx2 para dirigir la osteogénesis está documentada en numerosos estudios que muestran que la expresión de Runx2 activa genes del fenotipo óseo en células pluripotenciales e incluso puede redirigir un estado pre-muscular a uno óseo[27, 28], o inhibir el fenotipo adipogénico[29].

Evidencia aportada por nuestro grupo ha demostrado la función biológica de Runx2 en el proceso de proliferación celular en preosteoblastos[1, 30]. Los osteoprogenitores derivados de cráneo de embriones de ratones Runx2<sup>-/-</sup> exhiben una incrementada tasa proliferativa y elevados niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclinas A, E y B). Esta acentuada tasa proliferativa es atenuada mediante la reintroducción de Runx2 en los osteoprogenitores Runx2<sup>-/-</sup>. Consecuentemente, la sobreexpresión de Runx2 induce una detención del ciclo celular asociada a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular en preosteoblastos[1] (Figura 2A-B).

Por otra parte, los niveles de Runx2 son regulados durante el ciclo celular. Así, en mitosis (M) los niveles de Runx2 están disminuidos, mientras que post-mitóticamente se observa un aumento de los niveles de este factor asociado a la fase G<sub>1</sub>. Del mismo modo, si las células son inducidas a ingresar en un estado de quiescencia (G<sub>0</sub>) y diferenciación terminal, los niveles de Runx2 se elevan. Por el contrario, si las células son estimuladas a progresar en el ciclo celular, se observa una disminución de los niveles de Runx2 asociados a las fases S, G<sub>2</sub> y M[1] (Figura 2C).



**Figura 2. Runx2: Función antiproliferativa y ciclo celular.**

**A.** Osteoprogenitores derivados de cráneo de embriones de ratones Runx2<sup>-/-</sup> exhiben una incrementada tasa proliferativa. **B.** Esta acentuada tasa proliferativa es atenuada mediante la reintroducción adenoviral de Runx2 en los osteoprogenitores Runx2<sup>-/-</sup>. **C.** Los niveles de Runx2 son regulados durante el ciclo celular. Así, las células estimuladas a progresar en el ciclo celular muestran una disminución de los niveles de Runx2 asociados a las fases S, G<sub>2</sub> y M, mientras que post-mitóticamente se observa un aumento de los niveles de este factor asociado a la fase G<sub>1</sub>. Del mismo modo, si las células son inducidas a ingresar en un estado de quiescencia (G<sub>0</sub>) y diferenciación terminal, los niveles de Runx2 se elevan[1] (Galindo, 2005).

El efecto antiproliferativo de Runx2 estaría mediado en parte por la represión directa que este factor ejerce sobre la expresión de los genes codificantes para los RNA ribosomales[31]. Además, Runx2 induce p27<sup>KIP</sup>, inhibiendo la actividad del complejo ciclina/Cdk de la fase S, lo que lleva a defosforilación de la proteína supresora de tumores Rb y detención del ciclo celular en G<sub>1</sub>[32]. Runx2 interactúa físicamente con la forma hipofosforilada de Rb (coactivador de Runx2) y activa la transcripción del gen de osteocalcina, completando un *feed-back* positivo en el cual la progresiva salida del ciclo celular promueve aumento de expresión del fenotipo osteoblástico.

La coordinación fisiológica entre el inicio de la diferenciación osteoblástica y la salida del ciclo celular, mediado a través de Runx2 y p27<sup>KIP</sup>, está alterada en OS. La pérdida de p27<sup>KIP</sup> perturba transitoriamente y terminalmente la salida del ciclo celular en osteoblastos y se correlaciona con desdiferenciación y proliferación en OS de alto grado[32].

### **Runx2 y Osteosarcoma**

Aunque Runx2 participa en la diferenciación terminal, detención de la proliferación y en la senescencia prematura del linaje óseo, no se ha demostrado que la pérdida de función de Runx2 (equivalente a un gen supresor de tumor) esté asociada a la aparición de tumores. Por ejemplo, en familias con historia de displasia cleidocraneal (generada por haploinsuficiencia del gen Runx2), no existe evidencia de mayor incidencia de cáncer[33] y, a pesar que su pérdida de función aumentaría la proliferación de células de linaje esquelético *ex vivo*, no se observan tumores óseos en ratones recién nacidos homocigotos deficientes de Runx2[34].

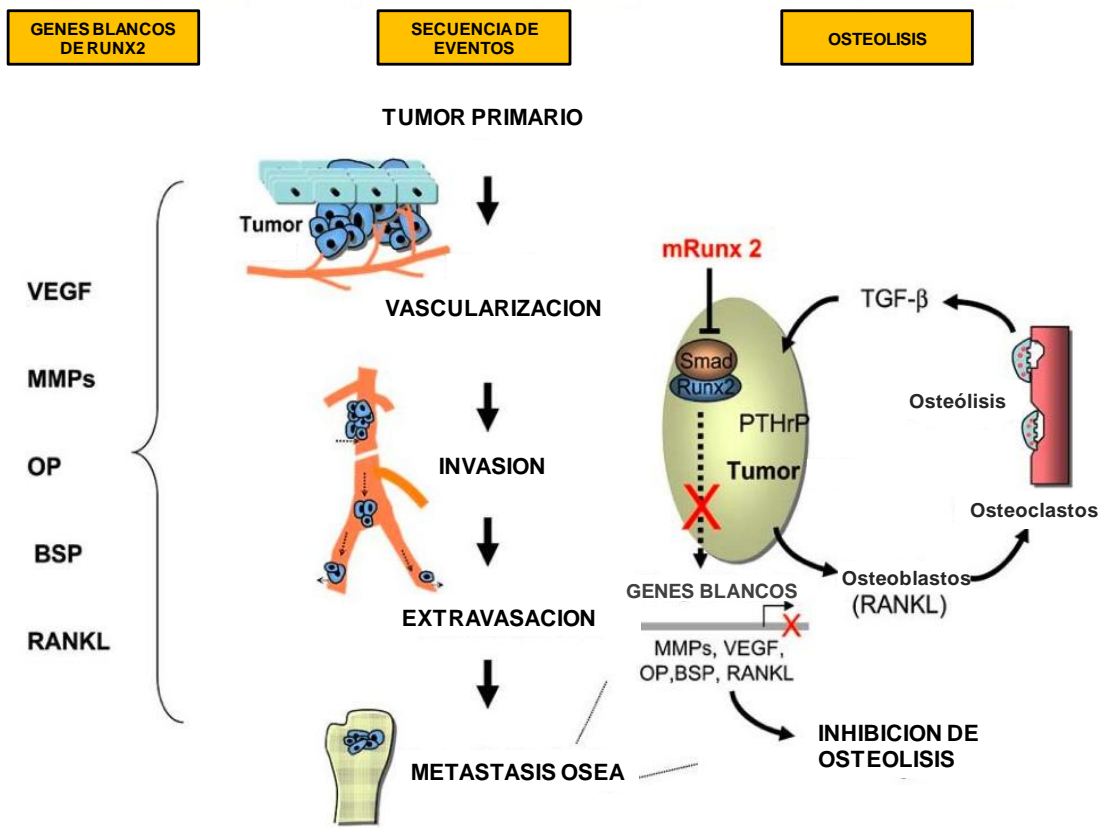
Por otro lado, la ganancia de función del gen Runx2 (equivalente a un oncogén) sólo genera transformación celular cuando la sobreexpresión de Runx2 está asociada a la disrupción de vías antiproliferativas (por ejemplo, ARF o p53) o se encuentra asociado a un oncogén (por ejemplo, myc)[35], por lo que tampoco podría catalogarse a Runx2 como un oncogén. Sin embargo, alteraciones en la expresión de Runx2 están ligadas a transformación celular y progresión tumoral. Así, la expresión de Runx2 está elevada en fibroblastos NIH3T3 transformados con H-Ras[36], es capaz de estimular el crecimiento celular cooperativamente con c-myc al ser integrado mediante retrovirus en células T y su expresión forzada en ratones atímicos predispone al desarrollo de linfomas[37]. Además, este factor de transcripción está expresado en altos niveles en cáncer de próstata y mama que colonizan al sistema óseo y su expresión puede ser usada como predictor de metástasis[34, 38]. Una serie de trabajos recientes muestran la amplificación de la región que contiene el locus genético de Runx2 en pacientes con OS, y la expresión aumentada de la proteína Runx2 en líneas celulares de OS[39, 40].

La inhibición de Runx2 en células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 disminuye la generación de metástasis y previene la osteólisis en un modelo murino[41]. Al contrario, la sobreexpresión de Runx2 en una línea celular de tumor pancreático (Panc-1) se asocia con una menor expresión de MMP-1 y una disminución en la tasa de proliferación e invasividad de células Panc-1[42]. Así, el efecto de Runx2 en cáncer depende del contexto celular, pudiendo actuar como oncogén o supresor tumoral.

Al analizar los genes regulados por el factor de transcripción Runx2 encontramos al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que participa



en la angiogénesis ósea y tumoral; osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP), las cuales son proteínas de matriz ósea implicadas además en la actividad metastásica de células tumorales; metaloproteinasas de matriz (MMPs) 2, 9 y 13, involucradas en remodelación ósea así como en invasión y metástasis; ligando de RANK (RANKL) capaz de activar osteoclastos y remodelar matriz ósea y por otro lado capaz de provocar lesiones osteolíticas en metástasis óseas. Interesantemente, genes blancos que son activados por Runx2 durante el proceso de diferenciación osteoblástica. En cáncer, Runx2 activa la expresión de proteínas de matriz ósea, metaloproteinasas de matriz, ciclooxygenasa 2 (COX-2), OPN, RANKL, factores angiogénicos relacionados con metástasis[34, 43, 44] (Figura 3) y favorece lesiones osteolíticas en metástasis[45].



**Figura 3. Rol de Runx2 en metástasis ósea en cáncer de mama.**

Células tumorales expresan genes de metástasis (VEGF, MMPs, BSP y OPN), así como RANKL involucrado en enfermedad osteolítica. Estos genes están directamente regulados por Runx2 y son claves en las diferentes etapas de metástasis a hueso. La presencia de Runx2 en células de cáncer de tumores metastáticos a hueso activa la expresión de genes. Expresión de proteína Runx2 mutante bloquea las propiedades altamente metastásicas y osteolíticas de la célula tumoral al inhibir actividad de Runx2 endógeno. Además estos marcadores de metástasis son también genes blancos de diferenciación osteogénica (Adaptado de Pratap, 2006).

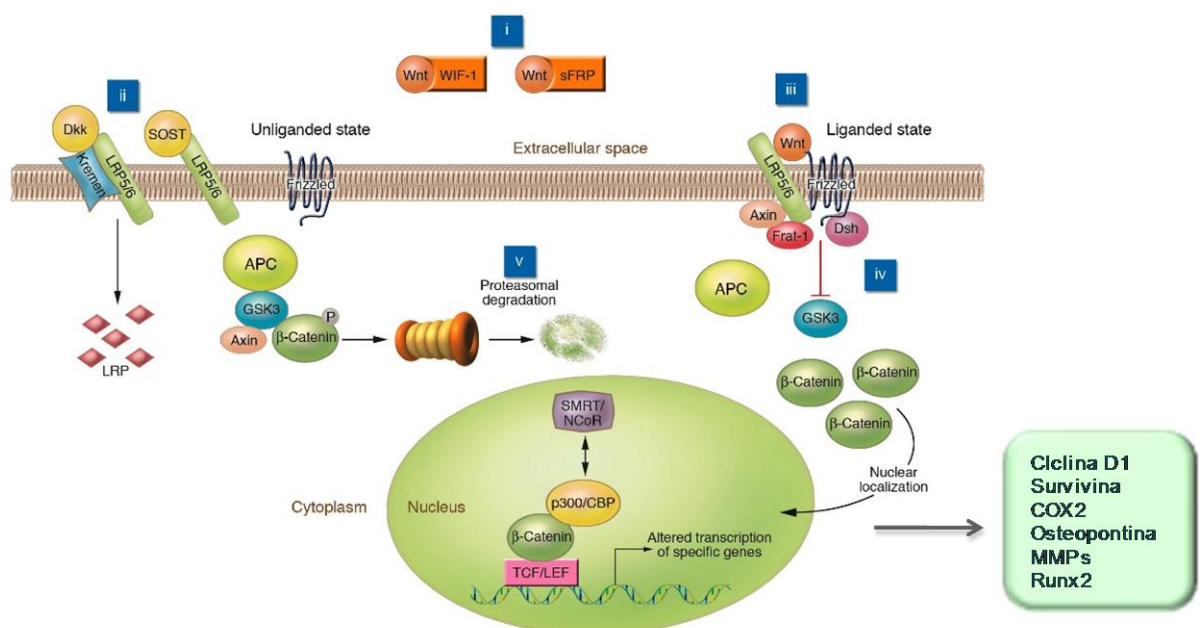
Es extensa la información disponible en la literatura de Runx2, su rol en ciclo celular, efecto antiproliferativo en preosteoblastos y su importancia en la generación de metástasis ósea en distintos tipos de cáncer. No obstante, aún queda por dilucidar el rol de Runx2 en OS. Modelos tumorales ectópicos en ratones muestran que la sobreexpresión de Runx2 mediante vectores virales disminuye el crecimiento tumoral inducido por BMPs[46]. Sin embargo, su efecto sobre proliferación en líneas de OS no ha sido esclarecido completamente y aún no hay datos disponibles respecto a su rol en parámetros de progresión tumoral como migración, invasividad o generación de metástasis.

### **Vía Wnt-canónica**

Los morfógenos Wnt son una familia de ligandos glicoproteicos secretados y relacionados estructuralmente. Estos ligandos señalizan a través de su unión a receptores con siete dominios transmembrana denominados Frizzled (Fz), de los cuales existen actualmente 10 descritos[47]. Existen 3 vías de señalización Wnt, divididas en canónica y no canónica. Esta última incluye dos variantes, la de Polaridad Celular Plana (PCP), que es importante en el desarrollo del eje embrionario a través de la regulación de la arquitectura del citoesqueleto, proliferación celular y apoptosis; y la vía Wnt/Calcio, que regula la adhesión celular y desarrollo del eje dorsal embrionario[48]. Por su parte, la vía Wnt-canónica, conocida también como vía Wnt/ $\beta$ -catenina, está involucrada en morfogénesis, proliferación, migración y diferenciación, es decir, procesos celulares relacionados con cáncer[49].

La activación de la vía canónica involucra la inducción de una cascada que resulta en la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo en donde interactúa

con factores de transcripción de la familia TCF/LEF, actuando como transactivador de la expresión de genes como c-myc, ciclina D1, COX-2, MMPs, survivina y osteopontina (OPN)[50], todos ellos relacionados con progresión tumoral, viabilidad, resistencia a la apoptosis y, en general, desarrollo del cáncer[51-54] (Figura 4).



**Figura 4. Componentes de la vía de señalización Wnt-canónica.**

La unión de los morfógenos Wnt a los receptores Frizzled inhibe la actividad de GSK3 $\beta$ .  $\beta$ -catenina se acumula en citoplasma y es traslocada al núcleo donde se une a factores de transcripción TCF/LEF modificando la expresión de genes blancos tales como Survivina, OPN, COX-2, MMPs, ciclina D1 y Runx2. La fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK3 $\beta$  es crucial para su ubiquitinización y degradación por la vía del proteosoma[2] (Adaptado de Krishnan, 2006).

En ausencia de una señal Wnt, un complejo multiproteico regula negativamente la estabilidad de  $\beta$ -catenina. Este complejo está formado por la enzima glicógeno sintetasa kinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), que es la responsable de la fosforilación de  $\beta$ -catenina. GSK3 $\beta$  interactúa con axina y APC en este complejo, donde axina tiene una función de andamiaje, uniendo APC, GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina. La interacción de axina con GSK3 $\beta$  facilita la fosforilación de APC y  $\beta$ -catenina, en esta última en residuos específicos de serina y treonina localizados en su extremo N-terminal. Finalmente, la fosforilación de  $\beta$ -catenina la destina a su ubiquitinación y luego a degradación por la ruta del proteasoma.

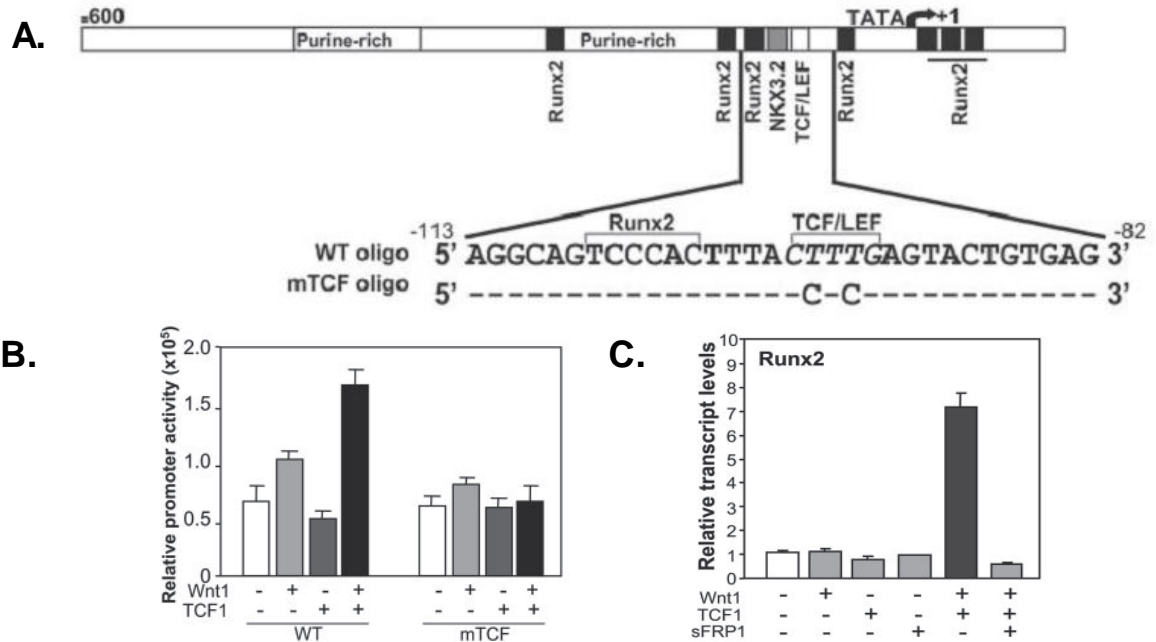
Por el contrario, la unión de un ligando Wnt al receptor Fz en presencia del correceptor LRP resulta, mediado por la proteína Disheveled (Dvl), en la inactivación de GSK3 $\beta$  y, por lo tanto, se previene la fosforilación y posterior degradación de  $\beta$ -catenina[55]. Así,  $\beta$ -catenina necesita estar en un estado no fosforilado para acumularse en el citoplasma y posteriormente translocar al núcleo.

Una serie de enfermedades hereditarias tienen su origen en la alteración de los genes que codifican algunos componentes de la ruta de señalización Wnt-canónica. Por ejemplo, la mutación germinal del gen supresor de tumores APC produce poliposis adenomatosa familiar[56]. Así, pacientes con mutaciones inactivantes en uno de los alelos para APC desarrollan un gran número de adenomas colónicos y pólipos, ambos de carácter benigno, pero que con el tiempo progresarán eventualmente a adenocarcinoma de colon. Asimismo, mutaciones inactivantes del gen Axina pueden originar cáncer hepatocelular y raramente cáncer colorrectal, mientras que mutaciones del gen  $\beta$ -catenina ocurren en una variedad de tumores sólidos[57].

### **Vía Wnt-canónica y diferenciación ósea.**

Datos publicados a la fecha señalan que la vía Wnt-canónica contribuye positivamente al proceso de formación ósea, regulando la diferenciación de precursores mesenquimáticos a osteoblastos[58-62]. Más aún, la vía Wnt-canónica promueve la osteogénesis a través de la estimulación directa de la expresión de Runx2[63] (Figura 5). Interesantemente, aunque la vía Wnt-canónica promueve la expresión de Runx2 y el compromiso por el linaje osteoblástico, esta vía inhibe la diferenciación ósea terminal[64]. Así, LEF1 y  $\beta$ -catenina inhiben la activación del gen osteocalcina (un marcador de diferenciación ósea terminal) mediada por Runx2[65]. Sin embargo, la modulación de Runx2 durante el ciclo celular en preosteoblastos proliferativos no es dependiente de la vía Wnt-canónica[66]. Esto último sugiere que la vía Wnt-canónica suprime eventos de diferenciación terminal de forma dependiente de Runx2, pero no altera la regulación y función de este factor en estados iniciales.

Además, GSK3 $\beta$  controla no sólo la expresión de Runx2 mediante la regulación de vía Wnt-canónica, sino que también su función mediante la inhibición de la vía PI3K/Akt y directamente fosforilando Runx2 en S369-S373-S377, atenuando así su actividad transcripcional y favoreciendo la supresión de la formación ósea[58].



**Figura 5. La vía Wnt-canónica regula la expresión del gen Runx2.**

**A.** Representación esquemática del promotor P1 de Runx2 que muestra la posición relativa del sitio consenso para factores de transcripción TCF/LEF, cercana a un sitio de autorregulación de Runx2. **B.** Activación de promotor P1 de Runx2 mediada por expresión de Wnt1 y TCF1 ausente en el promotor mutante para TCF1. **C.** Activación del promotor P1 de Runx2 mediada por WNT/TCF es inhibida mediante la coexpresión de sFRP1, un antagonista de la vía Wnt-canónica (Adaptado de Gaur, 2005).

## **Vía Wnt-canónica y Osteosarcoma.**

La activación de la vía Wnt-canónica con el ligando Wnt10b se correlaciona con la quimiotaxis de líneas celulares de OS y la presencia de Wnt10b en biopsias humanas de OS se correlaciona con estadios avanzados de la enfermedad y reducción de la supervivencia[67]. Así también, la expresión de LRP5 constituye un marcador de progresión tumoral en OS de alto grado[68].

Por otro lado, la inhibición de la vía Wnt-canónica mediante la expresión de un dominante negativo soluble del correceptor LRP5 (sLRP5), revierte la transición epitelio-mesénquima observada en metástasis y disminuye la expresión de metaloproteinasas de matriz 2 y 14 (MMP2 y MMP14), reduciendo la capacidad de invasión en líneas celulares humanas de OS[69]. Interesantemente, un regulador negativo de la vía Wnt-canónica, DKK1, es sobreexpresado en la periferia de los tumores humanos de OS y se asocia con una mayor invasividad local, previniendo la reparación del osteoide que rodea al tumor, siendo útil como marcador pronóstico[70]. Además, DKK3 inhibe la invasión y movilidad en la línea celular de osteosarcoma SaOS-2[71].

No se sabe cómo la vía Wnt-canónica y Runx2 podrían estar interactuando en el establecimiento, crecimiento celular y regulación de parámetros de migración e invasividad en OS. Se sabe que TCF/LEF regula positivamente a Runx2 y que la activación de la vía Wnt-canónica estimula el crecimiento en hueso normal y es marcador pronóstico en OS, promoviendo invasividad y metástasis. Sin embargo, se desconoce si el factor de transcripción Runx2 actúa como efector de esta respuesta.

En resumen, estos antecedentes muestran que la vía Wnt-canónica está sobreactivada en OS, así también el locus donde se encuentra el gen de Runx2



está amplificado y la expresión del mismo está alterada en OS. Esto sugiere que existen alteraciones funcionales de la vía Wnt-canónica y del factor de transcripción Runx2 que son importantes en este tipo de tumor óseo.

Esta tesis plantea que Runx2 actúa promoviendo migración e invasividad, los dos últimos procesos relacionados con progresión tumoral en OS (Figura 6).

Además, se busca establecer si niveles de Runx2 son regulados por la vía Wnt-canónica con el fin de determinar si Runx2 actúa como efector de esta vía de señalización.

## **HIPÓTESIS**

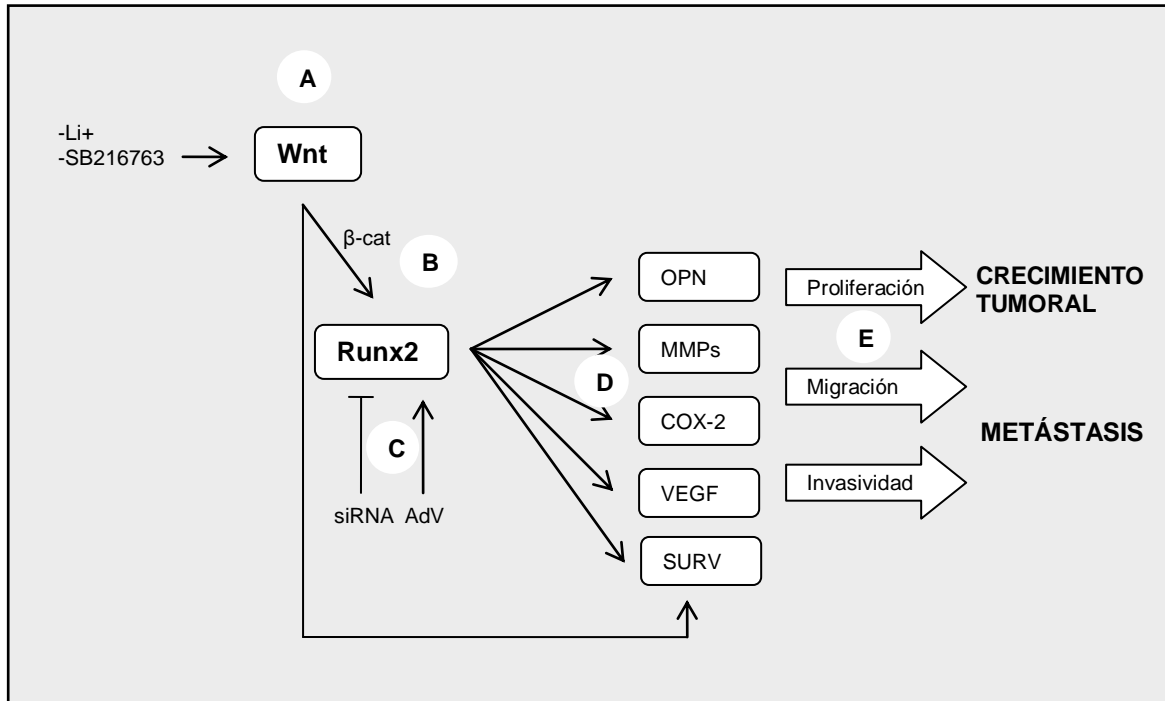
“El factor de transcripción Runx2 promueve migración e invasión en líneas celulares de osteosarcoma”

## **OBJETIVO GENERAL**

“Definir el rol de Runx2 sobre parámetros de progresión tumoral en líneas celulares de osteosarcoma”

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar los niveles de mensajeros de Runx2,  $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.
2. Analizar los niveles de expresión proteica de Runx2,  $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.
3. Determinar si la vía Wnt-canónica modula la expresión de Runx2 y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.
4. Determinar si Runx2 promueve migración e invasividad en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico.



**Figura 6. Modelo propuesto para estudiar la función de Runx2 en progresión tumoral en osteosarcoma**

**(A)** La vía Wnt-canónica será activada utilizando un inhibidor específico de GSK3 $\beta$ , SB216763 o con litio. **(B)** La vía Wnt-canónica regularía positivamente la expresión de Runx2 actuando directamente sobre su promotor, el cual posee sitios de respuesta a  $\beta$ -catenina. **(C)** La expresión de Runx2 será reprimida o aumentada mediante el uso de siRNA o vector adenoviral (AdV), respectivamente. **(D)** Runx2 y la vía Wnt-canónica regulan positivamente la expresión de genes como MMP9, COX-2, OPN y VEGF. **(E)** La expresión de estos genes blancos de la vía Wnt-canónica y Runx2 promueven la proliferación, migración e invasividad en líneas celulares de osteosarcoma. La proliferación es indicador de crecimiento tumoral, mientras que la migración e invasividad son predictores de metástasis.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Cultivos Celulares***

Las líneas celulares de osteosarcoma humano SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292, 143B y la línea celular de osteoblasto fetal humano hFOB fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA) y mantenidas según las condiciones especificadas por el proveedor en placas de 100mm (Tabla I). La línea celular SaOS-2 fue cultivada en medio modificado McCoy's 5A + 15% suero fetal bovino (SFB); MG-63 en DMEM + 10% SFB; U2-OS en McCoy's 5A + 10% SFB; HOS en DMEM + SFB 10%; G-292 en McCoy's 5A + 10% SFB; 143B en DMEM + SFB 10% + 1 mM piruvato + bromodeoxiuridina (BrdU) 100ug/ml y hFOB en 1:1 medio Ham's F12 y DMEM + 2.5 mM L-glutamina (sin fenol red) + 0.3 mg/ml G418 + SFB 10%. Los medios de cultivo fueron suplementados con penicilina 100U/ml, estreptomina 100µg/ml y 2 mM L-glutamina. Las células fueron sembradas en placas de 100 mm en una relación de  $0.5 \times 10^6$  células por placa. El medio de cultivo fue cambiado según indicaciones de ATCC (Tabla I) y las células cultivadas hasta confluencia del 80% en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y a la temperatura de 37°C. En la tabla II se muestra la capacidad de las líneas celulares de generar metástasis en modelos murinos de xenotransplantes basado en antecedentes bibliográficos.

**Tabla I. Condiciones de cultivo de líneas celulares de osteosarcoma humano según especificaciones del fabricante ATCC.**

Líneas celulares de osteosarcoma humano SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, 143B y línea de osteoblasto fetal humano hFOB utilizada como control fueron obtenidas de ATCC, USA. Se detalla origen de cada línea, propiedad de crecimiento en placa, morfología, medio de propagación, frecuencia de renovación del medio, tasa de sub-cultivación y su preservación en nitrógeno líquido.

Línea celular	SaOS-2	MG-63	U-2OS	HOS	G-292	143B	hFOB
Origen	OS humano primario de niña caucásica de 11 años	OS humano	OS humano niña caucásica de 15 años	OS humano femenino caucásica 13 años	OS humano femenino caucásica 9 años	OS humano femenino caucásica 13 años	Osteoblasto fetal humano
Crecimiento	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente
Morfología	Epitelial	Fibroblasto	Epitelial	Mixta	Fibroblasto	Mixta	Epitelial
Propagación	McCoy's 5a Medio Modificado + SFB 15%	DMEM + SFB 10%	McCoy's 5a Medio Modificado + SFB 10%	DMEM + SFB 10%	McCoy's 5a Medio Modificado + SFB 10%	D-MEM + SFB 10% + 1 mM piruvato + BrdU 100ug/ml	1:1 Ham's F12 Medium y D-MEM + 2.5 mM L-glutamina + 0.3 mg/ml G418 + SFB 10% a 34°C
Renovación de medio	1 a 2 veces por semana	2 a 3 veces por semana	2 a 3 veces por semana	2 a 3 veces por semana	24 horas después de sembrar, luego 2 a 3 veces por semana	2 a 3 veces por semana	Cada 2 a 3 días.
Sub-cultivación	1:2 a 1:4	1:4 a 1:8	1:3 a 1:6	1:2 a 1:4	1:2 a 1:4	1:2 a 1:4	1:4
Preservación	Medio de cultivo, 95%; DMSO, 5%	Medio de cultivo, 5% (v/v) DMSO	Medio de cultivo, 95%; DMSO, 5%	Medio de cultivo, 5% (v/v) DMSO	Medio de cultivo, 95%; DMSO, 5%	90% FBS; 10% DMSO	Medio de cultivo, 72%; SFB, 20%; DMSO, 8%

**Tabla II. Resumen de ensayos de xenotransplantes publicados, utilizando líneas celulares humanas de osteosarcoma en modelo murino inmunosuprimido.** Se detalla tipo de xenotransplante, capacidad de generar metástasis, cepa de ratón utilizado y referencia respectiva.

<b>Línea celular</b>	<b>Tipo de Xenotransplante</b>	<b>Generación metástasis</b>	<b>Ratón</b>	<b>Referencias</b>
<b>SaOS-2</b>	Subcutáneo Ortotópico	No Sí	Balb/c nude fem Balb/c nude fem	Kimura 2002[72] Dass 2006[73],2007[74]
	Endovenoso	No Sí (escasas) Sí (escasas)	NOD/SCID Athymic nude male Balb/c nude fem	Yuan 2009[75] Jia 1999[76] Kimura 2002[72]
<b>MG-63</b>	Subcutáneo Ortotópico	No Sí (escasas)	Balb/c nude fem Athymic nude male	Kimura 2002[72] Su 2009(82)[77]
	Endovenoso	No No	NOD/SCID Balb/c nude fem	Yuan 2009[75] Kimura 2002[72]
<b>U2-OS</b>	Subcutáneo	No No	Athymic Crl/nu/nu fem Balb/c nude fem	Manara 2000[78] Kimura 2002[72]
	Ortotópico	No	Athymic Crl/nu/nu fem	Scotlandi 1996[79]
	Endovenoso	No Sí No Sí	Balb/c nude fem Athymic Crl/nu/nu fem Balb/c nude fem Athymic Crl/nu/nu fem	Dass 2006[73] Manara 2000[78] Kimura 2002[72] Scotlandi 1996[79]
<b>HOS</b>	Subcutáneo	No No	Información sin acceso Balb/c nude fem	Arnstein 1974[80] Kimura 2002[72]
	Ortotópico	No	Athymic nude fem	MacGary 2002[81]
	Endovenoso	No No	Athymic nude male Balb/c nude fem	Luu 2005[82] Kimura 2002[72]
<b>G-292</b>	Subcutáneo	No	Balb/c nude fem	Kimura 2002[72]
	Ortotópico	Sí	SCID	Yang 2007[83]
	Endovenoso	No	Balb/c nude fem	Kimura 2002[72]
<b>143B</b>	Subcutáneo	No	Balb/c male	Kim 2002[84]
	Ortotópico	Sí	Athymic nude male	Luu 2005[82]
		No (sólo micro)	Balb/c nude fem	Dass 2006[73]
		Sí	NOD/SCID	Yuan 2009[75]

## ***RT-PCR***

Componentes de la vía Wnt-canónica ( $\beta$ -catenina, Wnt3a, Wnt5a, Wnt10b, LRP5/6, dkk1, Tcf4 y Lef1), algunos de sus genes blancos (COX-2, ciclina D1 y survivina), el factor de transcripción Runx2, marcadores del fenotipo óseo (fosfatasa alcalina, OPN, osteocalcina), genes blancos de ambas vías (VEGF, survivina, COX-2, OPN, MMP2, MMP9 y MMP13) y marcador de expresión constitutiva GAPDH, fueron detectados mediante RT-PCR semicuantitativo en seis líneas celulares de OS humano.

## ***Obtención del cDNA***

El RNA total fue extraído con reactivo TRIZOL® a partir células crecidas en monocapa siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen life Technologies). La integridad del RNA total se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras de RNA fueron tratadas con DNAsa I (endonucleasa) libre de RNAsas, RQ1RNase-Free DNase® (Promega Corporation), por 30 minutos a 37° C, luego se agregaron 1,5  $\mu$ l de DNAsa Stop (Promega) para detener la reacción y posteriormente se incubó a 65° C por 10 minutos para inactivar la DNasa. El cDNA fue sintetizado a partir de 3  $\mu$ g de RNA total utilizando transcriptasa reversa M-MLV *Reverse transcriptase*® (Promega) y partidores al azar (*Random Primers*®, Invitrogen Corporation) siguiendo protocolos normalizados según las instrucciones del fabricante.

## ***PCR semicuantitativa***

Las reacciones de PCR fueron preparadas en volumen total de 25  $\mu$ l conteniendo Buffer 1X, dNTPs 0.2mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Taq polimerasa 1.5 U y

10 pmol de cada partidor. Los partidores fueron diseñados utilizando los programas CLUSTAL-W y Primer Blast u obtenidos a partir de reportes previos (Tabla III). Las condiciones óptimas de PCR fueron estandarizadas previamente, evaluando parámetros de temperatura (gradiente de T<sup>o</sup>) y números de ciclos de amplificación hasta obtener rango lineal de respuesta. Los productos de amplificación de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio con transiluminador UV (Vilber Lourmat®). Los geles fueron fotografiados en condiciones estándar, intensidad de la señal cuantificada mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH utilizando el software Image J. Resultados fueron graficados utilizando software Graphpad® como promedio  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular fueron obtenidas con test ANOVA y se indican como \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,0001.



**Tabla III. Secuencia de partidores utilizados.**

Lista de los partidores utilizados para medir expresión, mediante RT-PCR, de los genes humanos analizados en esta tesis. Se indica la secuencia de partidores sentido (FW) y antisentido (RW) en sentido 5`a 3`, tamaño de producto de PCR en pares de bases (PB), longitud de cada partidor, temperatura de *annealing* (TM). Los partidores fueron diseñados utilizando el programa Primer Blast para genoma humano u obtenidos de la literatura científica.

GEN	PARTIDORES	SECUENCIA (5'->3')	PRODUCTO (PB)	LONGITUD	TM
AP	FW	AGTGCTCTGCGCAGGATTGGA	478	21	58
	RW	CACACAGGTAGGCGGTGGCG		20	60
VEGF(A)	FW	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	226	20	52
	RW	ATCTGCATGGTGTGTTGGA		20	51
RUNX2	FW	CCGCACGACAACCGCACCAT	289	20	60
	RW	CGCTCCGGCCCAAAATCTC		20	58
OC	FW	CTGGCCAGGCAGGTGCGAAG	271	20	60
	RW	CAGGCCAGCAGAGCGACACC		20	60
COX-2	FW	TCCAGATCACATTTGATTGACAG	441	23	50
	RW	TGTGGGAGGATACATCTCTCC		21	52
OC	FW	GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG	158	20	54
	RW	CGATAGGCCTCTGAAAGC		19	52
LRP6	FW	GCTGGAATGGATGTTCAAGTCG	295	23	56
	RW	CAGAATGGATTTACGCAGACCC		23	56
LRP5	FW	CAGCCTGACGCACCCCTTCG	325	20	60
	RW	CACCTCTCGGCTCCTGCCT		20	60
CICLINAD1	FW	CAGAAGAGCGCGAGGGAGCG	470	20	59
	RW	CTTCTCGGCCGTGAGGGGA		20	59
OPN (SPP1)	FW	TGAGAGCAATGAGCATTCCGATG	375	23	55
	RW	CAGGGAGTTTCCATGAAGCCAC		22	55
MMP2	FW	GATCTTCTTCTCAAGGACCGG	360	22	52
	RW	TTGGGAAAGCCAGGATCCAT		20	52
MMP13	FW	GATGGGCCCTCTGGCCTGCT	401	20	60
	RW	TGCAGGCGCCAGAAGAATCTGT		22	58
SURVIVINA	FW	CTTTCTCAAGGACCACCGCATCT	428,359, 241	23	56
	RW	GCACTTCTCCGCAGTTTCTCTC		22	56
DKK1	FW	AACCGGCACGGTTTCGTGGG	338	20	60
	RW	CGCACGGGTACGGCTGGTAG		20	59
TCF4	FW	TGGCCCTGAGAGGCAGCCAT	294	20	59
	RW	GGTCCTCATCGTCATTATTGCTAGAT		26	54
β-CATENINA	FW	TGGTGCCAGGGAGAACCCC	323, 628	20	60
	RW	CCCACCCCTCGAGCCCTCTC		20	60
WNT3A	FW	GTTGGGCCACAGTATTCCTC	410	20	60
	RW	ATCCCACCAAACCTCGATGTC		20	60
WNT5A	FW	GCAATGTCTTCCAAGTTC	197	18	58
	RW	AAGTGGCACAGTTTCTTC		18	58
WNT10B	FW	GAATGCGAATCCACAACAACAG	196	22	58
	RW	TTGCGGTTGTGGGTATCAATGAA		23	58
MMP9	FW	CCCGGACCAAGGATACAGT	151	19	52
	RW	GCCATTACGTCGTCCTTA		19	52
LEF1	FW	CCAGCTATTGTAACACCTCA	421	20	49
	RW	TTCAGATGTAGGCAGCTGTC		20	52
GAPDH	FW	CCTTCATTGACCTCAACTA	465	19	45
	RW	GGCCATCCACAGTCTTCT		18	50

### **Western blot**

Los niveles de proteína del factor de transcripción Runx2,  $\beta$ -catenina y genes relacionados a progresión tumoral y metástasis (OPN, Survivina y Cox-2) regulados por ambas vías, fueron analizados mediante western blot en 6 líneas de osteosarcoma humano y en la línea de osteoblasto fetal humano utilizada como control. Extractos celulares totales fueron obtenidos desde placas de cultivo de 100mm conteniendo células con una confluencia 80-90%. Las células fueron colectadas en 1 ml de PBS frío suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas *Complete mini*<sup>®</sup> (Roche), y MG132 25  $\mu$ M (Calbiochem); todo fue transferido a tubos eppendorf de 1,5 ml y luego centrifugado a 5000 RPM por 5 minutos a 4°C en centrifuga refrigerada (Mikro 200R, Heitich<sup>®</sup>). Los sedimentos obtenidos fueron mantenidos en hielo y diluidos en 100  $\mu$ l de buffer de lisis que contiene DTT 1M, inhibidores de proteasa y MG132 25  $\mu$ M. Las muestras fueron sonicadas por 10 segundos, puestas en hielo y luego cuantificadas mediante el método de ácido bicinconínico (Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). 70  $\mu$ g de proteínas fueron cargados en gel SDS PAGE 10%, separadas por electroforesis a 30 mA 180V por aproximadamente 2 horas y transferidas a membrana de nylon (Hybond<sup>™</sup>-N+, Amershan Biosciences) mediante transferencia húmeda por 90 minutos, aplicando 100 volt a 350 mA.

Las membranas fueron bloqueadas con leche 5% (Dry fat milk, Biorad<sup>®</sup>) por 1 hora, lavadas con PBS Tween 1% (PBS-T) por 5 minutos e incubadas con los anticuerpos primarios en PBS-T con leche 1%, lavadas en PBS-T, y luego incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en PBS-T con leche 1% y lavados en PBS-T. Los anticuerpos y condiciones utilizadas para detectar las proteínas en la membrana de Nylon

fueron las siguientes: Para detección de Runx2, incubación por 2 hrs a temperatura ambiente con anti-Runx2 monoclonal (gentileza de Dr. Stein) diluido 1:250-1:2000 v/v, luego lavado 3 veces por 7 minutos, seguido por incubación por 2 hrs a temperatura ambiente con secundario anti-mouse (Santa Cruz®, sc-2005) diluido 1:2000 v/v y finalmente lavado 3 veces por 7 minutos; Para detección de  $\beta$ -catenina, incubación por 1 hora a temperatura ambiente con anti- $\beta$ -catenina policlonal (BD Transducción Lab®, 610154) diluido 1:1000 v/v, luego lavado 3 veces por 5 minutos, seguido por incubación por 1 hora con secundario anti-mouse (Santa Cruz®, sc-2005) diluido 1:2000 v/v, y finalmente lavado 3 veces por 5 minutos; Para detección de survivina, incubación por 1 hora a temperatura ambiente con anti-survivina policlonal (RyD®, AF886) diluido 1:2500, luego lavado 3 veces por 10 minutos, seguido por incubación por 1 hora con secundario anti-rabbit (Santa Cruz®, sc-2004) diluido 1:2000 v/v y finalmente lavado 3 veces por 10 minutos. Para detección de Cox-2, incubación por 1 hora a temperatura ambiente con anti-Cox-2 policlonal (Abcam® Ab52237) diluido 1:450 v/v, luego lavado 2 veces por 10 minutos, seguido por incubación por 1 hora con secundario anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz®) diluido 1:2000 y finalmente lavado 3 veces por 5 minutos; Para detección de OPN, incubación overnight a 4° C con anti-OPN monoclonal (LFMb-14) (Santa Cruz®, sc-73631) diluido 1:400 v/v, luego lavado 2 veces por 5 minutos y 1 vez por 10 minutos, seguido por incubación por 1 hora con secundario anti-mouse (sc-2005, Santa Cruz®) diluido 1:2000 v/v y finalmente lavado 3 veces por 7 minutos; Para detección de  $\beta$ -actina, incubación por 1 hora a temperatura ambiente con anti- $\beta$ -actina policlonal (sc-1615, Santa Cruz®) diluido 1:5000 v/v, luego lavado 2 veces por 10 minutos, seguido por

incubación por 1 hora con secundario anti-goat (sc-2020, Santa Cruz®) diluido 1:5000 v/v y finalmente lavado 2 veces por 5 min y 1 vez por 10 minutos.

Las bandas proteicas inmunorreactivas fueron visualizadas mediante el kit de detección quimioluminiscente (Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) y reveladas utilizando películas fotosensible BioMax® Light Film (Kodak). La intensidad de señal fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Image J® y normalizadas por la señal para  $\beta$ -actina (control de carga). Resultados fueron graficados utilizando software Graphpad® como promedio  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular fueron obtenidas con test ANOVA y se indican como \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ .

### ***Inmunocitoquímica***

Se sembraron células a baja confluencia en cubreobjetos provistos de cámaras estériles (Molecular Probes, Grace Bio-Labs), completando un volumen de 350  $\mu$ l por pocillo y se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa húmeda y ambiente de CO<sub>2</sub>, para permitir que las células se adhirieran al cubreobjeto. Luego las células fueron lavadas con PBS y se fijaron con PAF 4% por 15 minutos a 4° C, se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y se permeabilizaron por 15 a 30 minutos con PBS/Triton-x 100. A continuación, las células se trataron con NH<sub>4</sub>Cl por 5 minutos, y se bloquearon con PBS/BSA/Glicina al 1% por 1 hora. A continuación, se incubó con el anticuerpo anti-Runx2 M-70 (Santa Cruz®, sc-10758) y anti- $\beta$ -catenina (BD Transduction Lab®, 610154) diluidos 1:50 v/v por 35 minutos a 37° C. Tras la incubación se

lavó 3 veces con PBS por 5 minutos, para luego incubar por 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario universal biotinado. Se lavó con PBS por 5 minutos y luego se incubó por 30 minutos con VECTASTAIN® R.T.U. ABC Reagent. Las muestras fueron reveladas con diaminobenzidina y montadas con medio de montaje FLO-TEXX®.

### ***Tratamiento con SB216367 y Cloruro de Litio***

Para sobreactivar la vía Wnt-canónica se realizó tratamiento con las drogas SB216367, un inhibidor de GSK3B, o cloruro de litio (LiCl), un conocido activador de la vía Wnt-canónica, en las seis líneas celulares de osteosarcoma humano en conjunto con el análisis de expresión de mensajero y proteína para Runx2,  $\beta$ -catenina, OPN y COX-2.

Líneas de osteosarcoma SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas en placas p60 hasta obtener confluencia de 60-70%, luego lavadas 1 vez con PBS 1X y tratadas con SB216367 10 $\mu$ M (solución stock de SB216367 50 mM diluido en DMSO) o con DMSO como control, en 1,5 ml de medio completo. Alternativamente las células fueron tratadas con cloruro de litio 20  $\mu$ M (solución stock de LiCl 1 M diluido en DMSO) o DMSO como control. A continuación, las células fueron incubadas por 48h-72 horas a 37° C, lavadas una vez con PBS 1X. Posteriormente se procedió a la obtención de RNA total o proteínas totales y al análisis de expresión de mRNA o proteína mediante RT-PCR o western blot como fue previamente descrito. Resultados fueron graficados utilizando software Graphpad® como promedio  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas con prueba de t-test pareado y se indican como \*,

$p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ .

### ***Transducción con Adenovirus***

Con el propósito de sobreexpresar Runx2 en las líneas de osteosarcoma humano, se utilizaron los vectores adenovirales AdV-GFP-Runx2 que contiene el gen de Runx2 *wild type* y proteína fluorescente verde (GFP) para su detección. Como control negativo se utilizó AdV-GFP, que únicamente expresa el gen GFP. Para los ensayos de migración e invasión, se sembraron  $3 \times 10^5$  células en placas p60 y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB hasta obtener una confluencia de 60%-70%. Luego, las células fueron transducidas con  $30 \times 10^{10}$  opu/mL (optical particle units) de AdV-Runx2 o AdV-GFP contenidas en 900  $\mu$ l de medio DMEN suplementado con 1% SFB. Posteriormente, a las 4 horas se adicionaron 600  $\mu$ l de DMEN 1% SFB y a las 10 horas se reemplazó por medio completo (DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos). Las células fueron crecidas por 24, 48 o 72 hrs tras la transducción. Para ensayos de proliferación, 30.000 células fueron sembradas en placas de 12 pocillos con medio completo hasta obtener adherencia a la placa y luego transducidas con AdV-Runx2 ó AdV-GFP a  $30 \times 10^{10}$  opu/ml en 300  $\mu$ L de medio DMEN 1% FBS. A las 4 horas se adicionó 600  $\mu$ l de DMEN 1% FBS y a las 10 horas se reemplazó por medio completo.

Extractos de proteínas totales y RNA total se obtuvieron a las 48 horas para verificar sobreexpresión de Runx2 mediante western blot y RT-PCR. Alternativamente, se verificó la sobreexpresión de Runx2 en células cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos e infectadas con AdV-GFP-Runx2 o AdV-GFP por 24, 48 y 72 horas. Los cubreobjetos conteniendo las células

transducidas fueron montados con solución Dako® sobre portaobjetos y la fluorescencia de GFP analizada mediante microscopia de epifluorescencia.

### ***Transfección con siRNA***

$3 \times 10^5$  células fueron sembradas en placas p60 y cultivadas en 3 ml de medio D-MEM 10% SFB libre de antibióticos a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia de 60-80% (aproximadamente 18-24 horas). Luego, las células fueron lavadas una vez con PBS y mantenidas en 1,7 ml de Opti-MEM (Invitrogen® 31985-070). Cada placa fue transfectada con Runx2 siRNA (Santa Cruz®, sc-37145) 100 nM utilizando oligofectamina (Invitrogen® 12252-011) en medio Opti-MEM, según las recomendaciones del fabricante. Como control negativo se utilizó siRNA-A (Santa Cruz®, sc-37007) 100 nM, que contiene secuencias al azar que no hibrida con mensajeros humanos. Las placas fueron incubadas con los respectivos siRNA por 4 horas tras lo cual se adiciona 1 ml de DMEM 30% FBS sin remover el medio de transfección y cultivadas a 37° C por 24 a 72 hrs post-transfección. Extractos de proteínas fueron obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs para verificar el silenciamiento de la expresión de Runx2 mediante western blot. Para ensayos de migración e invasión, las células fueron cosechadas 24 horas post-transfección, centrifugadas y lavadas 2 veces con PBS 1X, contadas bajo microscopio con cámara de Neubauer y sembradas en cámaras de invasión según se indica más abajo.

### ***Ensayos de Migración e Invasión***

Ensayos de migración e invasión fueron realizados en un sistema bicameral de invasión en Matrigel (BD Biocoat Matrigel Invasión Chambers, Biosciences, BD, Falcon™). La cámara superior contiene una membrana PET con poros de 8 µm recubiertas con una lámina de MATRIGEL (inserto Matrigel, IM). Como control se utilizó una cámara superior con membrana PET sin cubierta de MATRIGEL (inserto control, IC). El ensayo de invasión se basa en la capacidad de las células para degradar y penetrar el Matrigel y migrar a través de los poros de la membrana PET (IM) y quedar en su cara inferior, mientras que la migración se mide solo por la capacidad de las células para desplazarse a través de los poros de la membrana PET (IC) y quedar en su cara inferior.

2,5 a  $7 \times 10^4$  células fueron sembradas en las cámaras superiores (inserto Matrigel e inserto control) con medio no suplementado. Medio suplementado con FBS 5%, utilizado como quimioattractante, fue puesto en la cámara inferior. Las placas fueron incubadas a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 16 y 22 horas para el IC e IM respectivamente. Luego, las células que quedan en la superficie del Matrigel (IM) o en la superficie (cara superior) de la membrana PET (IC) fueron removidas con un algodón humedecido en medio no suplementado. Las células adheridas a la superficie inferior de las membranas PET fueron fijadas con metanol por 2 minutos y teñidas con azul de toluidina 1% en Borax 1% por 2 minutos. Las membranas fueron cortadas con escalpelo y montadas sobre portaobjeto con aceite de inmersión (Inmersol®). La superficie inferior de las membranas PET fueron fotografiadas en un microscopio de luz (Axiostar plus®, Zeiss) con objetivo 20X, obteniendo



fotografías representativas en los 4 cuadrantes de la membrana. El número de células que invadieron el Matrigel y que migraron a través de la membrana PET (IM) o que sólo migraron a través de la membrana PET (IC) fueron cuantificadas, en las imágenes digitalizadas, utilizando el *plugin "cell counter"* del programa Image J®. El porcentaje de invasión fue determinado dividiendo el número de células que invaden el MATRIGEL y migran a través de la membrana PET en el IM por el número de células que migran a través de la membrana PET del IC. El índice de invasión para las líneas celulares de OS se obtuvo al dividir el % de invasión de dicha línea celular por el % de invasión de una línea celular ósea no tumoral utilizada como control (hFOB). Resultados fueron graficados utilizando software Graphpad® como promedio  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular fueron obtenidas con prueba de t-test pareado y se indican como \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ .

## RESULTADOS

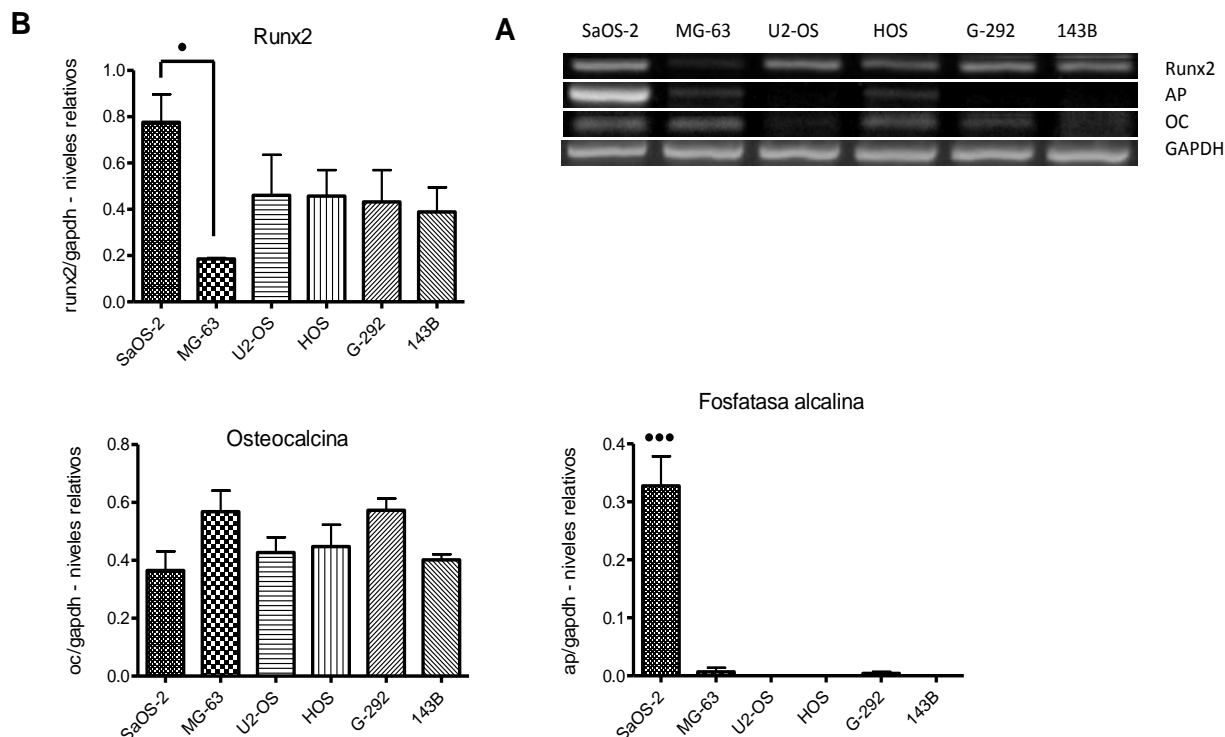
### **Objetivo 1. “Análisis de los niveles de mensajeros de Runx2, $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico”.**

Las seis líneas celulares de OS utilizadas en este estudio son presentadas en el siguiente orden: SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B. De acuerdo a la información disponible en la literatura, resumida en la Tabla III, las líneas G-292 y 143B son las que presentan mayor potencial metastásico. Interesantemente, la línea celular SaOS-2 resultó ser altamente metastásica, según datos generados con posterioridad en nuestro laboratorio (Tabla suplementaria II).

En todas las líneas celulares de OS se observó la presencia del mensajero para Runx2 (Figura 7A). Los niveles de mRNA para Runx2 en las líneas celulares U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron relativamente similares, con un significativamente mayor nivel en SaOS-2 y niveles más bajos en MG-63 (Figura 7B). Precisamente, SaOS-2 sería altamente metastásica y altamente invasiva como se muestra más adelante, mientras que MG-63 es una de las líneas celulares que presentó un bajo potencial metastásico, según los antecedentes recopilados en Tabla III.

Fosfatasa alcalina (AP), un marcador de diferenciación ósea temprana relacionado a maduración de matriz extracelular, nos permitió ordenar las líneas celulares según su grado de diferenciación. SaOS-2 es la línea celular que más expresó AP, mientras que MG-63 y U2-OS presentaron sólo una expresión marginal de este mensajero (Figura 7B). Los niveles de mRNA para osteocalcina, un marcador de diferenciación tardío relacionado a mineralización

de la matriz extracelular, fueron variables y no se observaron diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares de OS (Figura 7B), indicando solo un compromiso con la diferenciación ósea, pero no un estatus diferenciado.

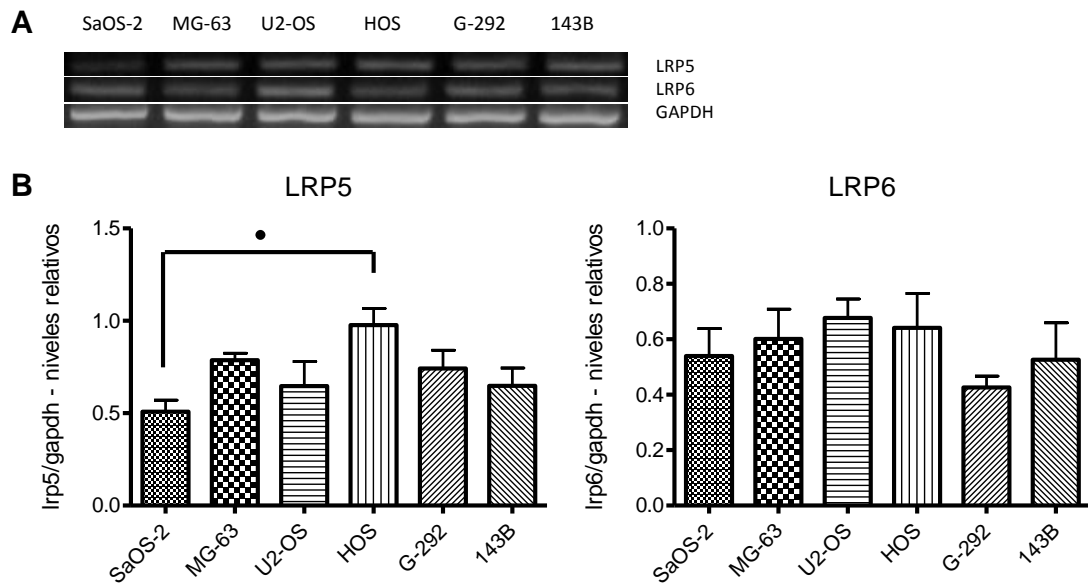


**Figura 7. Niveles de mRNA de Runx2 y marcadores de diferenciación ósea.**

Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para Runx2, fosfatasa alcalina y osteocalcina fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos.

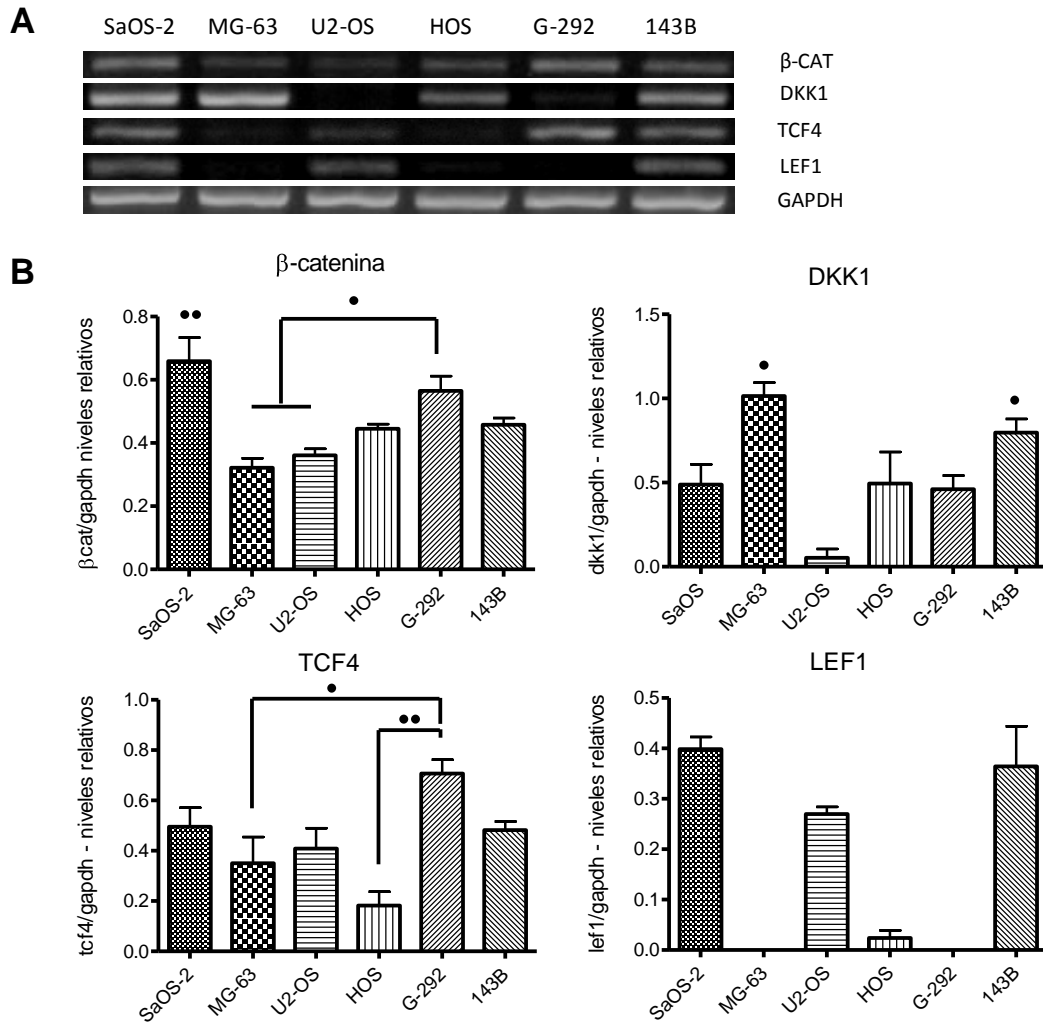
**A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ ; expresión Runx2, SaOS-2 vs MG-63; \*\*\*,  $p < 0,001$ : expresión de AP: SaOS-2 vs el resto de las líneas de OS.

Respecto a los componentes de la vía Wnt-canónica, se observó que los niveles de mRNA para los correceptores LRP5 y LRP6 fueron similares en las seis líneas celulares (Figura 8), existiendo sólo diferencia significativa entre la línea celular que mostró los mayores (HOS) y menores (SaOS-2) niveles de expresión de LRP5. El mensajero para  $\beta$ -catenina se expresó en todas las líneas de OS, siendo MG-63 y U2-OS las que significativamente mostraron los menores niveles en comparación a G292 y SaOS-2 (Figura 9). En contraste, los niveles de mRNA para moduladores de la vía Wnt-canónica como DKK1 y efectores como los factores transcripcionales TCF4/LEF1 se observaron en forma variable dependiendo de la línea celular analizada (Figura 9). Así tenemos que SaOS-2, U2-OS y 143B expresaron altos niveles de mensajero para LEF1 en comparación al resto de las líneas de OS. El mRNA para TCF4 se presentó en todas las líneas de OS, siendo mayor en G-292 en comparación a MG-63 y HOS que mostraron menores niveles. Los niveles de mRNA para el inhibidor de la vía Wnt-canónica (DKK1) prácticamente no se observaron en U2-OS y son significativamente mayores en MG-63 y 143B. Interesantemente, las líneas celulares SaOS-2, G-292 y 143B, de elevado potencial metastásico (tabla II), presentaron altos niveles de mRNA para los componentes de la vía Wnt-canónica analizados ( $\beta$ -catenina, DKK1 y TCF4/LEF1) (Figura 9). Respecto a los niveles de mensajero correspondiente a los morfógenos Wnts analizados (Figura 10), Wnt5a fue el más importante en cuanto a su expresión ubicua, ya que Wnt10b se expresó en forma variable y en bajos niveles y Wnt3a sólo se expresó en U2-OS. Interesantemente, MG-63, con bajo potencial metastásico y bajos niveles de mRNA para Runx2, presentó los menores niveles de mensajero para morfógenos Wnts, no expresando Wnt3a ni Wnt10b.



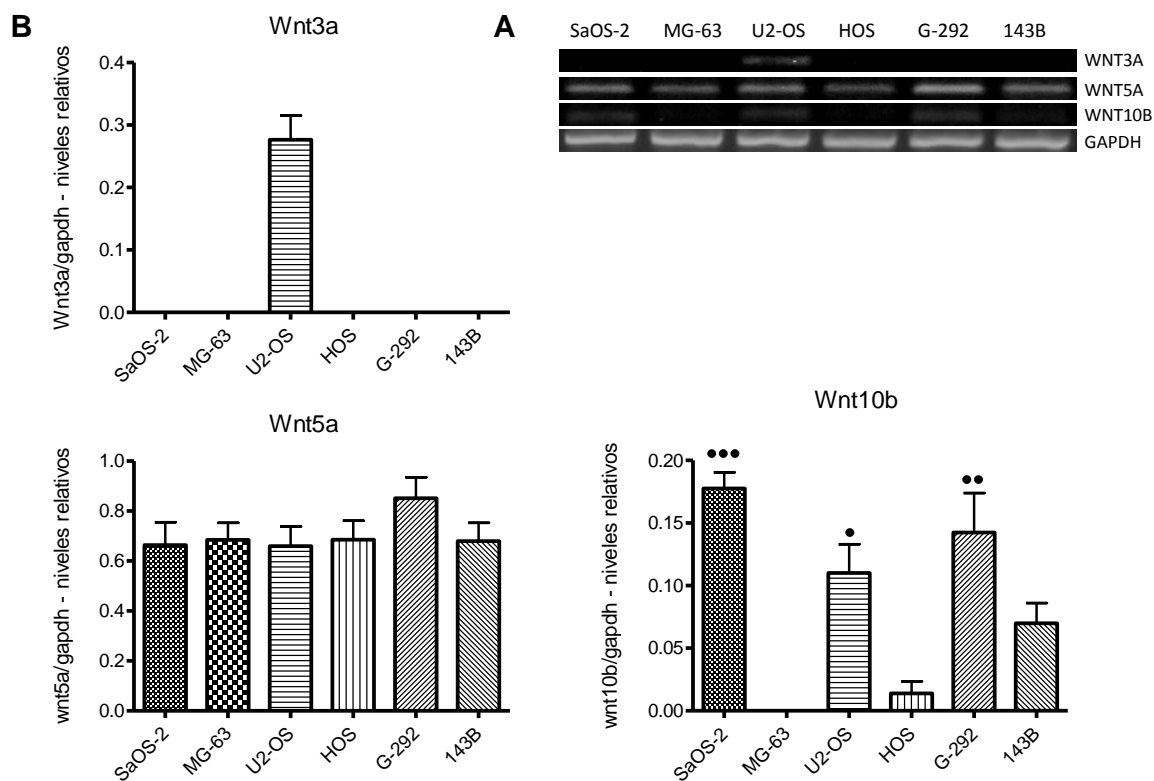
**Figura 8. Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.**

Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para LRP5 y LRP6 fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos. **A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ : expresión de LRP5, HOS vs SaOS-2.



**Figura 9. Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.**

Las líneas celulares SAOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para β-catenina, DKK1, TCF4 Y LEF1 fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos. **A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio ± SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ : expresión de β-catenina, G-292 vs MG-63 y U2-OS; expresión de DKK1, MG-63 y 143B vs resto de líneas de OS; expresión TCF4, G-292 vs MG-63. \*\*,  $p < 0,01$ : expresión de TCF4, G-292 vs HOS.



**Figura 10. Niveles de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica.**

Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para Wnt3a, Wnt5a y Wnt10b fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos. **A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ : expresión de Wnt10b, U2-OS vs HOS y MG-63. \*\*,  $p < 0,01$ : expresión de Wnt10b, G-292 vs HOS y MG-63. \*\*\*,  $p < 0,001$ : expresión de Wnt10b: SaOS-2 vs MG-63 y HOS.



A continuación, se procedió a analizar los niveles de mRNA para ocho genes (osteopontina, ciclina D1, survivina, COX-2, VEGF, MMP2, MMP9 y MMP13) relacionados a progresión tumoral y metástasis y que son blancos transcripcionales de Runx2 y la vía Wnt-canónica.

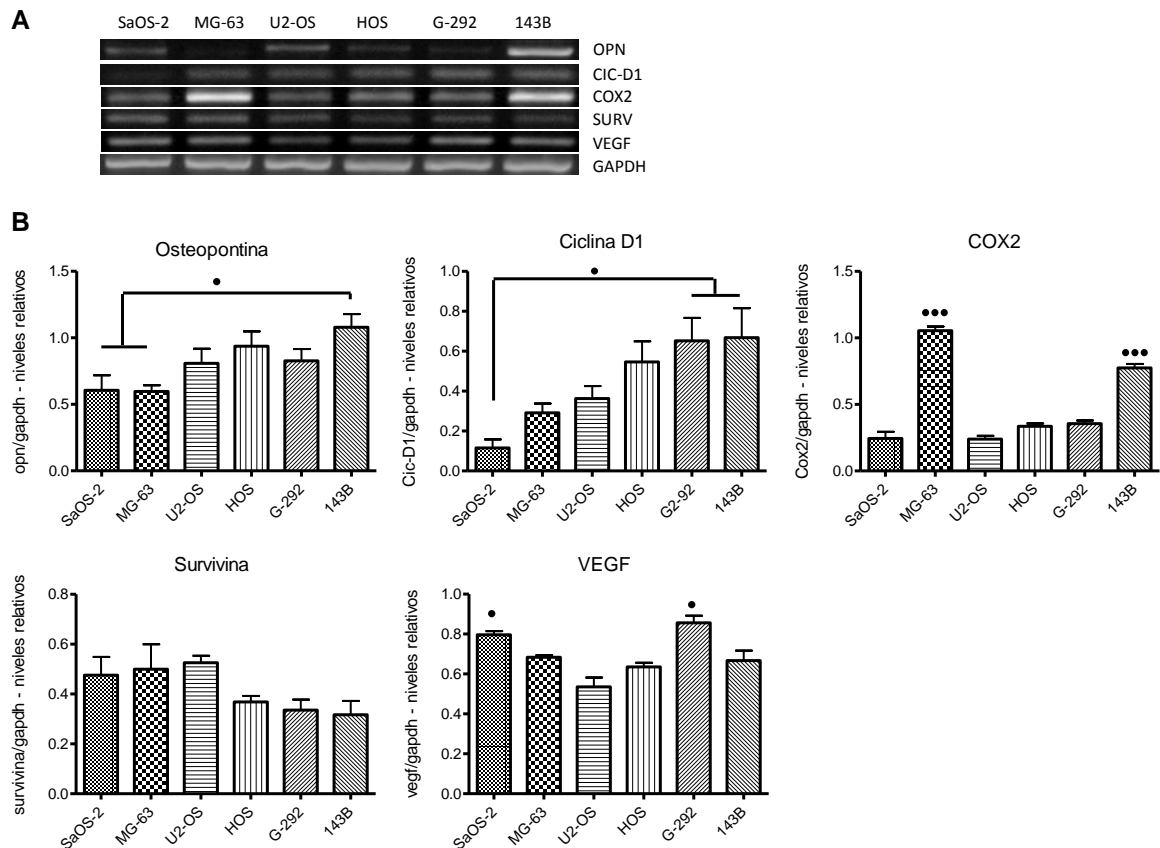
Los niveles de mensajero para Osteopontina, un marcador de diferenciación ósea tardío, que también ha sido vinculado a progresión tumoral y está relacionado a valor negativo de sobrevida en otros tumores, se expresaron en todas las líneas humanas de OS, pero se encontraron significativamente elevados en la línea celular 143B (Figura 11), que coincidentemente presentó el mayor potencial metastásico (Tabla III). Nuevamente, MG-63, de bajo potencial metastásico, en conjunto con SaOS-2, presentaron significativamente bajos niveles de mRNA para OPN.

Los niveles de mRNA para ciclina D1 (marcador de fase G<sub>1</sub> del ciclo celular) muestran una tendencia a ser elevados en líneas con alto potencial proliferativo como 143B y HOS (datos contenidos en otra tesis realizada en este Laboratorio), disminuyendo progresivamente en las líneas con baja tasa de proliferación como U2-OS, MG-63 y SaOS-2 (Figura Suplementaria I). El potencial metastásico no necesariamente se correlacionó con el potencial proliferativo y esto se ve reflejado en que la línea celular SaOS-2 (altamente metastásica) fue la que presentó el menor potencial proliferativo (Figura Suplementaria I) y bajos niveles de mensajero para ciclina D1. Inversamente, el mRNA para survivina presentó una tendencia a la disminución con respecto al potencial tumorigénico, pero sin significancia estadística (Figura 11). Los niveles de transcritos para COX-2 fueron significativamente mayores sólo en MG-63 y 143B, mientras que niveles de transcritos para VEGF fueron altos y

variables, destacando las líneas celulares G-292 y SaOS-2 (altamente metastásicas), que presentaron los mayores niveles de transcritos (Figura 11).

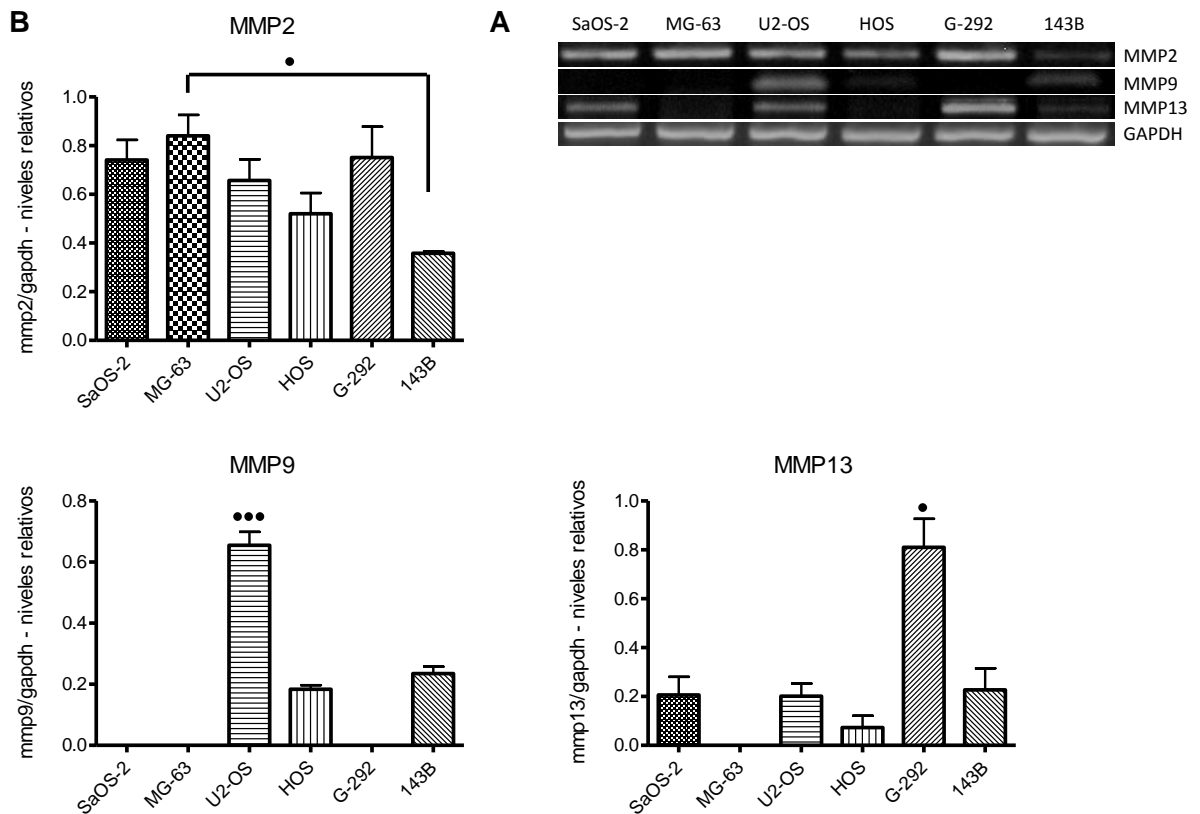
De las 3 MMPs estudiadas (Figura 12), solo MMP2 se expresó en las seis líneas de OS, siendo la línea MG-63 la de mayor expresión y 143B la de menor expresión. Para MMP9 y MMP13 los niveles de sus respectivos mRNA fueron diferentes para cada tipo celular. En SaOS-2 se observaron niveles de mRNA sólo para MMP13 y no para MMP9, al igual que G-292 mostró altos niveles de mensajeros para MMP13 y no para MMP9. Por otro lado, en U2-OS, HOS y 143B se observaron los mensajeros para ambas metaloproteinasas. Al contrario, MG-63, una de las líneas celulares con bajo potencial tumorigénico, no expresó ninguno de los mensajeros para estas dos MMPs, hecho considerable ya que estas enzimas han sido relacionadas a migración en células tumorales de otros tipos de cáncer.

En la figura 17A se muestra un gráfico resumen de la expresión de mRNA de componentes de la vía Wnt-canónica en las líneas SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B. Con valores positivos se graficaron los factores de transcripción TCF-4 y LEF1, la proteína eje  $\beta$ -catenina y los morfógenos Wnts, todos componentes que regulan positivamente la vía Wnt-canónica. Con valor negativo se graficó a DKK1, un conocido inhibidor de la vía Wnt- $\beta$ -catenina. Destaca que MG-63, la línea con menor potencial metastásico, presentó bajos niveles de mensajero para componentes que regulan positivamente la vía Wnt-canónica y en contraparte elevados niveles de DKK1. Al contrario, las líneas SaOS-2, 143B y G-292, las tres líneas con mayor potencial metastásico, presentaron altos niveles de reguladores positivos de la vía Wnt-canónica y menores niveles de DKK1.



**Figura 11. Niveles de mRNA de genes blancos de vía Wnt-canónica y Runx2.**

Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para OPN, ciclina D1, COX-2, survivina y VEGF fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos. **A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ : expresión de OPN, 143B vs SaOS-2 y MG-63; expresión de ciclina D1, SaOS-2 vs G-292 y 143B; expresión de VEGF, SaOS-2 y G-292 vs resto de líneas de OS. \*\*\*,  $p < 0,001$ : expresión de COX-2, MG-63 vs resto de líneas de OS y 143B vs SaOS-2, U2-OS, HOS y G-292.



**Figura 12. Niveles de mRNA de genes blancos de vía Wnt-canónica y Runx2.**

Las líneas celulares SAOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo RNA total y los niveles de mensajero para MMP2, MMP9 y MMP13, fueron analizados mediante RT-PCR, utilizando partidores específicos. **A.** Se muestra un resultado representativo de los productos de amplificación separados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. **B.** Los niveles de transcrito fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*,  $p < 0,05$ : expresión de MMP2, MG-63 vs 143B; expresión de MMP13, G292 vs resto de líneas de OS. \*\*\*,  $p < 0,001$ : expresión de MMP9, U2-OS vs resto de líneas de OS.

**Objetivo 2. “Análisis del nivel de expresión proteica de Runx2,  $\beta$ -catenina y algunos de sus genes blancos en líneas celulares de osteosarcoma con distinto potencial metastásico”.**

A continuación, se analizó la expresión proteica de Runx2,  $\beta$ -catenina, COX-2, osteopontina y survivina en las seis líneas celulares de osteosarcoma y en hFOB (línea celular de osteoblastos fetales humanos, utilizada como control). Al respecto, Runx2 presenta dos isoformas MRIPV y MASNS. La primera se expresa constitutivamente y en bajos niveles en tejido óseo, tejido mesenquimático no óseo y en células progenitoras osteoblásticas. Su perfil de expresión no cambia con el grado de diferenciación y tampoco es influida por factores que inducen osteogénesis como BMPs[85]. La isoforma MASNS es conocida como la isoforma osteoblástica, su patrón de expresión cambia a medida que progresa la diferenciación ósea, ya que es necesaria para osteogénesis y mantención del fenotipo osteoblástico[85].

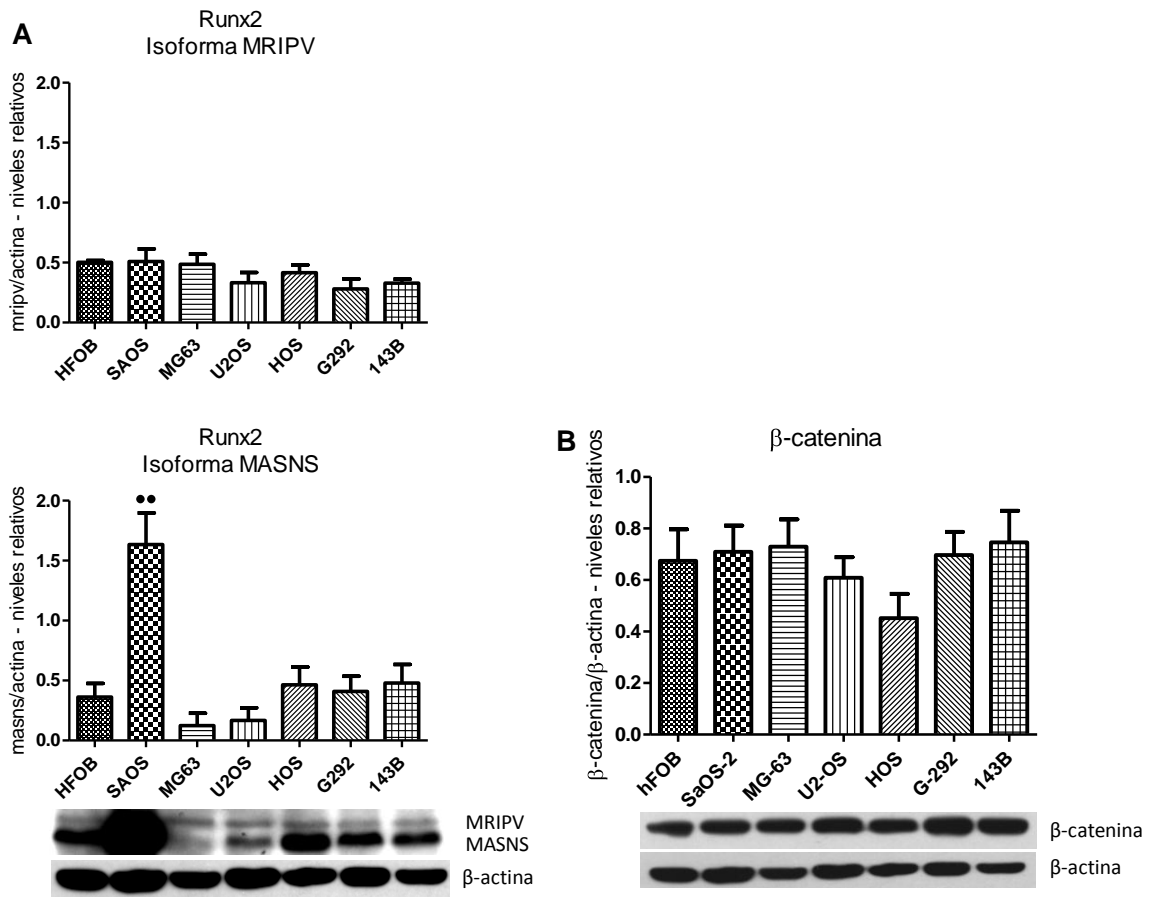
El análisis de la figura 13 muestra que la isoforma Runx2 MRIPV se expresó en todas las líneas celulares de osteosarcoma sin diferencias significativas en las siete líneas analizadas. Sin embargo, se distinguieron claramente dos grupos con distintos niveles de expresión de isoforma MRIPV; hFOB, SaOS-2 y MG-63 con mayores niveles que las restantes U2-OS, HOS, G-292 y 143B. La isoforma Runx2 MASNS (banda inferior) se expresó principalmente en SaOS-2 (altamente metastásica), seguida por la expresión en menor nivel en hFOB, HOS, G-292 y 143B (estas dos últimas también son metastásicas). Las líneas celulares MG-63 y U2-OS expresaron muy bajos niveles de esta isoforma. Al respecto, los niveles de mRNA para Runx2, que no discriminan las isoformas, fueron concordantes con los niveles de Runx2

observados por western blot. Sin embargo, no se descarta que la isoforma de mayor peso molecular corresponda a una modificación postraducciona (sumoilación, ubiquitinación, fosforilación) de la forma MASNS.

Además, se analizó la expresión de Runx2 y  $\beta$ -catenina mediante inmunocitoquímica cuantitativa, evaluando la fracción citoplasmática y nuclear (Figura 14 y 15). La evaluación de la localización nuclear para ambas proteínas fue fundamental, dado que se trata de factores transcripcionales. La señal nuclear de Runx2 (Figura 14) observada en las líneas de OS fue relativamente similar y concordante con los niveles de Runx2 MASNS (la isoforma mayoritaria de Runx2) detectados por western blot, es decir, mayor en SaOS-2, G-292 y 143B en comparación a MG-63 y U2-OS. En contraste, en las líneas MG-63, U2-OS y HOS la localización de Runx2 fue principalmente citoplasmática. La expresión de  $\beta$ -catenina (Figura 15) fue alta en las seis líneas de OS, con una tendencia a ser mayor en HOS, G-292 y 143B. Sin embargo, las líneas celulares de OS difirieron en la localización para  $\beta$ -catenina dentro de la célula, así mientras que en G-292 esta proteína se ubicó preferentemente en núcleo, en SaOS-2, U2-OS y 143b se localizó mayormente en el citoplasma y en HOS en igual nivel tanto en núcleo como en citoplasma.

Respecto a las proteínas cuya expresión es regulada por Runx2 y la vía Wnt-canónica, se observó que OPN se expresa en todas las líneas celulares (Figura 16), excepto en SaOS-2, que survivina se expresó en forma relativamente constante, siendo menor su expresión en SaOS-2 pero sin significancia estadística y que COX-2 se expresó considerablemente en MG-63 y en menor medida en 143B, pero no en el resto de las líneas celulares

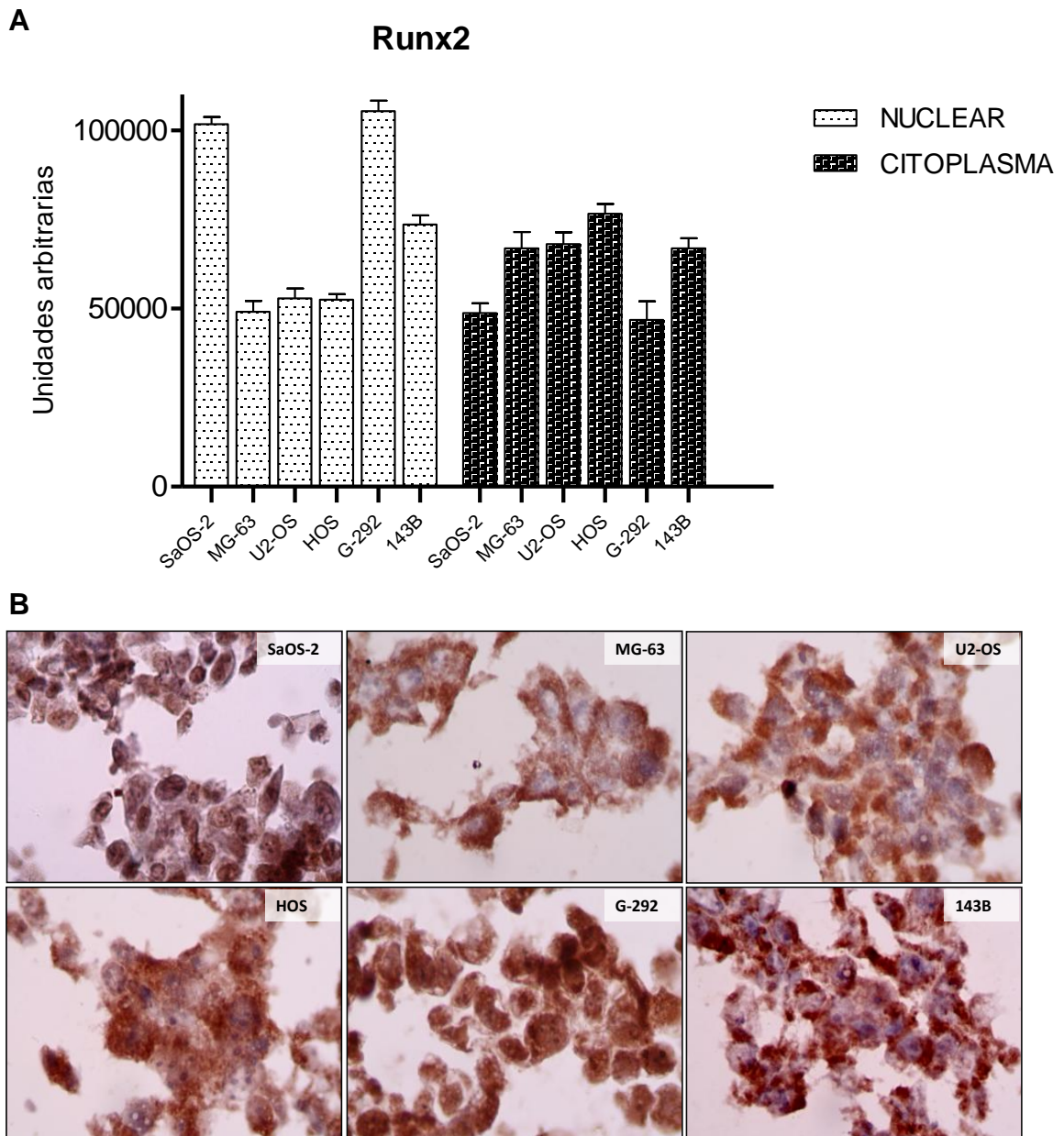
analizadas, lo que fue concordante con los niveles de mensajero previamente descritos (Figura 11).



**Figura 13. Niveles de proteína de Runx2, isoformas MASNS y MRIPV y  $\beta$ -catenina**

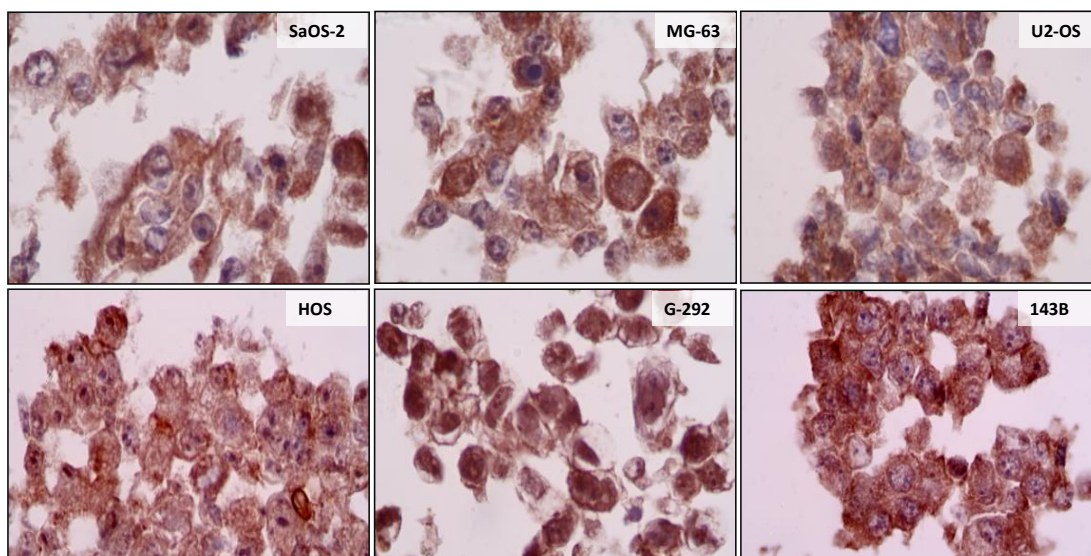
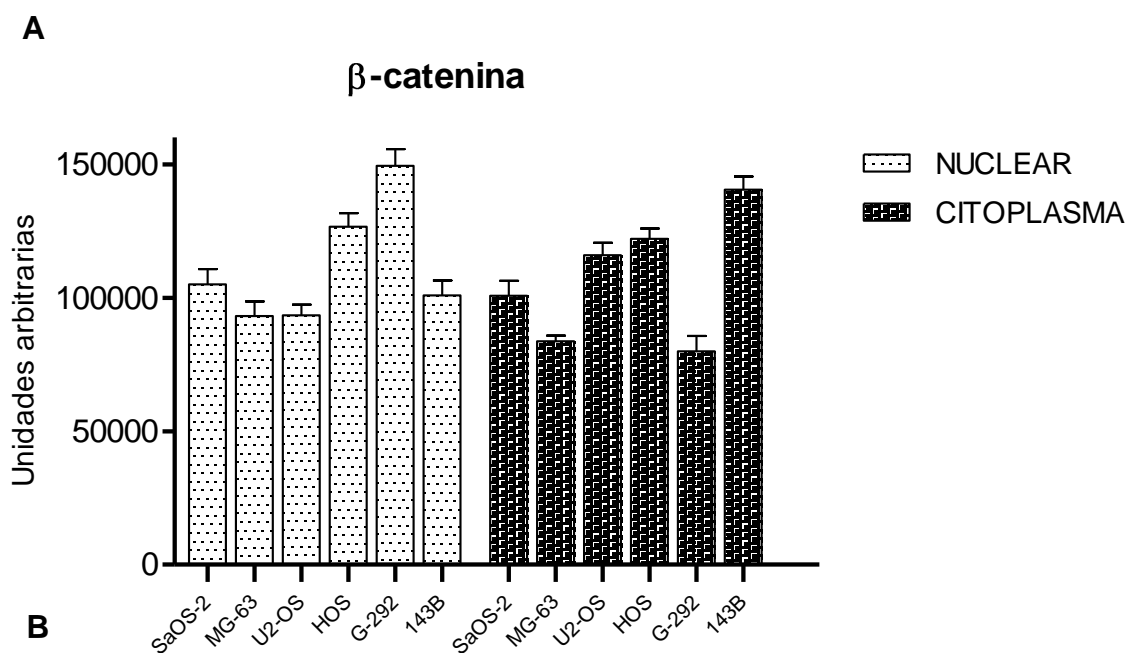
Las líneas celulares de OS SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B y osteoblasto fetal humano hFOB fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo proteína total y los niveles de Runx2 (A) y  $\beta$ -catenina (B) fueron analizados mediante western blot utilizando anticuerpos comerciales. Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunorreactivas obtenidas (isoforma MRIPV banda superior e isoforma MASNS banda inferior). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para  $\beta$ -actina. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*\*,  $p < 0,01$ : expresión de isoforma MASNS, SaOS-2 vs resto de líneas de OS.





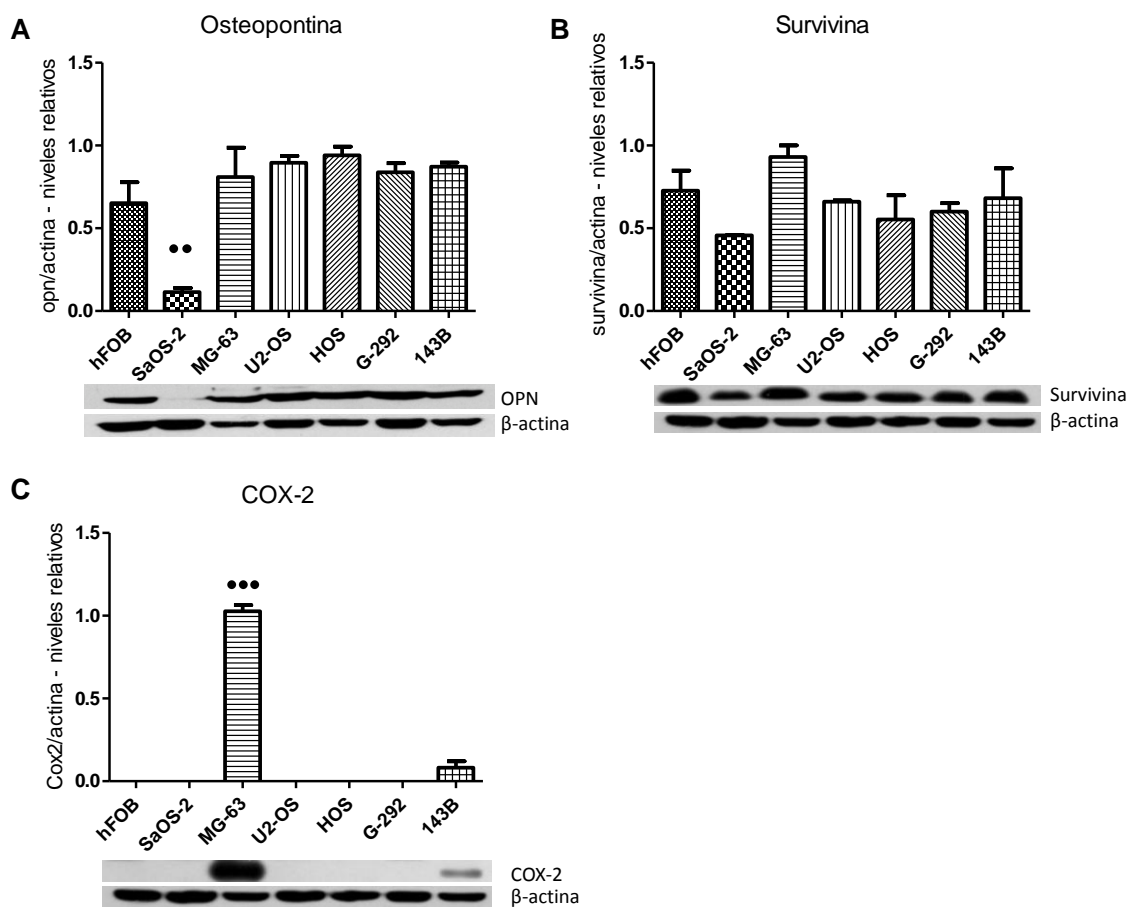
**Figura 14. Análisis de expresión de Runx2 mediante inmunocitoquímica.**

A. Análisis de expresión de Runx2 en las seis líneas celulares de OS mediante inmunocitoquímica. Imágenes representativas fueron obtenidas para cada línea celular en un microscopio óptico. B. Se cuantificó la tinción inmunorreactiva nuclear y citoplasmática mediante análisis densitométrico utilizando el programa Image J. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de 15 mediciones independientes.



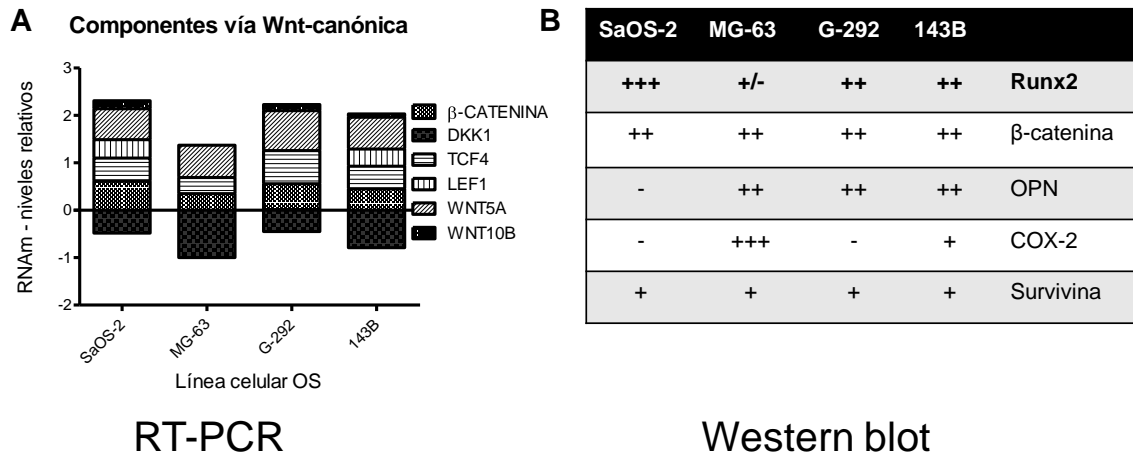
**Figura 15. Análisis de expresión de  $\beta$ -catenina mediante inmunocitoquímica.**

A. Análisis de expresión de  $\beta$ -catenina en las seis líneas celulares de OS mediante inmunocitoquímica. Imágenes representativas fueron obtenidas para cada línea celular en un microscopio óptico. B. Se cuantificó la tinción inmunorreactiva nuclear y citoplasmática mediante análisis densitométrico utilizando el programa Image J. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de 15 mediciones independientes.



**Figura 16. Niveles de proteína de genes blancos de Runx2 y de la vía Wnt-canónica**

Las líneas celulares de OS SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B y osteoblasto fetal humano hFOB fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo proteína total y los niveles de osteopontina, survivina y COX-2 fueron analizados mediante western blot utilizando anticuerpos comerciales. Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunorreactivas para OPN (A), survivina (B) y COX-2 (C). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para  $\beta$ -actina. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto a otra línea celular se indican como \*\*,  $p < 0,01$ : expresión de OPN, SaOS-2 vs hFOB, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143B de líneas de OS. \*\*\*,  $p < 0,001$ : expresión de COX-2, MG-63 vs resto de línea de OS y hFOB.



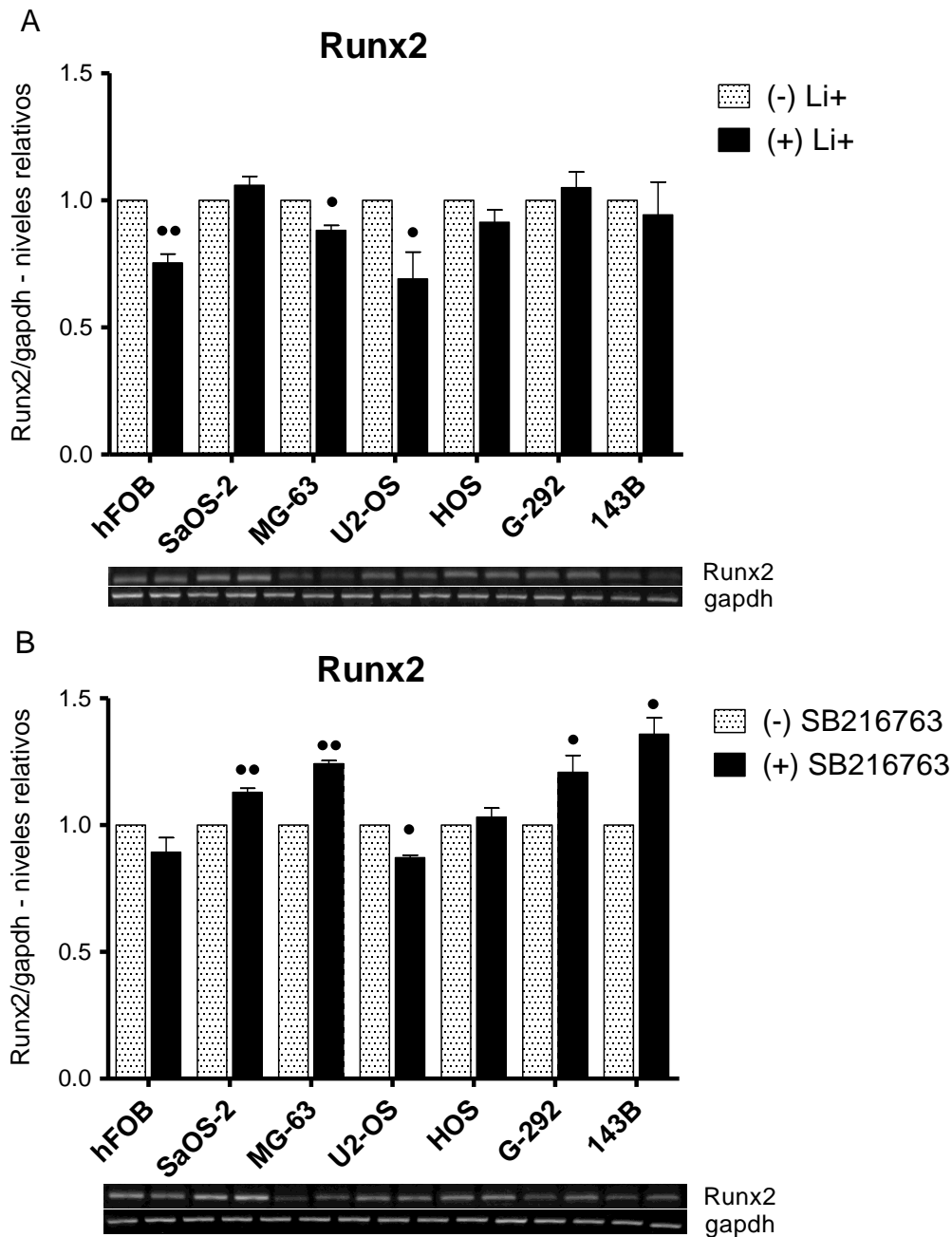
**Figura 17. Resumen de los niveles de mensajero de componentes de la vía Wnt-canónica y niveles proteicos de Runx2, β-catenina, OPN, COX-2 y survivina.**

A. Análisis de los niveles de mensajero de componentes de la vía Wnt-canónica en las líneas celulares SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B. En el gráfico agrupado se representan con valores positivos los niveles de expresión relativa de mensajeros para β-catenina, TCF4, LEF1, Wnt5a y Wnt10b que regulan positivamente la vía Wnt-canónica y con valores negativos DKK1, un inhibidor de la vía Wnt-β-catenina. B. Resumen de los niveles de expresión de las proteínas Runx2, β-catenina, OPN, COX-2 y survivina en las líneas celulares SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B.

### **Objetivo 3. “Análisis del nivel de expresión de Runx2 y algunos de sus genes blancos al sobreactivar la vía Wnt-canónica”.**

Con el fin de determinar si la sobreactivación de la vía Wnt-canónica en las células de OS altera el nivel de expresión de algunos de sus genes blancos como Runx2 y OPN, líneas celulares de OS fueron tratadas con SB216763 o Li+. Estos compuestos son reconocidos como activadores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, ya que inhiben la enzima GSK3 $\beta$  permitiendo así la estabilidad y acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina. A su vez, el aumento en los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina permitiría una activación transcripcional por esta vía de algunos de los genes blancos como Runx2 y OPN, observándose el aumento en los niveles tanto de mRNA y proteína.

El tratamiento de las células de OS con SB216763 produjo un aumento significativo en los niveles de mensajero para Runx2 en 4 de las 6 líneas celulares de OS (SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B), observándose además una tendencia no significativa al aumento discreto en HOS y una disminución en la línea celular U2-OS (Figura 18B). Los niveles de mRNA para Runx2 en la línea celular HOS y en el control hFOB, no se vieron afectados por este tratamiento. Sorpresivamente, el tratamiento con litio provocó una disminución significativa, no esperada, en los niveles de mensajero de Runx2 tanto las líneas celulares de OS MG-63, U2-OS y control hFOB (Figura 18A). No se observaron cambios significativos en los niveles del mensajero para Runx2 en ninguna de las otras líneas celulares de OS que fueron tratadas con litio. Considerando los resultados anteriores, se utilizó en los experimentos siguientes solo el inhibidor farmacológico SB216763.

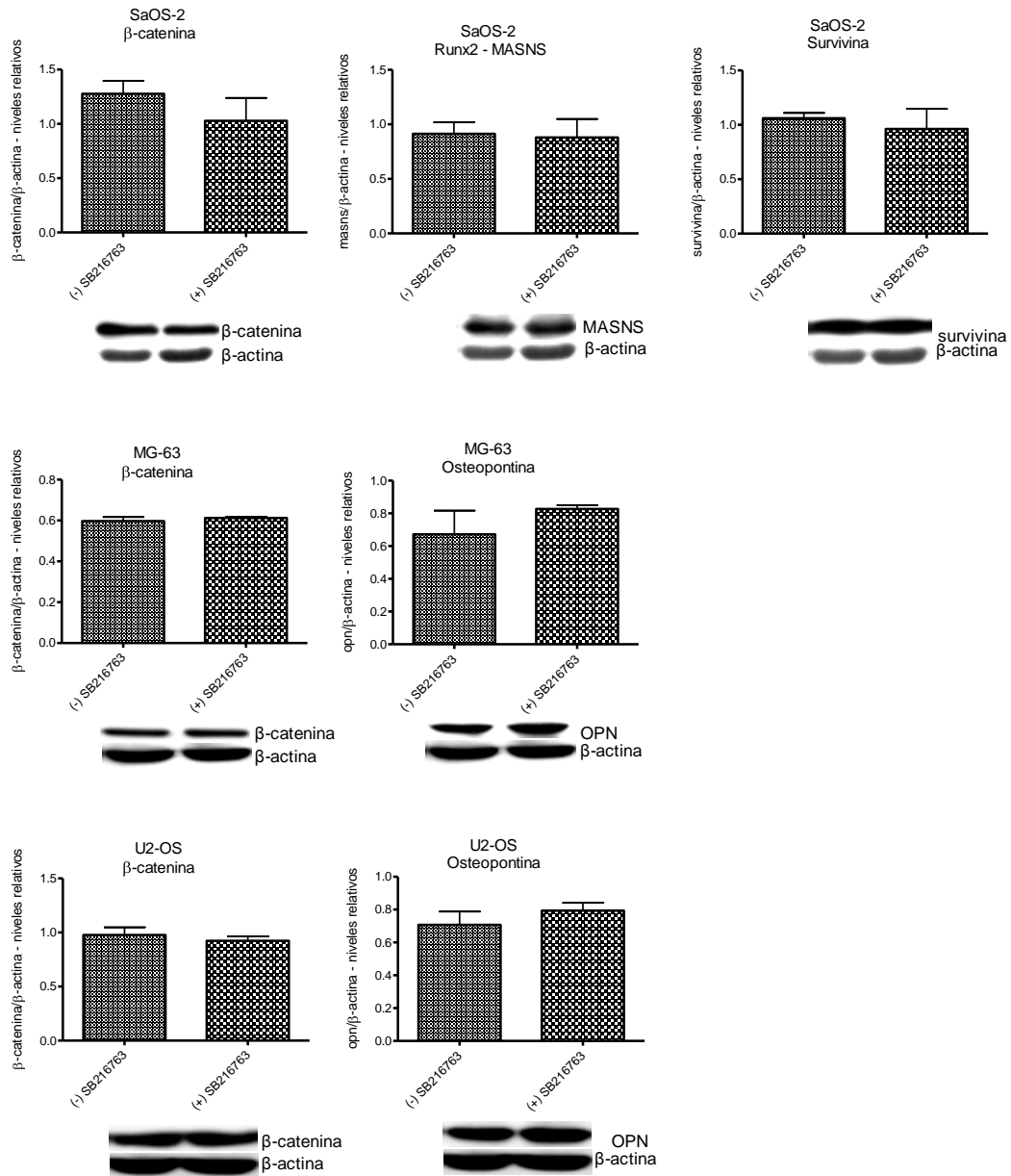


**Figura 18. Efecto del tratamiento con litio y SB216763 en los niveles de mensajero de Runx2.**

Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292, 143B y osteoblasto fetal humano (hFOB) fueron cultivadas hasta un 70% de confluencia y tratadas con litio 10 mM (A) o SB216763 10  $\mu$ M por 24 horas (B). Posteriormente, se analizaron los niveles de mRNA específicos mediante RT-PCR visualizando los productos de amplificación en geles de azarosa teñidos con bromuro de etidio. Se representan los niveles de mensajero para Runx2 relativo a los niveles de GAPDH. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se indican como \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

A continuación, se analizó si el tratamiento de las células de OS con SB216763 indujo cambios en los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina, así como en los niveles de las proteínas Runx2, osteopontina y survivina (estas tres últimas proteínas, cuyos genes son blancos transcripcionales de la vía Wnt-canónica). Survivina se evaluó, en vez de osteopontina, sólo en SaOS-2 ya que esta línea celular no expresó osteopontina, y en el caso de las líneas celulares MG-63 y U2-OS no se muestra Runx2 por presentar niveles casi indetectables. En las líneas SaOS-2, MG-63 y U2-OS, el tratamiento con SB216763 no modificó significativamente los niveles de proteína para  $\beta$ -catenina, Runx2, osteopontina y survivina. Solo se observó un aumento discreto en osteopontina en la línea celular MG-63 (Figura 19). En contraste, en las líneas celulares HOS, G-292 y 143B, el tratamiento con SB216763 resultó en un aumento significativo de los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina en las líneas HOS y 143B, y de Runx2 en G-292 y 143B (Figura 20). Los niveles de OPN también mostraron un aumento en las líneas HOS y 143B, aunque este no fue significativo.

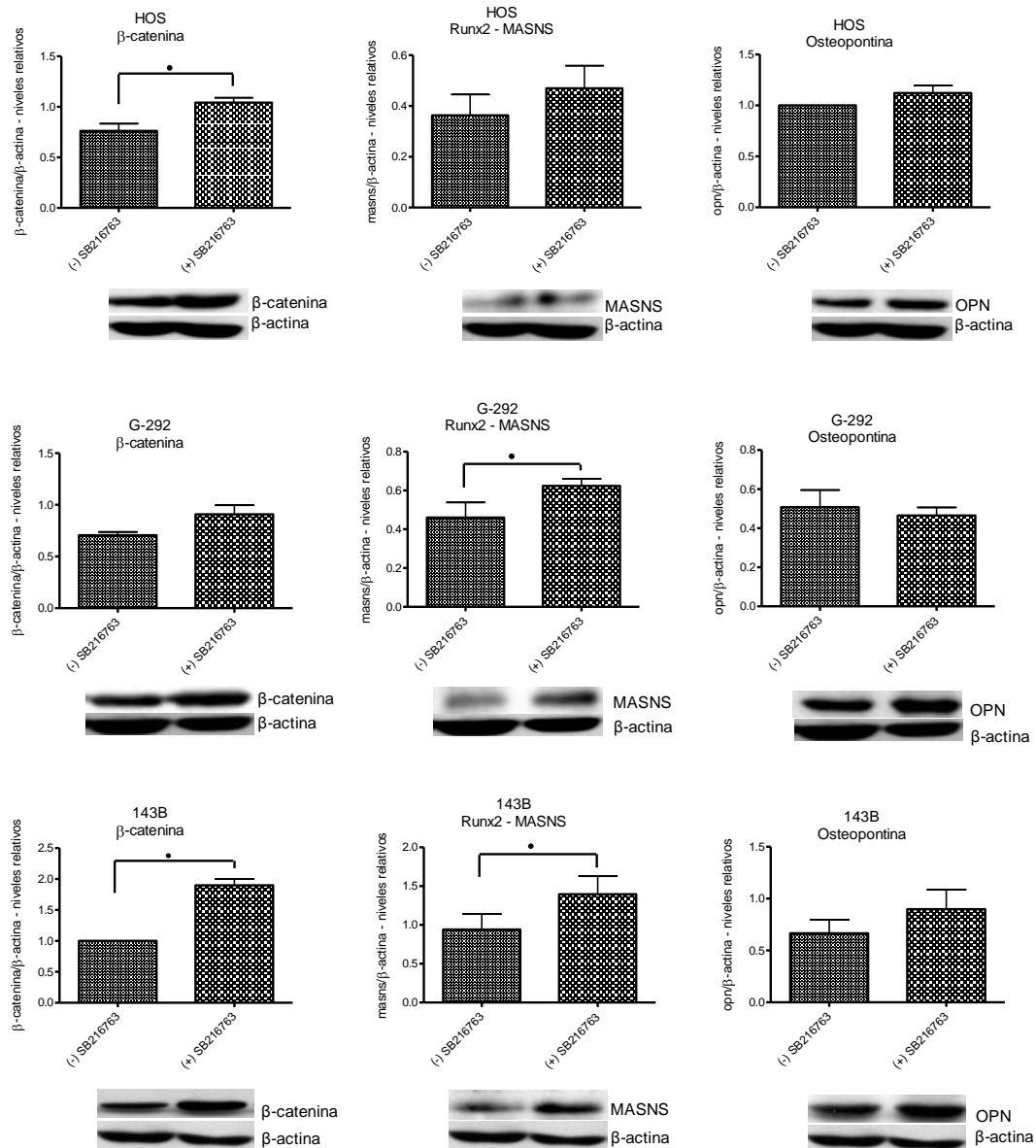
En resumen, sólo las líneas HOS, G-292 y 143B respondieron aumentando los niveles de expresión proteína de  $\beta$ -catenina, Runx2 y OPN al sobreactivar la vía Wnt-canónica.



**Figura 19. Efecto del tratamiento con SB216763 en los niveles de proteína para β-catenina, Runx2, survivina y OPN.**

Las líneas celulares de SAOS-2, MG-63 y U2-OS fueron cultivadas hasta un 70% de confluencia y luego tratadas por 24 horas con SB216763 10 μM o medio con DMSO como control. Se extrajo proteína total a las 24h y los niveles de β-catenina, Runx2 y survivina fueron analizados mediante WB para la línea SaOS-2, mientras que β-catenina y OPN fueron analizados en las líneas MG-63 y U2-OS. Se muestra un resultado representativo de cada WB. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para β-actina. Las barras muestran datos (promedio ± SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*,  $p < 0,05$ .





**Figura 20. Efecto del tratamiento con SB216763 en los niveles de proteína para β-catenina, Runx2 y OPN.**

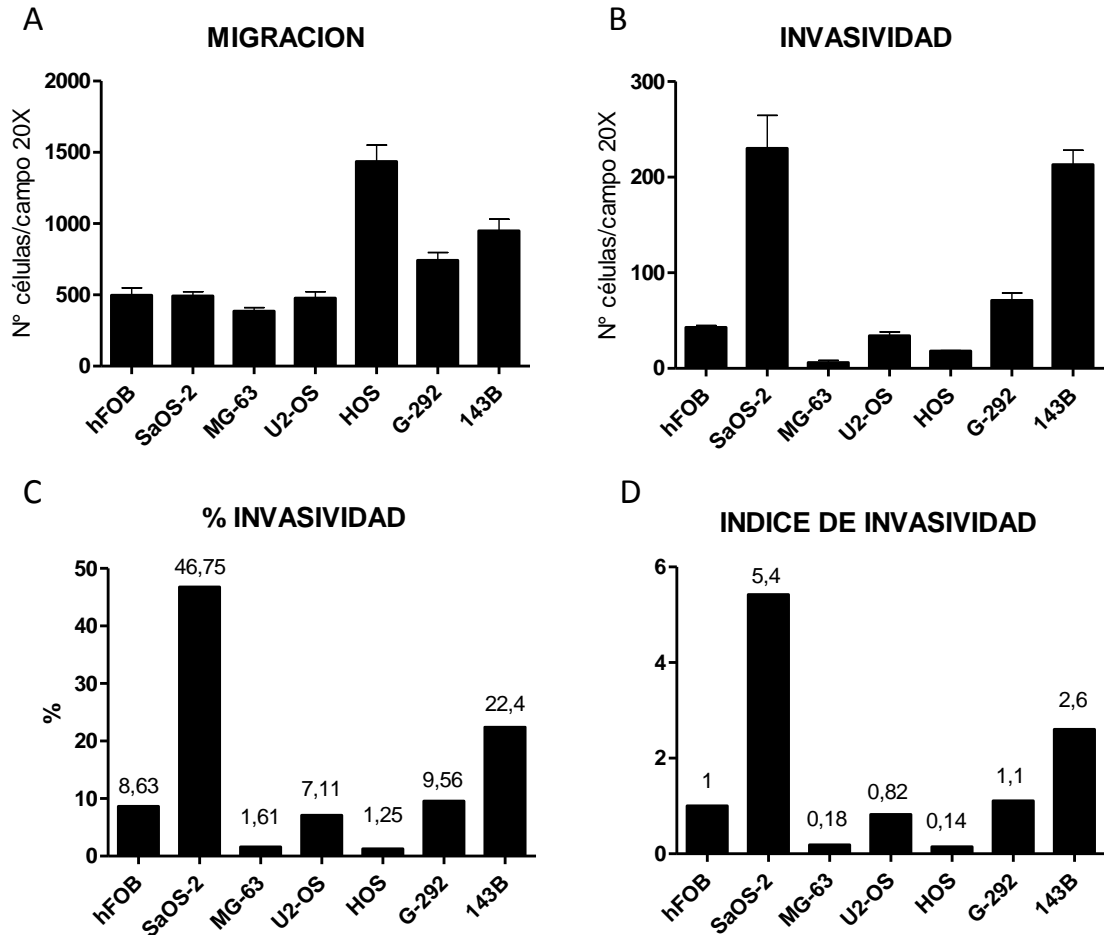
Las líneas celulares de HOS, G-292 y 143B fueron cultivadas hasta un 70% de confluencia y luego tratadas por 24 horas con SB216763 10 μM o medio con DMSO como control. Se extrajo proteína total y los niveles de β-catenina, Runx2 y OPN fueron analizados mediante WB para las líneas HOS, G-292 y 143B. Se muestra un resultado representativo de cada WB. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para β-actina. Las barras muestran datos (promedio ± SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*,  $p < 0,05$ .

#### **Objetivo 4. “Efecto de la modulación de la expresión de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma en parámetros de migración e invasividad”**

Previo a la modulación de la expresión de Runx2 y el análisis de su efecto sobre procesos de migración e invasión, determinamos la capacidad de migración e invasión in vitro de las 6 líneas de OS en condiciones basales, la que fue comparada con la información disponible en modelos murinos in vivo que se desarrolla en nuestro laboratorio (Tabla Suplementaria II). Como se muestra en la figura 21A, el ensayo de migración mostró que las líneas de celulares SaOS-2, MG-63 y U2-OS presentaron una capacidad migración similar a la línea no tumoral hFOB, mientras que las líneas HOS, G-292 y 143B mostraron una capacidad de migración de 2.9, 1.5 y 1.9 veces mayor a hFOB, respectivamente. Complementariamente, se observó que las líneas celulares MG-63, U2-OS y HOS tienen una menor capacidad de invasión comparada a la línea hFOB y que sólo SaOS-2, G-292 y 143B tuvieron una capacidad de invasión de 5.3, 1,6 y 4,9 veces mayor, respectivamente (Figura 21B).

A continuación se estimó el % de invasión, es decir que porcentaje de las células que migraron, fueron capaces de invadir el matrigel (Figura 21C). Así, como la capacidad de invasión fue baja en MG-63, U2-OS y HOS, incluso menor a la capacidad mostrada por hFOB, sus % de invasión fueron también bajos (1.6%, 7.1% y 1.2%, respectivamente), siendo incluso menor al mostrado por hFOB (8.6%). Más aún, la línea celular HOS mostró la mayor capacidad de migración (1436.3), pero una muy baja capacidad de invasión. Por otro lado, la línea celular G-292 mostró un % de invasión similar a hFOB (9.5% v/s 8.6%), mientras que el % de invasión fue claramente mayor en 143B y SaOS-2 (22.4% y 46.7%, respectivamente). Consecuentemente, el cálculo del índice de

invasión para las líneas celulares de OS (obtenido al dividir el porcentaje de invasión de dichas líneas celulares por el porcentaje de invasión de una línea celular ósea no tumoral utilizada como control como hFOB) mostró que sólo las líneas celulares SaOS-2 y 143B presentaron un índice de invasión superior (5.4 y 2.6, respectivamente) al de la línea control hFOB (1.0) (Figura 21D).

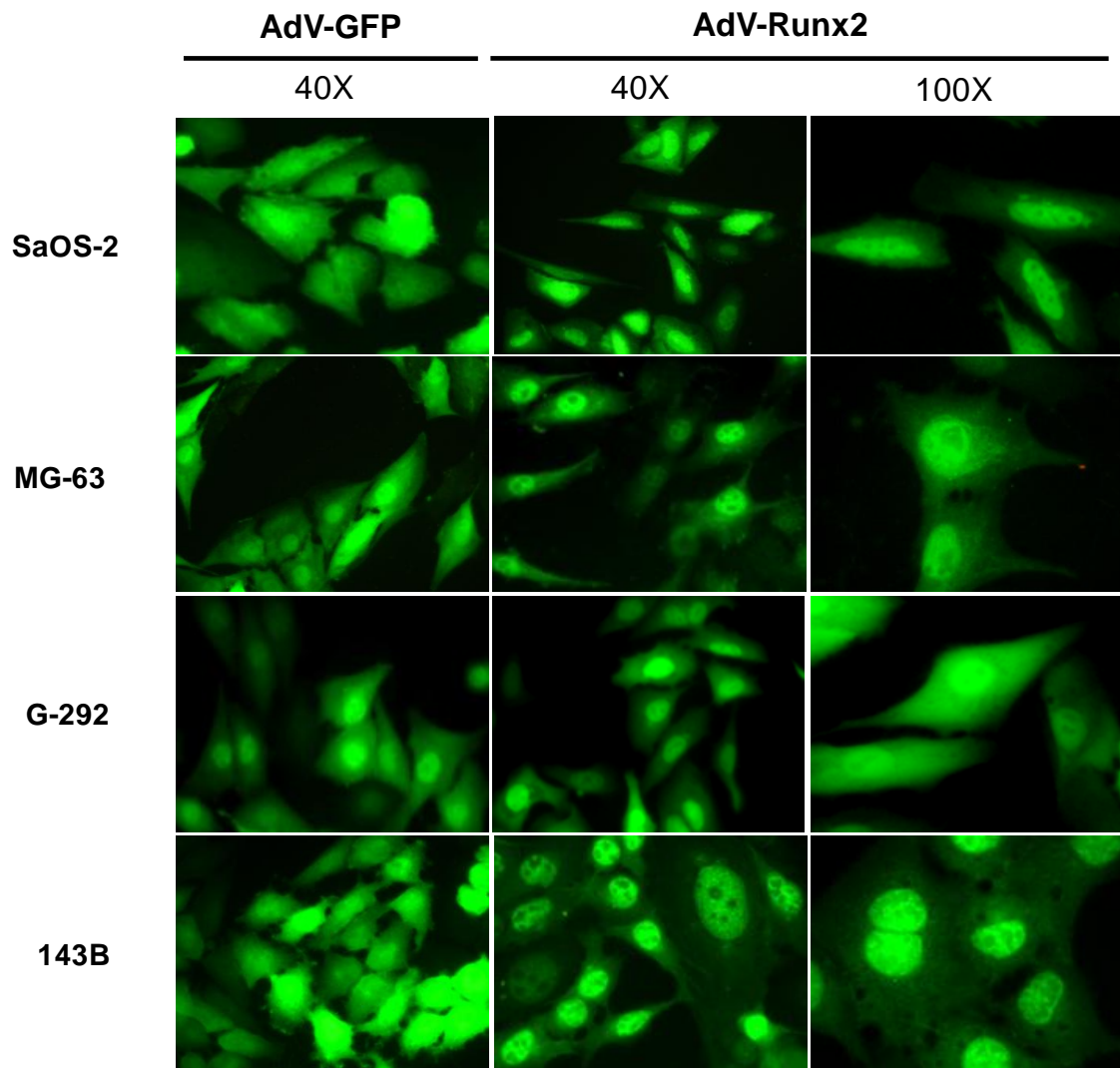


**Figura 21. Capacidad de migración e invasión de las líneas celulares de OS *in vitro*.**

50 x 10<sup>3</sup> células de las líneas celulares SaOS-2, MG-63, U2-OS, HOS, G-292 y 143b y osteoblasto fetal humano hFOB, utilizada como línea de control no tumoral, fueron estimuladas a migrar a través de membrana PET sin matrigel (Inserto Control, IC) por 16h o estimuladas a invadir membrana PET cubierta por matrigel (Inserto Matrigel, IM) por 22 horas. El número de células capaces de migrar en el IC (A) o invadir en IM (B) se determinó por conteo directo bajo microscopio óptico. Se determinó el porcentaje de invasividad (C) dividiendo el número de células que migraron a través de la membrana PET e invadieron el matrigel en el IM por el número de células que sólo migraron a través de la membrana PET del IC. El índice de invasión (D) se obtuvo al dividir el % de invasión de cada línea celular por el % de invasión la línea celular control (hFOB).

Para analizar el efecto de la expresión de Runx2 sobre parámetros de progresión tumoral en células de OS, se realizó la modulación de los niveles de esta proteína mediante sobreexpresión de GFP-Runx2 utilizando vectores de expresión adenoviral (AdV) y silenciamiento de su expresión mediante siRNA. Bajo estas condiciones se evaluó la capacidad de migración e invasión *in vitro*.

Para comprobar la sobreexpresión de GFP-Runx2 (AdV-Runx2) en líneas de OS, células transducidas con adenovirus fueron montadas sobre cubreobjetos y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia. Como control de sobreexpresión se utilizó un vector adenoviral que sólo expresa GFP (AdV-GFP). En la figura 22 se observó la sobreexpresión de GFP-Runx2 y de GFP en las cuatro líneas de OS transducidas con adenovirus (SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B). Las fotografías fueron obtenidas 48 hrs posterior a la transducción adenoviral. En las cuatro líneas se obtuvo una tasa de transducción mayor al 90% de las células, tanto en el control AdV-GFP como con AdV-Runx2. La distribución de este factor de transcripción sobreexpresado fue preferentemente nuclear siendo escasa su presencia en el citoplasma.



**Figura 22. Evaluación de la sobreexpresión de Runx2-GFP en líneas celulares de OS.** Las líneas celulares SaOS-2, MG-63, G-292 y 143B fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos hasta un 60-70% de confluencia, luego transducidas con AdV-GFP-Runx2 o AdV-GFP como control y cultivadas por 24, 48 y 72h. Las células fueron visualizadas en microscopio de epifluorescencia. Se observa una imagen representativa para cada línea celular transducida con AdV-GFP y AdV-GFP-Runx2 a las 48 horas con objetivos 40X y 100X.

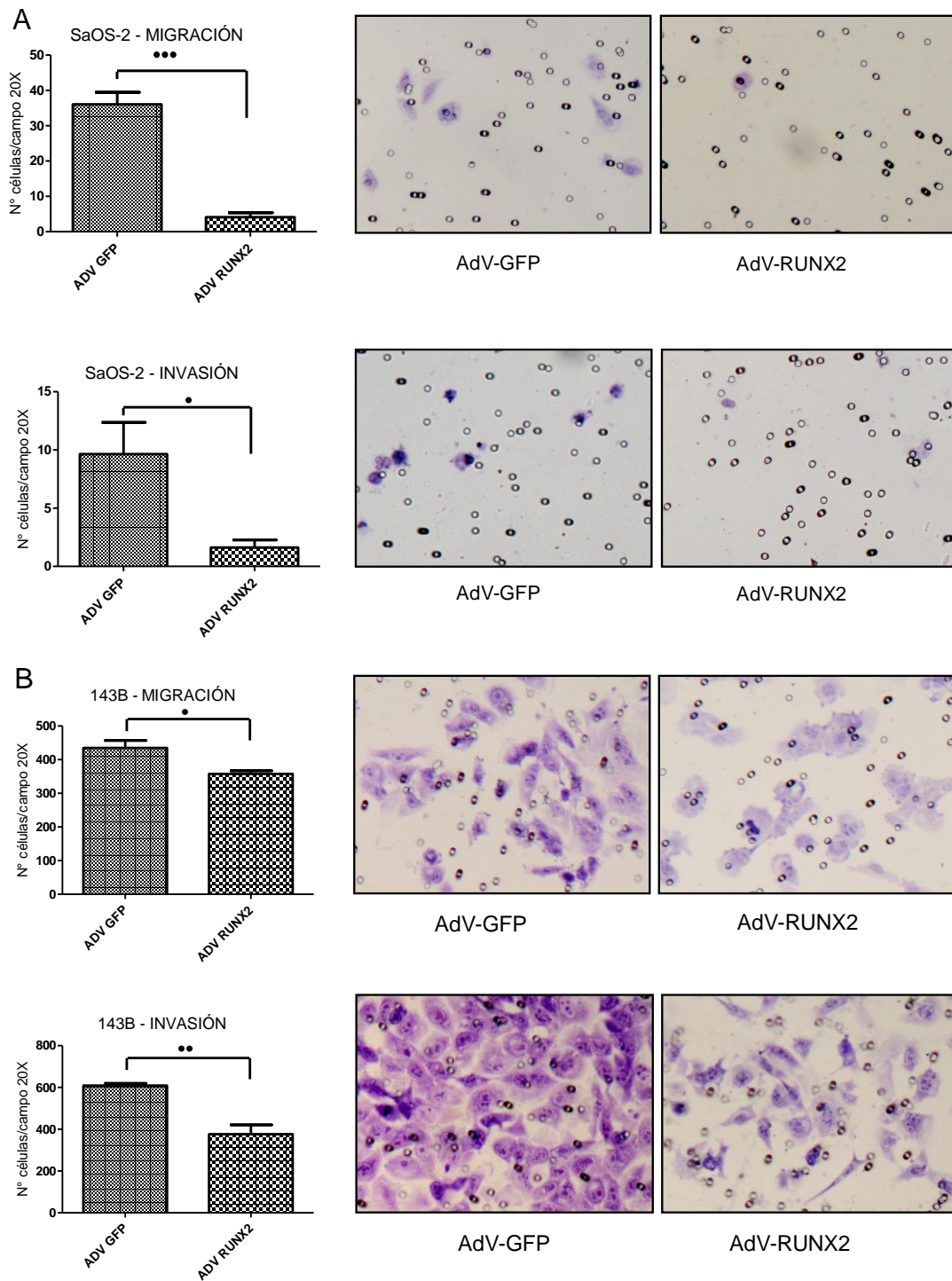
Para evaluar el efecto de la sobreexpresión Runx2 en parámetros de progresión tumoral en OS, se realizaron ensayos de migración e invasión *in vitro* en un sistema de cámaras de migración e invasión en Matrigel.

Como se muestra en la figura 23, inesperadamente, el aumento en la expresión de Runx2 generó una disminución en la capacidad de invasión en las líneas SaOS-2 y 143B. Específicamente, se observó una disminución de un 83% en la capacidad de invasión de SaOS-2 (Figura 23A) y una caída significativa de un 38% en la invasión de 143B (Figura 23B). De igual forma, una sobreexpresión de Runx2 provocó una disminución de un 88% y 18% en la capacidad de migración de las líneas celulares SaOS-2 y 143B, respectivamente. Este resultado podría ser explicado por un efecto diferencial dosis dependiente de Runx2 sobre sus genes blancos en que sobreexpresión de Runx2 regule negativamente la expresión de un gen blanco. Sin embargo, no descartamos un efecto tóxico por acumulación de Runx2 o la inducción de apoptosis.

Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar la sobreexpresión de Runx2 en dos líneas celulares de OS que presentan una menor capacidad de invasión en relación a SaOS-2 y 143B (G-292) e incluso menor a la mostrada por la línea celular hFOB (MG-63). Así, el aumento en la expresión de Runx2 generó un aumento en la capacidad de invasión de 3,5 y 1,7 veces, en las líneas celulares MG-63 y G-292 respectivamente (Figuras 24 A-B). Además, se observó que la sobreexpresión de Runx2 provocó un aumento en la capacidad de migración de 6,3 y 1,9 veces en MG-63 y G-292 respectivamente (Figuras 24 A-B). Interesantemente, esta sobreexpresión de Runx2 generó un aumento en la capacidad de migración e invasión en las

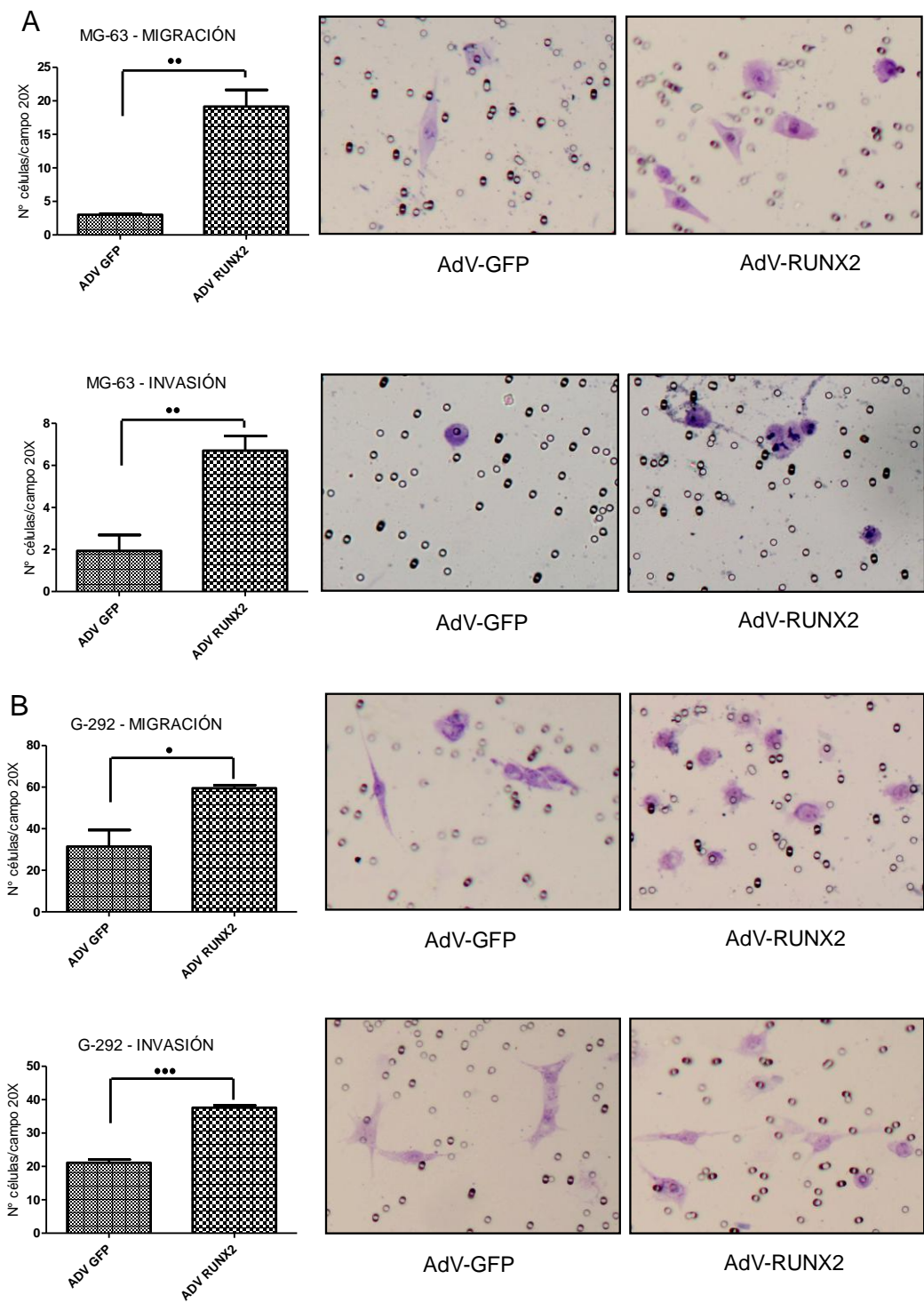
líneas de OS que mostraron una baja capacidad en estos parámetros y que presentaron bajos o moderados niveles de expresión de proteína Runx2.





**Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.**

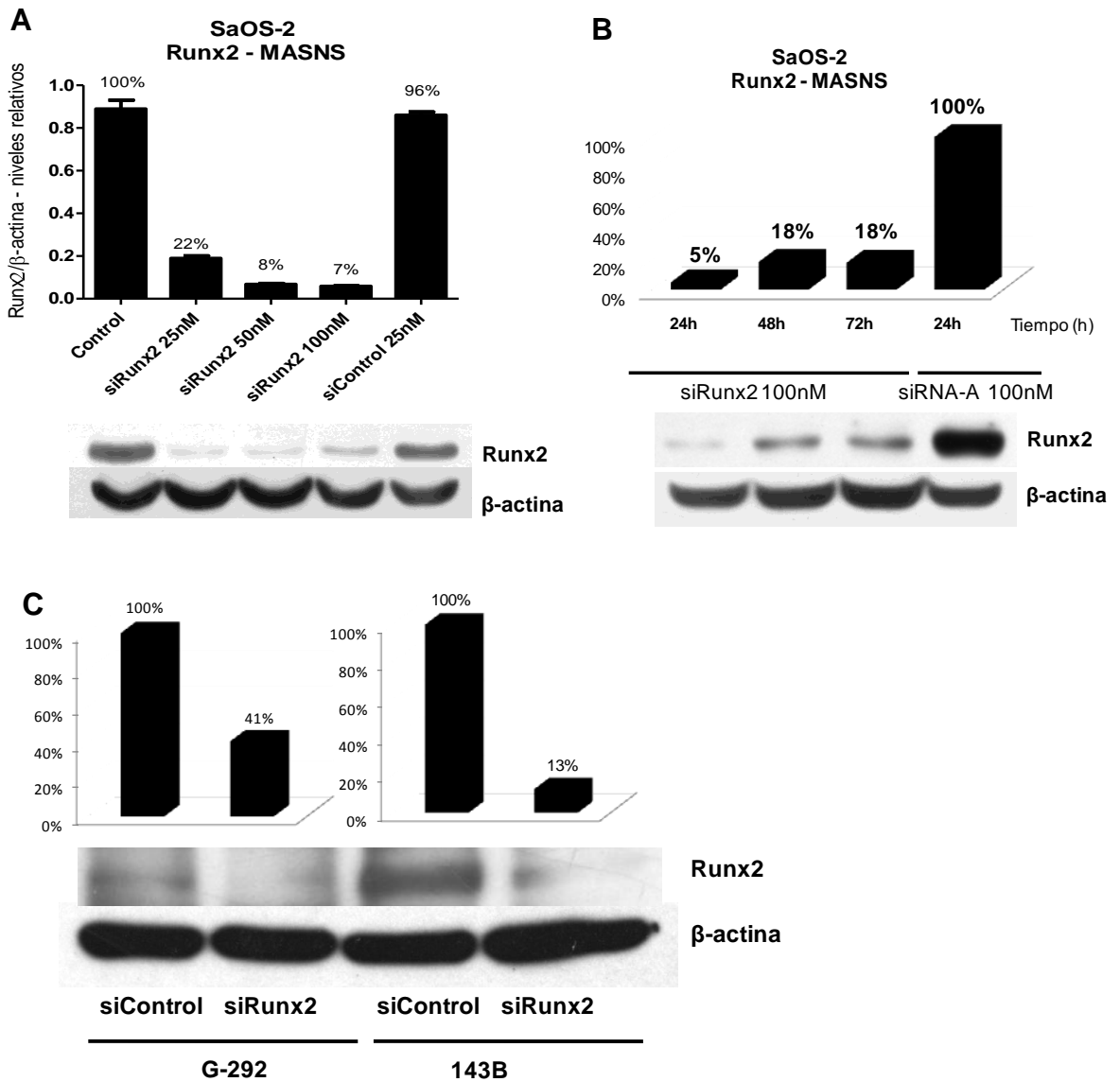
50 x 10<sup>3</sup> células de las líneas celulares SaOS-2 (A) y 143B (B) fueron transducidas con AdV-Runx2 o AdV-GFP y estimuladas a migrar a través de membrana PET sin matrigel del IC por 16h o estimuladas a invadir membrana PET cubierta por matrigel del IM por 22 horas. El número de células capaces de migrar o invadir se determinó por conteo directo bajo microscopio óptico. Las barras muestran datos (promedio ± SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*, p<0,05, \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001.



**Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.**

50 x 10<sup>3</sup> células de las líneas celulares MG-63 (A) y G-292 (B) fueron transducidas con AdV-Runx2 o AdV-GFP y estimuladas a migrar a través de membrana PET sin matrigel del IC por 16h o estimuladas a invadir membrana PET cubierta por matrigel del IM por 22 horas. El número de células capaces de migrar o invadir se determinó por conteo directo bajo microscopio óptico. Las barras muestran datos (promedio ± SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*, p<0,05, \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001.

Con el fin de modular negativamente los niveles de Runx2 y analizar su efecto en parámetros de progresión tumoral, se utilizó el silenciamiento de expresión mediado por siRNA. Para determinar la efectividad del silenciamiento de Runx2 con siRNA se eligió la línea SaOS-2 ya que es la que expresó mayores niveles de proteína Runx2. Se realizó una curva de dosis respuesta utilizando concentraciones crecientes de 25-50-100nM de siRNA-Runx2 (R) y como control se realizó transfección con 25nM siRNA-Control (C). Los resultados de la figura 25A mostraron que se alcanzó un nivel de silenciamiento óptimo para Runx2 con un tratamiento por 24 horas y con dosis de 50 a 100nM de siRNA-Runx2, llegando a valores de niveles de proteína Runx2 de solo un 7%-8% en relación al control. Para determinar el rango temporal durante el que se mantuvo el efecto del silenciamiento de Runx2 con siRNA, se realizó una curva de tiempo hasta 72h post-transfección utilizando una concentración de siRNA-Runx2 de 100nM. Como se observa en la figura 25B, la expresión de Runx2 alcanzó niveles de silenciamiento del 95%-82% durante el periodo de 24-72 horas, relativos al control. Además se realizó el silenciamiento de Runx2 en las líneas celulares G-292 y 143B, observándose una caída a un 41% y 13%, en relación al control, en G-292 y 143B, respectivamente (Figura 25C).



**Figura 25. Silenciamiento de Runx2 mediante siRNA en líneas celulares de OS.**

Células SaOS-2, G-292 y 143B fueron crecidas hasta confluencia de 60-70% y luego transfectadas con siRNA-Runx2 o siRNA-A. En (A) de curva dosis respuesta en línea SaO-2, de izquierda a derecha: control de transfección vacío, siRNA-Runx2 25-50-100nM y transfección con siRNA-A 25nM. Se muestra un resultado representativo de cada WB a las 24 horas. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por la señal para  $\beta$ -actina. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. En B, se realizó una curva de tiempo en SaOS-2 hasta las 72h con siRNA-Runx2 100nM. En C, líneas G-292 y 143B fueron transfectadas con siRNA-Runx2 100nM ó siRNA-A 25nM. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico, normalizados por la señal para  $\beta$ -actina y graficados como % de expresión de Runx2 respecto a control siRNA-A. Se muestra un resultado representativo de cada WB a las 24, 48 y 72 horas en (B) y a las 24 horas en (C).

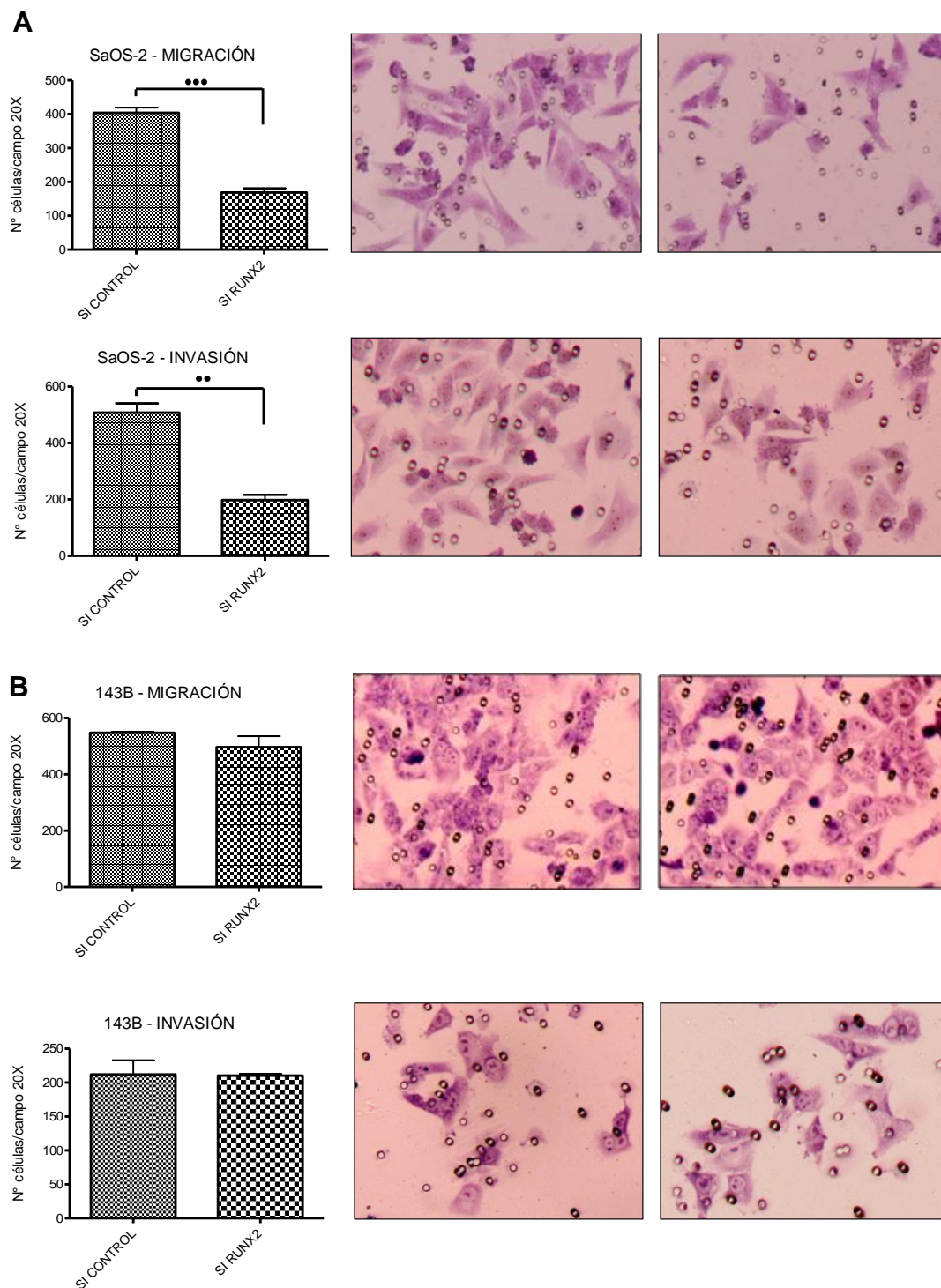
Para evaluar el efecto de silenciamiento de Runx2 sobre parámetros de progresión tumoral en OS se realizaron ensayos de migración e invasión *in vitro* utilizando las líneas celulares SaOS-2 y 143B, que presentaron la mayor capacidad de invasión y elevados niveles de Runx2.

Como se muestra en la figura 26A, el silenciamiento de Runx2 en SaOS-2 generó una disminución de un 61% y 58% en la capacidad de invasión y migración, respectivamente. Inesperadamente, en la línea celular 143B, de gran potencial metastásico y elevados niveles de Runx2, el silenciamiento de Runx2 no generó cambios en estos parámetros de progresión tumoral (Figura 26B). Esto último es probable que se deba a que 143B es una línea celular derivada de la línea HOS y que ha sido modificada genéticamente mediante transformación con el gen c-myc, por lo que la mayor capacidad de invasión y migración pueden estar dados por el efecto de este oncogén y no por Runx2 (al menos principalmente).

Finalmente, se analizó el efecto del silenciamiento de Runx2 en la capacidad de invasión de las líneas celulares U2-OS y G-292, que aunque presentaron una capacidad de invasión discreta y menor que la demostrada por SaOS-2 y 143B, sigue siendo relativamente similar o mayor a la observada en hFOB (Figura 21). No así el caso para MG-63 y HOS que presentaron una capacidad de invasión muy inferior a la mostrada por hFOB (Figura 21). En particular MG-63, que además presentó los más bajos niveles de Runx2, lo cual no la hizo buena candidata al silenciamiento con siRNA.

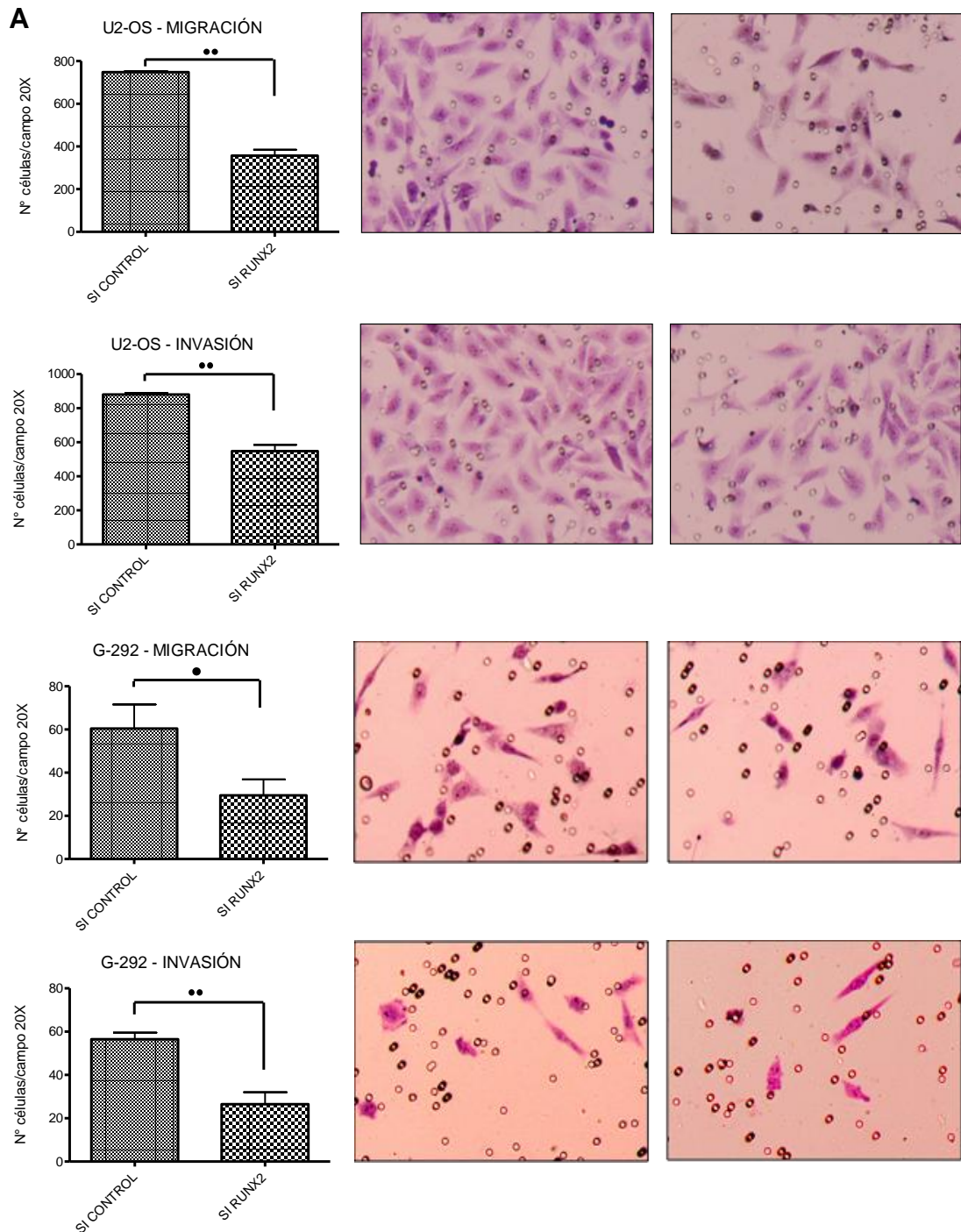
Así, el tratamiento con siRNA-Runx2 en U2-OS y G-292 indujo una disminución de un 37% y 53% en la capacidad de invasión, respectivamente. De igual forma, este tratamiento con siRNA provocó una disminución de un 52%

y 51% en la capacidad de migración, respectivamente, en dichas líneas celulares de OS (Figura 27A-B).



**Figura 26. Efecto del silenciamiento de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.**

70.000 células de la línea SaOS-2 (A) y 30.000 de 143B (B) fueron transfectadas con siRunx2 o siControl y estimuladas a migrar a través de membrana PET sin matrigel del IC por 16h o estimuladas a invadir membrana PET cubierta por matrigel del IM por 22 horas. El número de células capaces de migrar o invadir se determinó por conteo directo bajo microscopio óptico. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*\*,  $p < 0,01$  y \*\*\*,  $p < 0,001$ .



**Figura 27. Efecto del silenciamiento de Runx2 en la migración e invasión de células de OS.**

70.000 células de la línea U2-OS y 40.000 de G-292 fueron transfectadas con siRunx2 o siControl y estimuladas a migrar a través de membrana PET sin matrigel del IC por 16h o estimuladas a invadir membrana PET cubierta por matrigel del IM por 22 horas. El número de células capaces de migrar o invadir se determinó por conteo directo bajo microscopio óptico. Las barras muestran datos (promedio  $\pm$  SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como \*,  $p < 0,05$  y \*\*,  $p < 0,01$ .



## DISCUSIÓN

### ***Vía Wnt/ $\beta$ -catenina regula la expresión de Runx2***

La vía Wnt-canónica regula positivamente la expresión de Runx2 durante la diferenciación osteogénica ya que el promotor de Runx2 posee secuencias consenso para factores de transcripción de la familia TCF/LEF. Por esto, nos propusimos estudiar si en osteosarcoma niveles de Runx2 son modulados por la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

Al respecto, existe controversia sobre la actividad de la vía Wnt-canónica en OS. La mayoría de la literatura concuerda que en osteosarcoma, al igual que en otros cánceres, la vía Wnt-canónica esta sobreactivada y se ha establecido que la inhibición de ésta, mediante sobreexpresión de un dominante negativo del correceptor LRP5 o la sobreexpresión de WIF-1, un inhibidor de la vía Wnt-canónica, disminuyen la capacidad de migración en líneas celulares de OS y la generación de metástasis en modelos murinos[86, 87]. También, el aumento de expresión de DKK1, un antagonista de la vía Wnt-canónica, reduce la capacidad de migración e invasión *in vitro*[70]. Complementariamente tanto LRP5 como DKK1 han sido utilizados como marcadores pronósticos en OS. La presencia de LRP5 en pacientes con OS se correlaciona positivamente con la presencia de metástasis y determina una tendencia negativa de sobrevida libre de enfermedad[68]. Por otro lado, niveles de DKK1 se encuentran elevados en plasma de pacientes con OS y en biopsias tumorales y su presencia en la periferia de tumores favorecería la expansión tumoral mediante la inhibición de la reparación ósea[70]. Sin embargo, una publicación reciente de Cai[88] demuestra que la localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo está ausente en el 90% de biopsias de OS, mientras

que una fuerte tinción nuclear para  $\beta$ -catenina está presente en todos los osteomas, un tumor óseo benigno. Sobreactivación de la vía Wnt con GIN, un potente inhibidor de GSK3 $\beta$ , genera translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo, aumenta la actividad luciferasa y aumento los niveles de mensajero de genes blancos[88]. No obstante estas discordancias sobre el grado de activación de la vía Wnt, el silenciamiento de  $\beta$ -catenina, proteína eje de la vía, mediante siRNA disminuye migración e invasividad *in vitro* en línea U2-OS de OS[89]. Así, parece que el grado de actividad de la vía Wnt-canónica podría estar asociada al OS de alto grado.

Interesantemente, en esta tesis se mostró que la activación de la vía Wnt-canónica por inhibición de la GSK3 $\beta$  puede modular la expresión de Runx2. Los resultados obtenidos indican que la activación de vía Wnt-canónica mediante el tratamiento con SB216763 indujo un aumento del mensajero de Runx2 en 5 de 6 líneas de OS (SaOS-2, MG-63, HOS, G-292 y 143B) (Figura 18), aunque sólo en las líneas celulares HOS, G292 y 143B (Figura 20) se observó un aumento consistente en los niveles de proteína para  $\beta$ -catenina y Runx2 isoforma MASNS. Esto sugiere que no en todas las líneas de OS la expresión de Runx2 es controlada por la vía Wnt-canónica. El hecho anterior correlaciona con que solo HOS, G-292 y 143B presentaron una capacidad de migración mayor a la mostrada por la línea celular control hFOB (Figura 21). Por otro lado, con los datos obtenidos en esta tesis es difícil establecer una relación entre la regulación de la expresión de Runx2 a través de la vía Wnt-canónica en OS y la capacidad de invasión. Así, futuros estudios y diseños experimentales deben ser realizados para poder establecer el verdadero rol de

Runx2 como efector de la vía Wnt-canónica en parámetros de progresión tumoral y metástasis en OS.

***Elevados niveles del factor de transcripción Runx2 en líneas celulares de Osteosarcoma se correlacionan con una mayor capacidad de migración e invasión.***

Durante el desarrollo del linaje óseo, Runx2 se expresa tempranamente y en bajos niveles en preosteoblastos activamente proliferativos, luego su expresión aumenta durante el proceso de diferenciación osteogénica para finalmente decaer en osteoblastos maduros y en osteocitos.

Dentro de la etiología del OS, se sabe que existe una disrupción de la diferenciación terminal de los osteoblastos[32], así las líneas de osteosarcoma más diferenciadas expresan marcadores de diferenciación tempranos como fosfatasa alcalina o tardíos como OPN, OC y BSP, mientras que las menos diferenciadas expresan menos o no expresan marcadores de diferenciación. Definido esto, SaOS-2 fue la línea que expresó los niveles más elevados de mensajero para fosfatasa alcalina y el factor de transcripción Runx2, por lo que es la más diferenciada. Las restante líneas de OS conformaron un segundo grupo que presentaron muy bajos niveles de AP y no presentaron mayores diferencias en cuanto a la expresión de mensajero de OC, es decir un grupo menos diferenciado que SaOS-2.

Runx2 presenta dos isoformas principales que difieren únicamente en su secuencia amino terminal, la isoforma tipo II o MASNS y la isoforma tipo I o MRIPV. La isoforma tipo II MASNS posee una mayor capacidad de transactivación que la isoforma I, es controlada por el promotor P1, se expresa

en bajos niveles en pre-osteoblastos, su expresión es regulada positivamente por BMPs y aumenta radicalmente su expresión durante la diferenciación osteoblástica. Al contrario, la isoforma tipo I MRIPV es controlada por el promotor P2, posee menor poder de transactivación que MASNS, se expresa en bajos niveles en preosteoblastos y su expresión no se altera durante la diferenciación osteoblástica [85, 90].

Al determinar la expresión de proteína Runx2 mediante western blot, observamos dos bandas bien diferenciadas, una banda superior que correspondería a la isoforma MRIPV y una banda inferior que migra más rápido y que correspondería a la isoforma MASNS. Al analizar por separado la expresión de ambas bandas, en las seis líneas celulares de OS, no obtuvimos diferencias significativas en los niveles de la isoforma MRIPV. Sin embargo, los niveles de la isoforma MASNS se expresaron en forma variable en las líneas celulares de OS y se correlacionaron con el potencial metastásico. Expresión de dos bandas bien diferenciadas fue concordante con lo reportado previamente por Thomas[32] y Shapavalov[91].

Así, SaOS-2 expresó los mayores niveles de esta isoforma y también presentó la mayor capacidad de invasión. Las líneas celulares HOS, G-292 y 143B presentaron niveles intermedios de la isoforma MASNS, siendo 143B y G-292 las líneas que mostraron una alta y mediana capacidad de invasión. En el caso de HOS, que presentó niveles medios de Runx2, esta no tuvo una capacidad de invasión mayor a la mostrada por la línea celular control (hFOB), siendo más bien similar a la capacidad mostrada por MG-63 y U2-OS, líneas celulares de OS que presentaron bajos niveles de Runx2. Así, lo observado en

HOS puede ser explicado en parte por el hecho que la localización subcelular de este factor fue principalmente citoplasmática y no nuclear.

Para una mejor comprensión del rol de cada isoforma de Runx2 en OS sería interesante evaluar niveles de expresión de proteína utilizando anticuerpos específicos para cada isoforma como los desarrollados por Sudhakar[85]. Además, sobreexpresión y silenciamiento de las distintas isoformas nos permitiría establecer con mayor claridad el rol de Runx2 sobre parámetros de migración e invasión en OS.

### ***Efecto antiproliferativo y pro-tumoral de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma***

El rol del factor de transcripción Runx2 sobre proliferación celular ha sido bien establecido en osteoblastos por Pratap y Galindo[30] mediante la sobreexpresión de Runx2 en osteoblastos derivados de cráneo de ratón KO para Runx2 o con deleciones en su dominio de transactivación, demostrando que este factor de transcripción tiene efecto antiproliferativo. Por otro lado, Shapovalov[91] sugiere un efecto antiproliferativo de Runx2 en líneas de OS. Además, la sobreexpresión de Runx2 antagoniza el crecimiento tumoral inducido por BMPs en un modelo ortotópico de rata inyectada intratibialmente con células MG-63[46]. Runx2 también regula positivamente genes como bcl-2 y survivina por lo que además tendría un rol antiapoptótico.

De acuerdo a resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en células de OS, los niveles de Runx2 están desregulados durante el ciclo celular, siendo expresado de forma constitutiva, por lo que se ha sugerido un rol fundamental de Runx2 en la patogénesis del OS. Adicionalmente, en cáncer

de próstata y de mama, se ha descrito el rol fundamental de Runx2 en metástasis[34, 41].

Al parecer, en la etiología del OS de alto grado, es necesario mantener un nivel adecuado de Runx2 con el fin de estimular la progresión tumoral sin que esto produzca una disminución de la capacidad proliferativa, a menos que el defecto en algunos genes asociados a control de ciclo celular estén también afectados. Así, el efecto antiproliferativo de Runx2 en las distintas líneas de osteosarcoma podría depender del estatus de expresión de genes supresores de tumores como p53 y Rb, así como del nivel de expresión observada para este factor transcripcional.

Mutaciones inactivantes de p53 ocurren en el 50% de los cánceres[92] y alteraciones de los genes que interactúan con p53 como HDM2 y p14ARF generan inactivación funcional en el 80% de los cánceres[93]. En osteosarcoma p53 está deletado o mutado en más del 50% de las líneas celulares[94]. Niveles de p53 son regulados por MDM2, un gen inducible por p53 y que se encuentra alterado en el 10% de los OS[95]. También Rb juega un rol importante en la etiología del OS, es un regulador clave en la transición G<sub>1</sub>/S, en su estado hipofosforilado actúa como tumor supresor uniéndose e inactivando a E2F, resultando en un arresto del ciclo celular[96]. Aproximadamente 70% de los OS tiene alteraciones en el locus de Rb[97] y mutaciones en Rb han sido implicados como indicador de mal pronóstico en OS[98]. Forma hipofosforilada de Rb interactúa con Runx2 para crear una retroalimentación positiva que promueve la salida del ciclo celular y la formación de fenotipo osteoblástico diferenciado. Estudios recientes con ratones KO inducidos para p53 y Rb indican que la pérdida de p53 es suficiente

para generar OS, no así la pérdida de Rb, por lo que mutaciones en p53 serían más importantes que mutaciones en Rb para la generación de OS, aunque sinergismo entre mutaciones de p53 y Rb favorecen aún más el desarrollo de OS[99]. Además, Rb controla destino celular y compromiso de linaje en osteoblastogénesis, así mutaciones o deleciones en Rb podrían generar desdiferenciación y en sinergia con otras mutaciones promover tumorigénesis[100].

De las 6 líneas de OS utilizadas en esta tesis, solo MG-63 y U2-OS no presentan alteraciones en el gen de p53 (Tabla Suplementaria I). Así, SaOS-2 y 143B tienen el gen deletado, mientras que HOS y G-292 presentan mutaciones inactivantes. Además, las líneas de OS SaOS-2 y U2-OS tienen deletado el gen de Rb mientras que las restantes cuatro líneas expresan normalmente esta proteína. MG-63 y U2-OS, las únicas que expresan p53, son líneas celulares que exhiben uno de los más bajos potenciales de migración, invasión y metástasis. Interesantemente, MG-63, que tampoco expresa Rb, presentó el menor nivel de expresión de Runx2, lo que da cuenta de la importancia de p53 y Rb como genes supresores de tumores y su posible rol funcional asociada al efecto antiproliferativo de Runx2, efecto que podría ser evitado manteniendo bajos niveles de este factor. En el otro extremo, SaOS-2 mostró una elevada expresión de Runx2 y ausencia de expresión de p53 y Rb. Esto refuerza el hecho de que SaOS-2 sea una línea celular que presenta alto potencial de migración, invasión y metástasis y que estos parámetros se relacionan con elevados niveles de expresión de Runx2 en un contexto de genes mutados tales como p53 y Rb.

Así, mutaciones en p53 y Rb en OS producen una pérdida de la capacidad de diferenciación terminal, resistencia a apoptosis, disrupción en los mecanismos de reparación de DNA, retención del fenotipo proliferativo de las células precursoras mesenquimáticas y capacidad de respuesta frente a factores de crecimiento. En este contexto, el factor de transcripción Runx2 actuaría como un gen relacionado a cáncer, favoreciendo la regulación positiva de genes involucrados en degradación de la matriz extracelular, quimiotaxis, invasión y angiogénesis, promoviendo progresión tumoral y el desarrollo de metástasis.

Nuestros datos sugieren que habría una relación más sinérgica entre la ausencia de p53 y la expresión de Runx2 que entre Rb y Runx2, relacionadas al efecto antiproliferativo ejercido por este factor en OS. Así, las líneas celulares HOS, G292 y 143B que no expresan p53, pero si Rb, presentaron mayores niveles de Runx2; mientras que la línea U2-OS que no expresa Rb, pero si p53, presentó menores niveles de Runx2. En progresión tumoral y metástasis podría ocurrir una asociación funcional similar, ya que HOS, G292 y 143B presentaron mayor potencial de migración y G292 y 143B mayores potenciales de invasión y metástasis, en comparación a U2-OS.

### ***Runx2 promueve migración e invasión en osteosarcoma.***

La capacidad de Runx2 de promover migración, invasión y generación de metástasis está bien documentada en cáncer de mama y próstata, sin embargo se desconoce el rol de Runx2 en la generación de metástasis en osteosarcoma. Estudios recientes de nuestro grupo, indican que a diferencia de lo que ocurre en los osteoblastos normales, en las líneas celulares de



osteosarcoma los niveles de Runx2 no son regulados durante el ciclo celular y se encuentran elevados[101]. En muestras de osteosarcoma humano, se ha determinado que los mayores niveles proteicos de Runx2 son un factor predictor de metástasis[38]. Una serie de antecedentes que vinculan a Runx2 con progresión tumoral apuntan a la importancia de algunos genes blancos regulados por Runx2, resaltando entre ellos los que codifican para las MMPs, OPN y VEGF. En líneas celulares de OS, la expresión de MMP13 es necesaria para la formación del invadopodio y para la capacidad de invasión celular[102]. In vivo, hay antecedentes que relacionan la expresión de MMP13 con crecimiento tumoral en OS[103]. Elevada expresión de VEGF en modelo murino de OS se correlaciona con rápido crecimiento tumoral y desarrollo precoz de metástasis pulmonares[83]. OPN, otro gen regulado por Runx2, se encuentra elevado en muestras de tejido tumoral en pacientes con OS[104], y su silenciamiento con RNA antisentido reduce la tumorigenicidad de células OS-732 transplantadas en ratones desnudos[105]. Retomando el rol de Runx2 en progresión tumoral en OS, modelos ortotópicos murinos de OS muestran que el aumento en la expresión de Runx2 en células 143B inyectadas en tibia de ratones atímicos tratados con bortezomib, disminuye la capacidad de proliferación celular reflejado en disminución del volumen tumoral[91]. Resultados similares fueron obtenidos por Luo[46] en ratones atímicos inyectados con células MG-63 en los cuales sobreexpresión de Runx2 revierte crecimiento tumoral inducido por BMPs. Sin embargo en ambos estudios no se determina el efecto de Runx2 sobre la generación de metástasis. Tampoco se ha demostrado el rol de Runx2 en procesos de migración e invasión in vitro. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de Runx2 en líneas

celulares de OS con baja expresión de Runx2 aumenta la capacidad de migración e invasión in vitro y que su silenciamiento mediante siRNA genera el efecto opuesto, es decir disminución de la migración e invasión. Así demostramos por primera que Runx2 promueve migración e invasión en OS.

La línea 143B fue la única de las líneas de OS analizadas que no modificó su capacidad de migración e invasión frente al aumento o disminución de la expresión de Runx2 mediada por AdV y siRNA respectivamente. Este efecto puede deberse a que esta es una línea derivada de TE-85 transformada con mutaciones Ki-ras[106]. Mutaciones Ki-ras pueden estar asociadas con fenotipos agresivos en muchos tipos de cáncer[107-109], sin embargo mutaciones ras son inusuales en OS[110]. Sería interesante determinar si la transformación Ki-ras es la responsable del elevado potencial metastásico observado en 143B. Interesantemente, RKIP (proteína que interactúa con Raf kinasa), un inhibidor de la señalización ras, ha demostrado actuar como supresor de metástasis en cáncer de próstata[111]. Sobreexpresión de RKIP en 143B luce como una alternativa factible para determinar si el fenotipo agresivo de esta línea responde a Ki-ras, lo que explicaría en parte la falta de respuesta de esta línea a la modulación de Runx2 sobre parámetros de progresión tumoral.

El próximo paso dentro de las perspectivas futuras de esta línea de investigación es determinar el rol fundamental de Runx2 en promover progresión tumoral en modelos murinos in vivo e identificar los genes blancos de Runx2 relacionados a progresión tumoral y metástasis.

## CONCLUSIONES

- Elevados niveles del factor de transcripción Runx2 en líneas celulares de OS se correlacionaron con mayor capacidad de migración e invasión.
- Elevados niveles de componentes de la vía Wnt-canónica en líneas celulares de OS se correlacionaron con mayor capacidad de migración e invasión
- Líneas celulares de OS con bajos niveles de Runx2 y componentes de vía Wnt-canónica presentaron casi nula capacidad de migración e invasión
- Activación de la vía Wnt-canónica moduló diferencialmente la expresión de Runx2 en líneas celulares de OS.
- Sobreexpresión de Runx2 aumentó la capacidad de migración e invasión en líneas celulares de OS con bajos niveles de Runx2.
- Silenciamiento de Runx2 disminuyó la capacidad de migración e invasión en líneas celulares de OS.
- Por último, demostramos por primera vez que Runx2 promueve progresión tumoral en líneas celulares de OS.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla I. Estatus de genes de p53 y Rb**

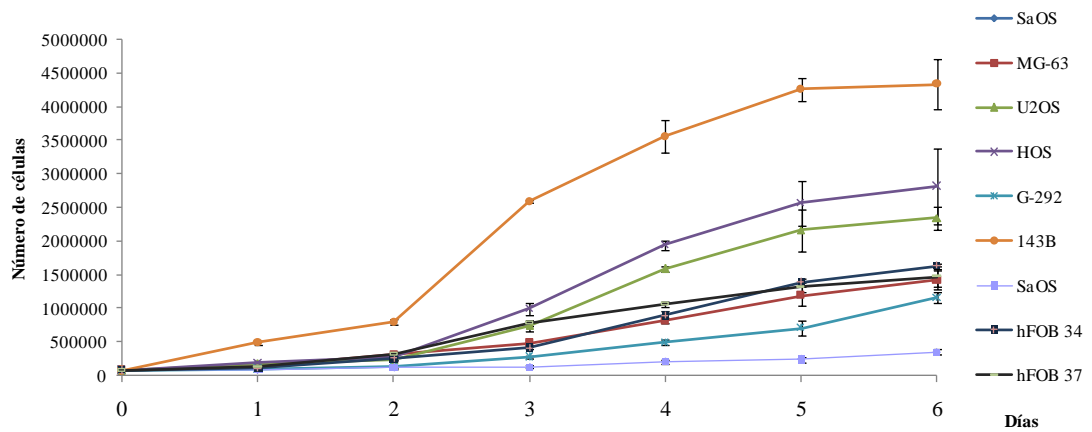
Tabla resumen con estatus de genes p53 y Rb en 6 líneas celulares de osteosarcoma y hFOB.

	SaOS-2	MG-63	U2-OS	HOS	G-292	143B	hFOB
<b>p53</b>	deletado	wt	wt	mutante, exon 5, cgc-ccc	mutante exon 8, gtt- att	deletado	wt
<b>Rb</b>	deletado	wt	deletado	wt	wt	wt	wt

**Tabla II. Ensayo de metástasis pulmonares con líneas celulares de OS en ratones NOD-SCID.** Ratones NOD-SCID de 8-10 semanas fueron inyectados en la vena de la cola con  $1 \times 10^6$  células de las seis líneas celulares de OS o PBS como control. Fueron mantenidos en bioterio de alta seguridad libre de patógenos y posteriormente sacrificados en un rango de 3 a 13 semanas post-inyección de acuerdo a antecedentes bibliográficos o deterioro en la salud del ratón. Se cuantificaron las metástasis macroscópicas bajo lupa. Las líneas son presentadas en un orden de menor a mayor incidencia de metástasis pulmonares.

Línea	N Ratones	Semana Sacrificio post-inoculación	Metástasis Pulmonares	Rango Metástasis	Promedio Metástasis
Control	3	12	0/3	0	0
MG-63	3	12	1/3	0-4	1,33
HOS	3	7-13	2/3	0-6	2,67
U2-OS	3	8-12	2/3	0-10	3,33
G-292	3	13	3/3	1-9	4,33
SaOS-2	3	13	3/3	18-79	43,66
143B	6	3-4	6/6	15 - >100	64

## Curva de Crecimiento



**Figura I. Curva de crecimiento en líneas celulares de osteosarcoma y línea de control hFOB.**

80.000 células de las seis líneas de OS y la línea de control hFOB fueron sembradas en placas de 100 mm y cultivadas hasta por 6 días en medio adecuado a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. hFOB fue cultivada a 34° y 37°C. Se realizó conteo celular cada 24 horas bajo microscopio con cámara de Neubauer. Se grafica promedio  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyanyan H, Im HJ, Choi JY, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ: **The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(21):20274-20285.
2. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA: **Regulation of bone mass by Wnt signaling.** *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(5):1202-1209.
3. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC: **Osteosarcoma development and stem cell differentiation.** *Clinical orthopaedics and related research* 2008, **466**(9):2114-2130.
4. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA: **Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program.** *Cancer* 2009, **115**(7):1531-1543.
5. Cotterill SJ, Wright CM, Pearce MS, Craft AW: **Stature of young people with malignant bone tumors.** *Pediatric blood & cancer* 2004, **42**(1):59-63.
6. Miller RW BJJ: **Bone cancer.** In:Schottenfeld DFJ, editor(s).Oxford. *Oxford University Press* 1996:p.971-983.
7. Marcove RC, Mike V, Hajek JV, Levin AG, Hutter RV: **Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one. A review of one hundred and forty-five operative cases.** *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1970, **52**(3):411-423.
8. Schajowicz F, Sissons HA, Sobin LH: **The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition.** *Cancer* 1995, **75**(5):1208-1214.
9. Bacci G, Ferrari S, Mercuri M, Longhi A, Capanna R, Tienghi A, Brach del Prever A, Comandone A, Cesari M, Bernini G *et al*: **Neoadjuvant chemotherapy for extremity osteosarcoma--preliminary results of the Rizzoli's 4th study.** *Acta Oncol* 1998, **37**(1):41-48.
10. Fuchs N, Bielack SS, Epler D, Bieling P, Delling G, Korholz D, Graf N, Heise U, Jurgens H, Kotz R *et al*: **Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 1998, **9**(8):893-899.
11. Quintana J: **Manejo del Osteosarcoma en Chile. Cáncer Infantil en Chile.** *División de la Salud de las Personas Departamento Programa de las Personas* 1999, **OMS, Programa de Control de Cáncer, Republica de Chile. Ministerio de Salud.**

12. Rivera GK, Quintana J, Villarroel M, Santana VM, Rodriguez-Galindo C, Neel MD, Velez G, Ribeiro RC, Daw NC: **Transfer of complex frontline anticancer therapy to a developing country: the St. Jude osteosarcoma experience in Chile.** *Pediatric blood & cancer* 2008, **50**(6):1143-1146.
13. Ferrari S, Briccoli A, Mercuri M, Bertoni F, Picci P, Tienghi A, Del Prever AB, Fagioli F, Comandone A, Bacci G: **Postrelapse survival in osteosarcoma of the extremities: prognostic factors for long-term survival.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, **21**(4):710-715.
14. Westendorf JJ, Hiebert SW: **Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia.** *Journal of cellular biochemistry* 1999, **Suppl 32-33**:51-58.
15. Speck NA, Terry S: **A new transcription factor family associated with human leukemias.** *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 1995, **5**(3-4):337-364.
16. Lee K-S, Kim H-J, Li Q-L, Chi X-Z, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim E-G, Choi J-Y, Ryoo H-M *et al*: **Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor beta 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(23):8783-8792.
17. Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB *et al*: **Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription.** *Journal of cell science* 2000, **113 ( Pt 12)**:2221-2231.
18. Nuthall HN, Joachim K, Palaparti A, Stifani S: **A role for cell cycle-regulated phosphorylation in Groucho-mediated transcriptional repression.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(52):51049-51057.
19. Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, Hinds PW: **The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation.** *Molecular cell* 2001, **8**(2):303-316.
20. Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT: **MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(6):4453-4459.
21. Yousfi M, Lasmoles F, Marie PJ: **TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts.** *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **297**(3):641-644.
22. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Choi JY, Pratap J, Zaidi SK: **Temporal and spatial parameters of skeletal gene expression: targeting**

**RUNX factors and their coregulatory proteins to subnuclear domains.**  
*Connective tissue research* 2003, **44 Suppl 1**:149-153.

23. Zaidi SK, Sullivan AJ, Medina R, Ito Y, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS: **Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription.** *The EMBO journal* 2004, **23**(4):790-799.
24. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS: **Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors.** *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2004, **14**(1-2):1-41.
25. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: **Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.** *Cell* 1997, **89**(5):747-754.
26. Lengner CJ, Drissi H, Choi JY, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB: **Activation of the bone-related Runx2/Cbfa1 promoter in mesenchymal condensations and developing chondrocytes of the axial skeleton.** *Mechanisms of development* 2002, **114**(1-2):167-170.
27. Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, Rosen V, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS *et al*: **Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation.** *Journal of cellular biochemistry* 1999, **73**(1):114-125.
28. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM *et al*: **Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.** *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(23):8783-8792.
29. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL: **Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1999, **14**(9):1522-1535.
30. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB *et al*: **Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts.** *Cancer research* 2003, **63**(17):5357-5362.
31. Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH, Yang X, Xie R, Javed A, Underwood JM *et al*: **Mitotic occupancy and lineage-specific**



- transcriptional control of rRNA genes by Runx2.** *Nature* 2007, **445**(7126):442-446.
32. Thomas DM, Johnson SA, Sims NA, Trivett MK, Slavin JL, Rubin BP, Waring P, McArthur GA, Walkley CR, Holloway AJ *et al*: **Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma.** *The Journal of cell biology* 2004, **167**(5):925-934.
  33. Blyth K, Cameron ER, Neil JC: **The RUNX genes: gain or loss of function in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(5):376-387.
  34. Pratap J, Lian JB, Javed A, Barnes GL, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS: **Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone.** *Cancer metastasis reviews* 2006, **25**(4):589-600.
  35. Blyth K, Terry A, Mackay N, Vaillant F, Bell M, Cameron ER, Neil JC, Stewart M: **Runx2: a novel oncogenic effector revealed by in vivo complementation and retroviral tagging.** *Oncogene* 2001, **20**(3):295-302.
  36. Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K: **Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha.** *Virology* 1993, **194**(1):314-331.
  37. Stewart M, Terry A, Hu M, O'Hara M, Blyth K, Baxter E, Cameron E, Onions DE, Neil JC: **Proviral insertions induce the expression of bone-specific isoforms of PEBP2alphaA (CBFA1): evidence for a new myc collaborating oncogene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(16):8646-8651.
  38. Won KY, Park HR, Park YK: **Prognostic implication of immunohistochemical Runx2 expression in osteosarcoma.** *Tumori* 2009, **95**(3):311-316.
  39. Lu XY, Lu Y, Zhao YJ, Jaeweon K, Kang J, Xiao-Nan L, Ge G, Meyer R, Perlaky L, Hicks J *et al*: **Cell cycle regulator gene CDC5L, a potential target for 6p12-p21 amplicon in osteosarcoma.** *Molecular cancer research : MCR* 2008, **6**(6):937-946.
  40. Nathan SS, Pereira BP, Zhou YF, Gupta A, Dombrowski C, Soong R, Pho RW, Stein GS, Salto-Tellez M, Cool SM *et al*: **Elevated expression of Runx2 as a key parameter in the etiology of osteosarcoma.** *Molecular biology reports* 2009, **36**(1):153-158.
  41. Javed A, Barnes GL, Pratap J, Antkowiak T, Gerstenfeld LC, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS: **Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(5):1454-1459.
  42. Kayed H, Jiang X, Keleg S, Jesnowski R, Giese T, Berger MR, Esposito I, Lohr M, Friess H, Kleeff J: **Regulation and functional role of the Runt-related**

- transcription factor-2 in pancreatic cancer.** *British journal of cancer* 2007, **97**(8):1106-1115.
43. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB: **The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(19):8581-8591.
  44. Mehrotra M, Saegusa M, Voznesensky O, Pilbeam C: **Role of Cbfa1/Runx2 in the fluid shear stress induction of COX-2 in osteoblasts.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **341**(4):1225-1230.
  45. Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB *et al*: **Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells.** *Cancer research* 2003, **63**(10):2631-2637.
  46. Luo X, Chen J, Song WX, Tang N, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, He G, Bi Y, He BC *et al*: **Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2008, **88**(12):1264-1277.
  47. Katoh M: **WNT signaling pathway and stem cell signaling network.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(14):4042-4045.
  48. Widelitz R: **Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress.** *Growth Factors* 2005, **23**(2):111-116.
  49. Polakis P: **Wnt signaling and cancer.** *Genes & development* 2000, **14**(15):1837-1851.
  50. El-Tanani M, Barraclough R, Wilkinson MC, Rudland PS: **Metastasis-inducing dna regulates the expression of the osteopontin gene by binding the transcription factor Tcf-4.** *Cancer research* 2001, **61**(14):5619-5629.
  51. Krysan K, Merchant FH, Zhu L, Dohadwala M, Luo J, Lin Y, Heuze-Vourc'h N, Pold M, Seligson D, Chia D *et al*: **COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer.** *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, **18**(1):206-208.
  52. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC: **Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer.** *Lancet* 2003, **362**(9379):205-209.
  53. Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, Leyton L, Quest AF: **Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(41):15079-15084.

54. Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Parraga M, Lisboa P, Montoya M, Leyton L, Quest AF: **Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin.** *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 9):1812-1823.
55. Suda T, Arai F: **Wnt signaling in the niche.** *Cell* 2008, **132**(5):729-730.
56. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
57. Reya T, Clevers H: **Wnt signalling in stem cells and cancer.** *Nature* 2005, **434**(7035):843-850.
58. Kugimiya F, Kawaguchi H, Ohba S, Kawamura N, Hirata M, Chikuda H, Azuma Y, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI: **GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity.** *PloS one* 2007, **2**(9):e837.
59. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA: **Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(19):14515-14524.
60. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA: **Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(9):3324-3329.
61. Rodda SJ, McMahon AP: **Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors.** *Development* 2006, **133**(16):3231-3244.
62. Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R: **Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation.** *Journal of cellular biochemistry* 2005, **94**(2):403-418.
63. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS *et al*: **Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(39):33132-33140.
64. Kahler RA, Galindo M, Lian J, Stein GS, van Wijnen AJ, Westendorf JJ: **Lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) inhibits terminal differentiation of osteoblasts.** *Journal of cellular biochemistry* 2006, **97**(5):969-983.
65. Kahler RA, Westendorf JJ: **Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(14):11937-11944.
66. Galindo M, Kahler RA, Teplyuk NM, Stein JL, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ, van Wijnen AJ: **Cell cycle related modulations in Runx2 protein levels are**

- independent of lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) in proliferating osteoblasts.** *Journal of molecular histology* 2007, **38**(5):501-506.
67. Chen K, Fallen S, Abaan HO, Hayran M, Gonzalez C, Wodajo F, MacDonald T, Toretsky JA, Uren A: **Wnt10b induces chemotaxis of osteosarcoma and correlates with reduced survival.** *Pediatric blood & cancer* 2008, **51**(3):349-355.
68. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Sowers R, Mazza B, Yang R, Huvos AG, Meyers PA, Gorlick R: **Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004, **109**(1):106-111.
69. Guo Y, Zi X, Koontz Z, Kim A, Xie J, Gorlick R, Holcombe RF, Hoang BH: **Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2007, **25**(7):964-971.
70. Lee N, Smolarz AJ, Olson S, David O, Reiser J, Kutner R, Daw NC, Prockop DJ, Horwitz EM, Gregory CA: **A potential role for Dkk-1 in the pathogenesis of osteosarcoma predicts novel diagnostic and treatment strategies.** *British journal of cancer* 2007, **97**(11):1552-1559.
71. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA, Gorlick R: **Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway.** *Cancer research* 2004, **64**(8):2734-2739.
72. Kimura K, Nakano T, Park YB, Tani M, Tsuda H, Beppu Y, Moriya H, Yokota J: **Establishment of human osteosarcoma cell lines with high metastatic potential to lungs and their utilities for therapeutic studies on metastatic osteosarcoma.** *Clinical & experimental metastasis* 2002, **19**(6):477-485.
73. Dass CR, Ek ET, Contreras KG, Choong PF: **A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma.** *Clinical & experimental metastasis* 2006, **23**(7-8):367-380.
74. Dass CR, Choong PF: **Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model.** *Molecular cancer therapeutics* 2007, **6**(12 Pt 1):3263-3270.
75. Yuan J, Ossendorf C, Szatkowski JP, Bronk JT, Maran A, Yaszemski M, Bolander ME, Sarkar G, Fuchs B: **Osteoblastic and osteolytic human osteosarcomas can be studied with a new xenograft mouse model producing spontaneous metastases.** *Cancer investigation* 2009, **27**(4):435-442.
76. Jia SF, Worth LL, Kleinerman ES: **A nude mouse model of human osteosarcoma lung metastases for evaluating new therapeutic strategies.** *Clinical & experimental metastasis* 1999, **17**(6):501-506.

77. Su Y, Luo X, He BC, Wang Y, Chen L, Zuo GW, Liu B, Bi Y, Huang J, Zhu GH *et al*: **Establishment and characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line.** *Clinical & experimental metastasis* 2009, **26**(7):599-610.
78. Manara MC, Baldini N, Serra M, Lollini PL, De Giovanni C, Vaccari M, Argnani A, Benini S, Maurici D, Picci P *et al*: **Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene.** *Bone* 2000, **26**(3):215-220.
79. Scotlandi K, Serra M, Nicoletti G, Vaccari M, Manara MC, Nini G, Landuzzi L, Colacci A, Bacci G, Bertoni F *et al*: **Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma.** *Cancer research* 1996, **56**(10):2434-2439.
80. Arnstein P, Taylor DO, Nelson-Rees WA, Huebner RJ, Lennette EH: **Propagation of human tumors in antithymocyte serum-treated mice.** *Journal of the National Cancer Institute* 1974, **52**(1):71-84.
81. McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, Fidler IJ, Bar-Eli M: **Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002, **8**(11):3584-3591.
82. Luu HH, Kang Q, Park JK, Si W, Luo Q, Jiang W, Yin H, Montag AG, Simon MA, Peabody TD *et al*: **An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis.** *Clinical & experimental metastasis* 2005, **22**(4):319-329.
83. Yang SY, Yu H, Krygier JE, Wooley PH, Mott MP: **High VEGF with rapid growth and early metastasis in a mouse osteosarcoma model.** *Sarcoma* 2007, **2007**:95628.
84. Kim EM, Sivanandham M, Stavropoulos CI, Wallack MK: **Adjuvant effect of a Flt3 ligand (FL) gene-transduced xenogeneic cell line in a murine colon cancer model.** *The Journal of surgical research* 2002, **108**(1):148-156.
85. Sudhakar S, Katz MS, Elango N: **Analysis of type-I and type-II RUNX2 protein expression in osteoblasts.** *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **286**(1):74-79.
86. Guo Y, Rubin EM, Xie J, Zi X, Hoang BH: **Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma in an animal model.** *Clinical orthopaedics and related research* 2008, **466**(9):2039-2045.
87. Rubin EM, Guo Y, Tu K, Xie J, Zi X, Hoang BH: **Wnt inhibitory factor 1 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma.** *Molecular cancer therapeutics* 2010, **9**(3):731-741.
88. Cai Y, Mohseny AB, Karperien M, Hogendoorn PC, Zhou G, Cleton-Jansen AM: **Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma.** *The Journal of pathology* 2010, **220**(1):24-33.

89. Zhang F, Chen A, Chen J, Yu T, Guo F: **Influence of beta-catenin small interfering RNA on human osteosarcoma cells.** *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* 2011, **31**(3):353-358.
90. Stock M, Otto F: **Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers.** *Journal of cellular biochemistry* 2005, **95**(3):506-517.
91. Shapovalov Y, Benavidez D, Zuch D, Eliseev RA: **Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **127**(1):67-76.
92. Ta HT, Dass CR, Choong PF, Dunstan DE: **Osteosarcoma treatment: state of the art.** *Cancer metastasis reviews* 2009, **28**(1-2):247-263.
93. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B: **Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas.** *Nature* 1992, **358**(6381):80-83.
94. Clark JC, Dass CR, Choong PF: **A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2008, **134**(3):281-297.
95. Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M: **p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate.** *Cancer* 1997, **79**(8):1541-1547.
96. Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L: **Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control.** *Journal of cellular physiology* 1997, **173**(2):233-236.
97. Araki N, Uchida A, Kimura T, Yoshikawa H, Aoki Y, Ueda T, Takai S, Miki T, Ono K: **Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors.** *Clinical orthopaedics and related research* 1991(270):271-277.
98. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R: **Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma.** *The oncologist* 2004, **9**(4):422-441.
99. Berman SD, Calo E, Landman AS, Danielian PS, Miller ES, West JC, Fonhoue BD, Caron A, Bronson R, Bouxsein ML *et al*: **Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(33):11851-11856.
100. Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA: **Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo.** *Nature* 2010, **466**(7310):1110-1114.

101. San Martin IA, Varela N, Gaete M, Villegas K, Osorio M, Tapia JC, Antonelli M, Mancilla EE, Pereira BP, Nathan SS *et al*: **Impaired cell cycle regulation of the osteoblast-related heterodimeric transcription factor Runx2-Cbfbeta in osteosarcoma cells.** *Journal of cellular physiology* 2009, **221**(3):560-571.
102. Enomoto M, Hayakawa S, Itsukushima S, Ren DY, Matsuo M, Tamada K, Oneyama C, Okada M, Takumi T, Nishita M *et al*: **Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling.** *Oncogene* 2009, **28**(36):3197-3208.
103. Ma O, Cai WW, Zender L, Dayaram T, Shen J, Herron AJ, Lowe SW, Man TK, Lau CC, Donehower LA: **MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression.** *Cancer research* 2009, **69**(6):2559-2567.
104. Sadikovic B, Thorner P, Chilton-Macneill S, Martin JW, Cervigne NK, Squire J, Zielenska M: **Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy.** *BMC cancer* 2010, **10**:202.
105. Liu SJ, Zhang DQ, Sui XM, Zhang L, Cai ZW, Sun LQ, Liu YJ, Xue Y, Hu GF: **The inhibition of in vivo tumorigenesis of osteosarcoma (OS)-732 cells by antisense human osteopontin RNA.** *Cellular & molecular biology letters* 2008, **13**(1):11-19.
106. Hensler PJ, Annab LA, Barrett JC, Pereira-Smith OM: **A gene involved in control of human cellular senescence on human chromosome 1q.** *Molecular and cellular biology* 1994, **14**(4):2291-2297.
107. Dai MH, Zhao YP, Cai LX, Zhu Y: **[Combined detection of K-ras mutation and CA 19-9 level in plasma of patients with pancreatic cancer].** *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]* 2003, **41**(5):332-335.
108. Conzelmann M, Linnemann U, Berger MR: **K-ras codon 12 and 13 mutations are correlated with differential patterns of tumor cell dissemination in colorectal cancer patients.** *International journal of oncology* 2004, **24**(6):1537-1544.
109. Okudela K, Hayashi H, Ito T, Yazawa T, Suzuki T, Nakane Y, Sato H, Ishi H, KeQin X, Masuda A *et al*: **K-ras gene mutation enhances motility of immortalized airway cells and lung adenocarcinoma cells via Akt activation: possible contribution to non-invasive expansion of lung adenocarcinoma.** *The American journal of pathology* 2004, **164**(1):91-100.
110. Pompetti F, Rizzo P, Simon RM, Freidlin B, Mew DJ, Pass HI, Picci P, Levine AS, Carbone M: **Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors.** *Journal of cellular biochemistry* 1996, **63**(1):37-50.
111. Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET: **Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis.** *Journal of the National Cancer Institute* 2003, **95**(12):878-889.