

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



“RUNX2 PROMUEVE LA ANGIOGÉNESIS Y LA EXPRESIÓN DE GENES
BLANCO CON FUNCIÓN PRO-ANGIOGÉNICA EN OSTEOSARCOMA”

ANDRÉS STEVENSON SILVA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS, MENCIÓN MORFOLOGÍA

Director de Tesis: PhD. Mario Galindo Díaz

Santiago – Chile
2014

RESUMEN

Runx2 es un factor transcripcional, regulador maestro del desarrollo y de la diferenciación osteoblástica. Regula positiva o negativamente la expresión de diversos genes que participan en la proliferación de precursores pre-osteoblásticos y osteoblásticos, y en la diferenciación de estos. Además, este factor tiene un rol funcional en la progresión tumoral y metástasis asociadas al cáncer de próstata y de mama. Recientemente, la expresión de Runx2 se ha relacionado con el desarrollo de osteosarcoma, tumor óseo altamente agresivo y de mal pronóstico, que actualmente es objetivo de tratamientos como quimioterapia y cirugías que pueden llegar a la amputación de extremidades.

Existe una correlación positiva entre la expresión del factor transcripcional Runx2 y la incidencia de metástasis pulmonares en osteosarcoma. Por otra parte, en distintos tipos tumorales se ha descrito la expresión de genes como; MMPs, VEGF y osteopontina (OPN), asociados a la angiogénesis y progresión tumoral. Interesantemente, la expresión de estos genes es regulada directamente por Runx2 y se expresan normalmente durante la diferenciación osteoblástica en el tejido óseo. Así, existen evidencias que demuestran los efectos angiogénicos de la expresión de VEGF y OPN, tanto en patología no tumoral como tumoral.

La angiogénesis es un mecanismo fundamental en cáncer, favoreciendo la progresión y metástasis, y por lo tanto clave en patología tumoral maligna. En el caso del osteosarcoma, un fenotipo agresivo y de mal pronóstico se asocia con mayor neo-vascularización. En esta tesis, se propone que Runx2 promueve la angiogénesis en osteosarcoma y regula la expresión de genes relacionados a este proceso.

Lo anterior fue llevado a cabo mediante el uso de distintas líneas celulares de osteosarcoma humano. Se analizó la expresión de Runx2 siendo mayor en la línea celular SaOS y mínima en MG63. Las líneas celulares U2OS, HOS y G292 presentaron expresión variable entre SaOS y MG63. En relación a la capacidad angiogénica *in-vitro* esta fue similar a lo anterior, presentando SaOS los mayores niveles y MG63 los menores, y el resto variable entre ambas líneas.

La búsqueda de genes relacionados al proceso de angiogénesis se realizó a partir del análisis de los datos generados en experimentos de *knock in* de Runx2 mediante siRNA y análisis del transcriptoma mediante microarray, en la línea celular SaOS, en combinación con el análisis de una base de datos de CHIP on CHIP para Runx2, en la misma línea celular. Los genes fueron analizados mediante el software DAVID 6.7 (Functional Annotation Bioinformatics Microarray data base), seleccionando a los con función angiogénica y que además codifican para proteínas de secreción. Así se obtuvo un total de 4 genes angiogénicos: Endotelina 1 (END1), Angiogenina (ANG), Colágeno tipo V alfa 1 (COL5A1) e Inductor angiogénico rico en cisteína 61 (CYR61).

La regulación, mediada por Runx2, de genes blanco angiogénicos se estudió mediante la modulación de la expresión de Runx2 en distintas líneas celulares de osteosarcoma, mediante la utilización de vectores adenovirales y siRNA o shRNA y en combinación con ensayos de angiogénesis *in vitro*. Así mediante RT-qPCR se observó que los genes CYR61 y VEGFA aumentaron su expresión en las líneas MG63, U2OS, HOS y G292. Por el contrario al inhibir Runx2 en SaOS, se obtuvo una baja de los niveles de CYR61 y VEGFA. Lo mismo se observó al analizar los niveles de proteína de CYR61 mediante western blot.

Por último el rol funcional de Runx2 sobre el proceso angiogénico se analizó mediante la sobre-expresión de Runx2, observándose un aumento de la capacidad angiogénica de la línea MG63, por el contrario al inhibir Runx2 en SaOS se observó una disminución de la capacidad de angiogénesis por parte de esta línea celular.

Es así como hemos demostrado por primera vez que Runx2 promueve la angiogénesis y CYR61 en osteosarcoma humano.

ABSTRACT

Runx2 is a transcriptional factor, master regulator of osteoblast differentiation and development. Positively or negatively regulate expression of various genes involved in the proliferation of pre-osteoblast and osteoblast precursors, and in the differentiation of these. Moreover, this factor has a functional role in tumor progression and metastases associated with prostate and breast cancer. Recently, Runx2 expression has been linked to the development of osteosarcoma, bone highly aggressive tumor with poor prognosis, which currently is target of treatments such as chemotherapy and surgeries that can reach limb amputation.

There is a positive correlation between the expression of the transcription factor Runx2 and the incidence of lung metastases in osteosarcoma. Apart, in different types of tumor described as gene expression, MMPs, VEGF and osteopontin (OPN), associated with angiogenesis and tumor progression. Interestingly, the expression of these genes is regulated directly by Runx2 and are normally expressed during osteoblast differentiation in the bone tissue. Thus there is evidence that shows the angiogenic effect of VEGF and OPN expression in both non tumor as in tumor pathology.

Angiogenesis is a fundamental mechanism in cancer progression and metastasis promoting, and therefore key in malignant tumors. In the case of osteosarcoma, an aggressive phenotype and poor prognosis is associated with increased neovascularization. In this thesis, we propose that Runx2 promotes angiogenesis in osteosarcoma and regulates the expression of genes related to this process.

This was carried out by using various human osteosarcoma cell lines. Runx2 expression was higher in SaOS cell line and lowest in MG63 cell line. The U2OS, HOS and G292 cell lines exhibited variable expression of Runx2 protein, between MG63 and SaOS. In relation to *in-vitro* angiogenic capacity, this was similar to the above, presenting SaOS the highest levels and MG63 the lowest. The rest was variable between the two lines.

The search for genes related to the angiogenic process was performed through the analysis of the data generated in experiments of knock-in of Runx2 using siRNA and microarray transcriptome analysis, in the SaOS cell line, in combination with the analysis of a base CHIP on CHIP data for Runx2 in the same cell line. Genes were analyzed using DAVID 6.7 software (Functional Annotation Bioinformatics Microarray database), selecting those with angiogenic function and also encode secreted proteins. Endothelin 1 (END1), Angiogenin (ANG), type V collagen α 1 (COL5A1) and cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61) were obtained.

Runx2 mediated regulation of angiogenics target genes was studied by modulating Runx2 expression in different cell lines of osteosarcoma, using adenoviral vectors for overexpressing Runx2 and siRNA or shRNA to inhibit its expression. So by RT-qPCR was observed that CYR61 and VEGFA genes were

increased in all the cell lines over-expressing Runx2. Conversely inhibiting Runx2 in SaOS, decreased levels of CYR61 and VEGFA. The same was observed when analyzing the CYR61 protein levels by Western blot.

Finally the functional role of Runx2 on the angiogenic process was analyzed by the over-expression of Runx2 in MG63 cell line. An increase in the angiogenic capacity was observed, conversely inhibiting Runx2 in SaOS decrease the angiogenic capacity.

Thus we have shown for the first time that Runx2 promotes angiogenesis and CYR61 in human osteosarcoma.

INTRODUCCIÓN

1. Factor de transcripción Runx2.

Los factores Runx corresponden a una familia de factores de transcripción que son esenciales para la diferenciación celular hematopoyética (Runx1/AML1), neuronal, gastrointestinal (Runx3/AML2) y osteogénica (Runx2/AML3). Las proteínas Runx comparten un dominio runt, de 128 aminoácidos, mediante el cual se unen a secuencias específicas de ADN, localizadas principalmente en la región promotora de genes blancos, permitiendo su función como factores de transcripción (Schroeder, et al., 2005; Ziros, et al., 2008). La unión de estos factores al ADN es estimulada mediante la interacción con la proteína CBF β (core binding factor β) con el dominio runt (Wang and Speck, 1992). La formación del heterodímero Runx/CBF β , estabiliza el dominio runt protegiéndolo de la degradación mediada por ubiquitinización (Huang, et al., 2001).

Runx2 es un factor de transcripción esencial en regular la diferenciación de los osteoblastos, a través de la expresión de genes que codifican para proteínas de matriz ósea. Específicamente participa en el compromiso de las células mesenquimáticas pluripotenciales y diferenciación por parte de estas hacia un linaje osteoblástico, sin embargo, su sobre-expresión inhibe la maduración osteoblástica y la expresión de algunas proteínas de matriz ósea asociadas. Es así como, durante el desarrollo óseo, Runx2 induce el aumento de osteoblastos inmaduros y posteriormente su expresión debe ser regulada negativamente para permitir la diferenciación de osteoblastos maduros (Komori, 2010).

Runx2 posee la capacidad de actuar como activador o represor de la transcripción de distintos genes blancos, según su capacidad de interactuar con proteínas co-activadoras o co-represoras, respectivamente. Los co-activadores no modifican la capacidad de unión de Runx2 al ADN, pero si son requeridos para la función de Runx2 en la expresión génica. Algunos de estos co-activadores presentan actividad acetiltransferasa de histonas (HAT), que favorece la relajación de la cromatina y la mantención de una región promotora competente para la transcripción, como es el caso de p300, CBP, MOZ y MORF (Schroeder, et al., 2005). Otros co-activadores como Grg5, pRb y TAZ estimulan la actividad de transactivación del dominio carboxilo terminal de Runx2 (Schroeder, et al., 2005; Komori, et al., 2006).

Por otro lado, algunos co-represores que interaccionan con Runx2 presentan actividad deacetilasas de histonas (HDACs) y contribuyen a la condensación de la cromatina y mantención de una región promotora no competente para la transcripción, como es el caso de los co-represores HDAC3, HDAC4 y HDAC6. Además proteínas como TLE/Grg y mSin3a se unen a Runx2 formando grandes complejos con actividad de HDACs. La proteína YAP también puede actuar como co-represor, uniéndose directamente a Runx2 y reprimiendo así la activación del promotor de osteocalcina por parte de Runx2 (Schroeder, et al., 2005; Westendorf et al., 2006).

Además, se han descrito algunos factores transcripcionales que pueden interactuar con Runx2 para modular su actividad transcripcional. En su mayoría estos factores interactúan con el dominio runt o el dominio de activación

transcripcional (localizado en la región carboxilo terminal) de Runx2. Algunos de estos como AP1, Ets1, Dlx5, Hes1, Menin y Oct-1, facilitan el reclutamiento de co-activadores o formación de complejos de transactivación (Schroeder, et al., 2005; Komori, et al., 2006). Por el contrario otros factores de transcripción como C/EBP δ , Dlx3, Lef1, Msx2, PPAR γ , Smad3, Stat1 y Twist se unen al dominio runt, impidiendo su unión al ADN, o secuestrándolo en el citoplasma (Schroeder, et al., 2005; Komori, et al., 2006). Finalmente la degradación proteosomal mediada por la ubiquitina ligasa E3 (Smurf1) también participa, como un mecanismo regulador, al disminuir los niveles de Runx2 (Schroeder, et al., 2005).

2. Expresión y participación de Runx2 en cáncer.

Existen 3 tipos de factores Runx y las alteraciones que afectan a estos genes están relacionadas con distintos tipos de cánceres (Blyth, et al., 2005). Translocaciones cromosómicas que involucran al gen Runx1 y alteran la función de este factor, se asocian a distintos tipos de leucemias (Osato, 2004). La hipermetilación del promotor del gen Runx3 y su haploinsuficiencia, se relaciona con cáncer gástrico (Chuang and Ito, 2010). La amplificación del locus del gen Runx2 y su sobre-expresión, se relacionan con el desarrollo de osteosarcoma (Thomas, et al., 2004; Nathan, et al., 2009; Kurek, et al., 2010).

La sobre-expresión de Runx2 se encuentra asociada a tumorigénesis en linfoma donde su potencial oncogénico se encuentra bien establecido (Blyth et al., 2005; Blyth et al., 2006). Además, Runx2 se encuentra expresado en altos niveles en melanoma, carcinoma papilar tiroideo, glioma y tumor hipofisiario, lo cual sugiere

que Runx2 promueve la progresión tumoral en un amplio espectro de tumores (Riminucci, et al., 2003; Endo, et al., 2008, Vladimirova, et al., 2008; Zhang, et al., 2009).

Además, en cáncer de próstata y mama la expresión de Runx2 se ha relacionado con un fenotipo metastásico altamente agresivo a nivel óseo (Pratap, et al., 2011). Es así como una mayor inmunoreactividad de Runx2 en biopsias de cáncer de mama se encuentra significativamente asociada a una etapa más avanzada y a un mayor grado histológico, correlacionándose a un pronóstico clínico más pobre mientras mayores son los niveles de Runx2 (Onodera, et al., 2010). En relación al cáncer prostático se ha reportado una alta expresión de Runx2, lo que se asocia a una progresión más avanzada de la enfermedad. Al igual que en el cáncer de mama, en el prostático la expresión de Runx2 se correlaciona positivamente con tejido maligno al ser comparado con el benigno, y se asocia con agresividad tumoral y metástasis (Little, et al., 2011). De hecho la tinción nuclear de Runx2 en biopsias se correlaciona positivamente con mayores niveles de PSA, grado de Gleason y tumores con capacidad metastásica.

En las células epiteliales mamarias normales Runx2 es expresado en bajos niveles y activa genes de diferenciación como β -Caseína y OPN (osteopontina) (Pratap, et al., 2011; Blyth, et al., 2010). Los genes Runx2 y Runx3, son expresados en la glándula mamaria murina y sus niveles fluctúan durante la preñez, lactancia e involución, lo que sugiere un rol en la normal regulación de este tejido (Blyth, et al., 2010). Por el contrario, se ha observado que la sobre expresión de Runx2 en líneas celulares epiteliales mamarias altera la normal formación y arquitectura acinar

mamaria *in vitro* e induce la expresión de genes relacionados a progresión tumoral (Bcl-2 e IL-8), observándose pérdida de la membrana celular y alteración de la polaridad celular, además de también aumento de la proliferación celular y disminución de la apoptosis, asemejando un fenotipo tumoral. (Pratap, et al., 2009). Adicionalmente, la inhibición de la expresión de Runx2 en células de cáncer de mama permite una significativa reversión de la estructura acinar desorganizada que estas células tumorales presentan *in vitro*, asemejando un fenotipo normal (Pratap, et al., 2009).

Las proteínas Runx también son expresadas tanto en tejido prostático normal como en células cancerígenas prostáticas. Se ha demostrado la participación tanto de Runx1 como Runx2 en la expresión del antígeno prostático específico (PSA) (Fowler, et al., 2006), siendo Runx2 un regulador de la expresión de PSA. Lo anterior, se relaciona con la detección de mayores niveles de Runx2, mediante inmunohistoquímica, en etapas más avanzadas de cáncer de próstata y mama (Pratap, et al., 2011).

Esta serie de antecedentes sugieren una similitud funcional de Runx2 en el desarrollo de tumores óseos primarios (osteosarcoma) y secundarios (metastásicos). Sin embargo, el mecanismo por el cual Runx2 cambia su propiedad supresora en cuanto a la proliferación y promotora de la diferenciación osteogénica, descrita en células óseas, a una proteína con características oncogénicas aún no está claro (Pratap, et al., 2003; Galindo, et al., 2005; Pratap, et al., 2011). No obstante, por tratarse de un factor transcripcional, el rol de Runx2 en cáncer estaría

asociado a su capacidad de regular la transcripción de genes blancos relacionados con progresión tumoral.

3. Progresión tumoral y Runx2

El desarrollo del cáncer implica diversos pasos secuenciales en el tiempo, incluyendo formación y crecimiento del tumor primario, neo-vascularización, sobrevida, migración, invasión, intravasación y extravasación de células tumorales y formación de metástasis. En este contexto, la expresión de Runx2 se ha asociado a progresión tumoral en cáncer de mama y próstata, lo que se explicaría por la capacidad de este factor transcripcional de regular la expresión de distintos genes que promoverían la agresividad tumoral. (Pratap et al., 2011).

Ya en etapas tempranas de cáncer de próstata, Runx2 participa en la sobrevida de las células tumorales prostáticas afectando negativamente la apoptosis a través de la inducción de survivina y Bcl-2 y confiriendo resistencia al tratamiento con droga de quimioterapia (Lim, et al., 2010; Browne, et al., 2012). En cáncer de mama también se ha asociado la expresión de Runx2 con la de Bcl-2 (Pratap et al., 2009). Además, Runx2 regularía no solo la expresión de Bcl-2 en cáncer de próstata, sino que también la expresión de otros genes asociados a apoptosis (cIAP2, Stat5a, Casp14, TRAIL, Casp5 y PUMA) (Browne, et al., 2012). Además, Runx2 también está implicado en el crecimiento de tumores óseos en modelos ortotópicos de cáncer de próstata y de mama (Pratap, et al., 2009; van der Deen, et al., 2010).

Al comparar líneas tumorales mamarias y de próstata metastásicas versus no metastásicas se observa una mayor expresión de Runx2 en el primer caso (Pratap, et al., 2005; Nagaraja, et al., 2006; Pratap, et al., 2008; Akech, et al., 2010). Experimentos funcionales han demostrado que la expresión de Runx2 regula positivamente la migración e invasión de células tumorales prostáticas y de mama, lo que se correlaciona con la expresión de genes blancos de Runx2 como metaloproteinasas de matriz (MMP2, MMP9, MMP13 y VEGF) (Javed, et al., 2005; Pratap, et al., 2005; Butterworth, et al., 2008; Chua, et al., 2009; Akech, et al., 2010; Baniwal, et al., 2010; Leong, et al., 2010; Mendoza-Villanueva, et al., 2010; Pande, et al., 2013).

Evidencias de la mayor agresividad tumoral y del proceso de metástasis ósea asociadas a la sobre-expresión de Runx2 son el hecho de un aumento en la expresión de sus genes blanco que codifican para proteínas relacionadas a matriz ósea, como OPN, osteocalcina y sialoproteínas óseas, lo que confiere un fenotipo pseudo-óseo a células tumorales (osteomimicry), lo que facilitaría su metástasis a hueso (Koenemam, et al., 1999; Barnes, et al., 2003; Bellahcène, et al., 2008; Pratap, et al., 2011).

Runx2 es además un factor clave en la enfermedad osteolítica, asociada al crecimiento del tumor metastásico de cáncer de próstata y mama, participando en la regulación de diversas vías relacionadas con la osteolisis, tales como la vía TGF β e indian hedgedehog (IHH) que inducen la expresión de la proteína relacionada a hormona paratiroidea (PTHrP), así como citoquinas (IL8), requeridas para la osteoclastogénesis e inducción de citoquinas asociadas a la osteolisis (Pratap, et al.,

2008; Akech, et al., 2010). Consecuentemente, la inhibición de la expresión de Runx2 atenúa la expresión de genes relacionados a reabsorción ósea (PTHrP y IL8), reduciendo significativamente la formación de lesiones osteolíticas y la osteoclastogénesis asociada a la metástasis ósea (Barnes, et al., 2004; Javed, et al., 2005; Pratap, et al., 2008; Akech, et al., 2010)

Además, existe una regulación positiva de la expresión de Runx2 en células de cáncer prostático sometidas a ambiente hipóxico, determinando una línea celular más agresiva con mayor sobrevida, invasividad y desarrollo de metástasis *in vivo* (Butterworth, et al., 2008; Brown, et al., 2012). Complementariamente, se ha observado que Runx2 regula la expresión de genes blancos con función angiogénica en células de cáncer de próstata y de mama, como VEGF, SDF-1 (CXCL12), END-2, OPN (Javed, et al., 2005; Baniwal, et al., 2010; Akech, et al., 2010; Mendoza-Villanueva, et al., 2010; Pande, et al., 2013).

Estos antecedentes sugieren que Runx2 tendría un rol funcional, a través de la regulación de genes blanco, en algunos mecanismos de progresión tumoral como sobrevida, crecimiento, migración, invasión y enfermedad osteolítica asociada a la metástasis. Sin embargo, no existen antecedentes funcionales que hayan demostrado, más allá de la regulación de algunos genes blanco específicos como VEGF, SDF-1 (CXCL12), END-2, OPN, que Runx2 regularía uno de los procesos más fundamentales en la progresión tumoral y desarrollo de metástasis, la angiogénesis.

4. Osteosarcoma y Runx2.

El osteosarcoma es un cáncer óseo agresivo, de etiología desconocida y de mal pronóstico. Corresponde al tumor maligno primario más frecuente del tejido óseo y compromete principalmente a gente joven de la segunda década de la vida, localizándose a nivel de huesos largos (fémur distal y húmero proximal) y menos frecuentemente en el esqueleto axial, con una sobrevida global de 75-80% de los casos (Minsal 2013). Aproximadamente el 30% de los pacientes con osteosarcoma poseen metástasis al diagnóstico y la sobrevida de estos pacientes no alcanza más allá de un 20% a 5 años (Minsal 2013). En cuanto al tratamiento, no existen moléculas desarrolladas para tratar el osteosarcoma y la quimioterapia no ha mejorado las tasas de sobrevida. La terapia actual consiste en cirugía altamente invalidante asociada a disección de extremidades en combinación con quimioterapia neoadyuvante. A pesar de los tratamientos actuales que consideran el uso de cirugía y quimioterapia, 30 a 40% de los pacientes presentan enfermedad metastásica progresiva dentro de 5 años desde el diagnóstico, con el consecuente fallecimiento (Bielack, et al., 2002; Lewis, et al., 2007).

Inicialmente, en 2005 los trabajos de Andela y Galindo describieron por primera vez que la expresión de la proteína Runx2 estaba alterada en tanto en biopsias como en líneas celulares de osteosarcoma (Andela, et al., 2005; Galindo, et al., 2005). Estudios posteriores confirmaron estos hallazgos, así el análisis de la expresión de Runx2 mediante RT-qPCR e IHQ demostró una aberrante expresión de Runx2 en un 15-80% de muestras de biopsias de OS (Lu, et al., 2008; Won, et al., 2009; Sadikovic, et al., 2010; Kurek, et al., 2010; Sugawara, et al., 2011; Horvai,

et al., 2012; van Der Deen, et al., 2013). Interesantemente, esta variabilidad en los niveles de expresión (altos/bajos) de Runx2 también se observa en líneas celulares derivadas de osteosarcoma (Thomas, et al., 2004, Lu, et al., 2008; Luo, et al., 2008; Pereira, et al., 2009; Kurek, et al., 2010; Shapovalov, et al., 2010; Lucero, et al., 2013).

Esta aumentada expresión de Runx2 ha sido explicada por un aumento en el número de copias del gen Runx2, mediante amplificación de la región 6p12-p21 que contiene el locus del gen, observada en un 22-60% de las muestras clínicas analizadas (Overholtzer, et al., 2003; Man, et al., 2004; Lau, et al., 2004; Lu, et al., 2008; Sadikovic, et al., 2009; Smida, et al., 2011; Angstadt, et al., 2012). Adicionalmente se ha observado que los niveles de mRNA y proteicos de Runx2 se mantienen constantes durante el ciclo celular en osteosarcoma, a diferencia de lo que se observa en células óseas no tumorales en donde sus niveles si son regulados negativamente durante la progresión de la fase G1 a S/G2/M del ciclo celular (Young et al, 2007; San Martín, et al., 2009, Lucero et al., 2013).

Desde un punto de vista clínico, se demostró que mayores niveles de mRNA para Runx2 están asociados a una peor respuesta a la quimioterapia (Sadikovic, et al., 2010). Más aún, una alta expresión de Runx2, determinada mediante inmunohistoquímica, se correlaciona significativamente con metástasis y muestra una tendencia a una pobre supervivencia (Won, et al., 2009). Del mismo modo se observó que una expresión positiva a la inmunohistoquímica para Runx2 en un 73% de las metástasis (8/11), principalmente asociado a una pobre respuesta a la quimioterapia (5/7) (Kurek, et al., 2010).

Estos resultados muestran que los elevados niveles de Runx2 podrían asociarse a una mayor progresión tumoral, lo que sugieren que Runx2 puede ser considerado un marcador con valor predictivo en osteosarcoma.

5. Cáncer, Angiogénesis y Runx2.

La neo-angiogénesis asociada al tumor primario es un proceso fundamental para el desarrollo de patología tumoral maligna (de Oliveira, et al., 2011), y por lo tanto clave en el crecimiento tumoral, supervivencia, progresión y metástasis (Folkman, 2003; Carmeliet and Jain, 2011). Así, los tumores vascularizados tienen un peor pronóstico, ya que esta característica se asocia a agresividad y diseminación tumoral.

Inicialmente, se demostró el rol funcional de Runx2 en el proceso normal de angiogénesis. Experimentos en ratones knockout deficientes en expresión de Runx2 han demostrado que este factor transcripcional regula la angiogénesis asociada al proceso de osificación endocondral, observándose una ausencia de la expresión de VEGF y una disminución a niveles casi indetectables de OPN, en la zona de condrocitos hipertróficos, asociada a la ausencia de vascularización del tejido óseo (Komori, et al., 1997; Otto, et al., 1997; Zelzer, et al., 2001). Por otra parte, células óseas obtenidas de ratones knockout para OPN, presentaron una capacidad disminuida para inducir angiogénesis (Asou, et al., 2001). Más aún, en experimentos complementarios se pudo demostrar que Runx2 regula el promotor del gene VEGF y OPN (Zelzer, et al., 2001; Zhang, et al., 2012).

Adicionalmente, se ha observado en células HEK293 no tumorales que Runx2 también aumenta en hipoxia, asociado a un aumento en la expresión de otro factor transcripcional (HIF1 α) que regula angiogénesis (Kwon, et al., 2011). Más aun, se demostró que Runx2 y HIF1 α pueden interactuar entre sí a través de una unión proteína - proteína, que la sobre expresión de Runx2 protege a HIF1 α de la degradación y que ambos factores de transcripción pueden unirse al promotor del gen VEGF para regular tanto su expresión como su secreción e inducir angiogénesis *in vitro* (Kwon, et al., 2011; Lee, et al., 2012). Esto sugiere que la expresión de Runx2 podría ser estimulada por hipoxia en células tumorales e inducir neo-angiogénesis.

En contraste a la normal regulación durante el proceso de angiogénesis fisiológico, en el cáncer existe una serie de señales celulares y moleculares que conducen a una alteración de este proceso. Factores como mutaciones genéticas, estrés mecánico, inflamación e hipoxia, permiten un desbalance a favor de un estado tumoral pro-angiogénico. Los tumores en desarrollo secretan elevados niveles de factores tales como VEGF, FGF, GM-CSF y OPN, que inducen en la médula ósea un fenotipo pro-angiogénico (Wilson and Trumpp, 2006), permitiendo el reclutamiento de una serie de células derivadas de esta, para participar en el proceso angiogénico del tumor primario y sus metástasis (Grunewald, et al., 2006).

Así, se ha demostrado que Runx2 regula el promotor de OPN en líneas celulares de osteosarcoma (U2OS) y de cáncer mamario (MCF7) (Giacopelli, et al., 2004). Más aún, Runx2 modula la expresión de VEGF y OPN en células de cáncer de próstata y de mama, y de END-2 en células de cáncer de próstata (Javed, et al.,

2005; Pratap, et al., 2005; Akech, et al., 2010; Baniwal, et al., 2010; Mendoza-Villanueva, et al., 2010; Pande, et al., 2013).

OPN, en una función autocrina, se une a integrina $\alpha v\beta 3$ y su unión activa una serie de señales intracelulares que son requeridas para la expresión de VEGF por parte de las células tumorales de mama y la inducción de angiogénesis *in vivo* (Chakraborty, et al., 2008). A su vez OPN secretada por células tumorales de mieloma, en una función paracrina, estimula las ECs (células endoteliales), a través del receptor integrina $\alpha v\beta 3$, induciendo angiogénesis *in vitro* (Tanaka, et al., 2007). Adicionalmente, se ha observado que VEGF aumenta la expresión de la integrina en las ECs, favoreciendo la acción de OPN en la migración de estas (Senger, et al., 1996). Estos antecedentes muestran que estos dos genes blancos de Runx2 funcionan en forma cooperativa en el proceso angiogénico.

Se ha demostrado que OPN es un gen cuya expresión favorece la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* en cáncer endometrial, pulmonar, neuroblastoma, gástrico y Mieloma Múltiple (Du, et al., 2009; Blasberg et al., 2010; Hirama, et al., 2003; Tang, et al., 2007; Colla, et al., 2005) Interesantemente, el knockdown de Runx2 con siRNA en células de mieloma humanas induce una disminución de la expresión y secreción de OPN, y en pacientes con mieloma múltiple, la densidad microvascular es mayor en los casos positivos para OPN, demostrándose una correlación positiva (Colla, et al., 2005).

6. Osteosarcoma y Angiogénesis

En el desarrollo del osteosarcoma ocurre un proceso de neo-vascularización sostenido, favorecido por la hipoxia tisular, acidosis, activación de oncogenes y pérdida de la función genética supresora. Este micro ambiente promueve la expresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α) y consecuentemente una mayor liberación de VEGF por las células del osteosarcoma. Como consecuencia, se produce en el tumor la formación de una red vascular inmadura, irregular y permeable, la que se hace insuficiente e inefectiva, por lo que se produce en el tumor un estímulo permanente tipo feedback conduciendo a un ciclo vicioso de neo-angiogénesis (Broadhead, et al., 2011).

Además VEGF regula positivamente, en células endoteliales, la expresión de MMPs que se encuentran involucradas en el fenotipo agresivo e invasivo del osteosarcoma (Unemori, et al., 1992). Interesantemente, en otros tumores (páncreas y fibrosarcoma) se ha demostrado que MMP-9 permite la liberación del VEGF almacenado en la MEC (matriz extracelular) tumoral y que una disminución de los niveles extracelulares de MMP9 se asocia a una menor vascularización tumoral (Bergers, et al., 2000; Oh, et al., 2001).

Utilizando la línea celular de osteosarcoma humana SaOS se ha podido establecer que la sobre expresión de PDGF (factor de crecimiento derivado de pigmento), un factor que regula negativamente la expresión de VEGF, inhibe la densidad microvascular tumoral en modelo ortotópico (Ek, et al., 2007a; Ek, et al., 2007b; Ek, et al., 2007c). Otros factores como el factor transcripcional YY1 forma un complejo activo con HIF1 α en el promotor del gen VEGF que estimula la

transcripción y expresión de este gen, así como la secreción de VEGF (de Nigris, et al., 2010). En experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha determinado que en osteosarcoma (células SaOS) un menor crecimiento tumoral inducido por el knockdown del factor transcripcional YY1 se asoció a una menor expresión de VEGF y una disminución en la neo-angiogénesis del tumor (de Nigris, et al., 2008; de Nigris et al., 2013).

La proteína asociada a metástasis Mts1, también conocida como S100A4, fue descrita como un factor extracelular que promueve angiogénesis en tumores de carcinoma mamario (Ambartsumian, et al., 2001). Al respecto, se ha demostrado que la expresión de S100A4 regula positivamente los niveles de VEGF en células de cáncer tiroideo y la angiogénesis *in vivo* (Jia, et al., 2013). Interesantemente, el tratamiento de células de osteosarcoma con la proteína S100A4 estimuló la expresión y secreción de OPN que podría estar asociada a la inducción de la angiogénesis tumoral (Berge, et al., 2011). Adicionalmente, se ha observado una correlación en la expresión de OPN y VEGF en biopsias de osteosarcoma (Sulzbacher, et al., 2002). Como ya fue mencionado, Runx2 regula el promotor de OPN en una línea celular de osteosarcoma (Giacopelli, F., et al., 2004), sin embargo, la expresión de OPN en osteosarcoma aún no se ha estudiado en relación a vascularización tumoral (Fisher, et al., 2001; Sulzbacher, et al., 2002).

Más recientemente, se demostró que en células osteosarcoma el knockdown de IL-6, un conocido gen blanco de Runx2, disminuye la producción de VEGF y la inducción de angiogénesis *in vitro*, mediada por el medio condicionado de estas

células, sugiriendo que IL-6 podría incrementar la producción de VEGF a través de la vía IL-6R/ASK/p38/AP1 (Tzeng, et al., 2013).

En el osteosarcoma VEGF ejercería un rol tanto autocrino como paracrino, asociado a la agresividad tumoral. Así, una sub-población de células de osteosarcoma que expresan altos niveles de VEGFR1, secretan altos niveles de VEGF y presentan un mayor crecimiento tumoral, angiogénesis y osteólisis *in vivo* (Ohba, et al., 2014).

En muestras de osteosarcoma humano se observa una correlación positiva entre la expresión de VEGF y una mayor densidad microvascular (angiogénesis), evaluada por marcadores de células endoteliales (CD34, CD31) (Kaya, M., et al. 2000; Yang, J., et al., 2011; Lammler, J., et al., 2012). Además se observa en pacientes de osteosarcoma una correlación entre elevados niveles plasmáticos de VEGF y una mayor densidad microvascular tumoral (CD34) (Kaya, M., et al., 2002). Por último, utilizando estudio de imágenes no invasivo se observa en muestras de osteosarcoma humano una correlación entre la expresión de VEGF con una mayor permeabilidad vascular tumoral (Bajpai, J., et al., 2010).

La expresión de VEGF tanto en muestras de tumor como en el plasma, se asoció significativamente con metástasis al diagnóstico (sincrónica) (Kaya, M., et al., 2002; Lammler, J., et al., 2012), menor supervivencia (Kaya, M., et al. 2000; Yang, J., et al., 2011), etapa tumoral más avanzada (Lammler, J., et al., 2012) y aparición de metástasis al seguimiento (recaída o metástasis sincrónica) (Kaya, M., et al., 2002).

Finalmente, un meta-análisis publicado recientemente que incluyó 12 estudios de expresión de VEGF en muestra clínicas de osteosarcoma entre los años 2000 a 2012 (Chen, et al., 2013) y que abarcó un total de 559 casos, mostró una asociación significativa entre una mayor expresión de VEGF y una menor supervivencia global como libre de enfermedad.

En base a la evidencia anteriormente presentada planteamos que el factor de transcripción Runx2, que se encuentra expresado en altos niveles en osteosarcoma y que se asocia a progresión tumoral, estaría promoviendo la angiogénesis en este tumor óseo, a través de la expresión de genes blancos con función pro-angiogénica.

Si bien se ha descrito que Runx2 regula la expresión de genes blancos con función angiogénica en células de cáncer de próstata y de mama, como VEGF, SDF-1 (CXCL12), END-2 y OPN, no existe evidencia experimental que demuestre que Runx2 regule el proceso neo-angiogénico en estos tumores a través de la expresión y función de sus genes blanco. Respecto a cáncer óseo, como se ha mencionado anteriormente, a la fecha se ha descrito el rol de genes blancos de Runx2 (VEGF, OPN, MMP9, IL-6) con función angiogénica en osteosarcoma, sin embargo, no existen trabajos en los que se demuestre que estos genes son regulados por Runx2 en osteosarcoma (con la sola excepción de OPN) y, al igual que en cáncer de próstata y mama, menos aún trabajos que demuestren experimentalmente el rol de Runx2 en neo-angiogénesis en osteosarcoma. Así, el principal objetivo de esta tesis fue establecer mediante experimentos funcionales el rol de Runx2 en el proceso de neo-angiogénesis tumoral, así como contribuir a la

búsqueda de nuevos genes blancos de Runx2 con función angiogénica en osteosarcoma.

HIPÓTESIS

La hipótesis del proyecto propone que: “Runx2 promueve la angiogénesis y la expresión de genes blanco con función pro-angiogénica en osteosarcoma”. Esta hipótesis se abordó experimentalmente en base al desarrollo de cuatro objetivos específicos.

OBJETIVO GENERAL

Definir el rol de Runx2 en el proceso de angiogénesis en un modelo celular de osteosarcoma humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma humano y la capacidad angiogénica de cada una de estas.
2. Identificar y determinar la expresión de genes blanco de Runx2 con función pro-angiogénica en células de osteosarcoma humano.
3. Analizar la función de Runx2 en la expresión de genes blanco pro-angiogénicos en células de osteosarcoma humano.
4. Determinar el rol funcional de Runx2 en la capacidad angiogénica de células de osteosarcoma humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Las líneas celulares de osteosarcoma humano SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292, fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA) y mantenidas según las condiciones especificadas por el proveedor (Tabla 1). La línea celular SaOS fue cultivada en medio modificado McCoy's 5A (Gibco) suplementado con 15% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone); MG63 y HOS fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco) con 10% SFB; U2OS y G292 fueron cultivadas en medio McCoy's 5A con 10% SFB. Todos los medios fueron adicionalmente suplementados con penicilina 100 U/ml (Gibco), estreptomina 100 ug/ml (Gibco), L-Glutamina 2 mM (Gibco) y con fungizona 0,5 ug/ml (anfotericina B) (Gibco). Las células fueron sembradas en placas de 100 mm o 60 mm según sea el caso y cultivadas en 10 ml o 3 ml de medio de cultivo suplementado, respectivamente. El medio fue cambiado según indicaciones de ATCC (Tabla I) y las células cultivadas en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y temperatura de 37°C.

Los cultivos primarios de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs) utilizados en este estudio fueron obtenidos en el laboratorio de la Dra. Paola Casanello (Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile), bajo un acuerdo de colaboración. Las células fueron recepcionadas en pasaje cero o uno y cultivadas hasta una confluencia del 80% en placas de 60 mm, sobre gelatina al 0,2% (SIGMA), en 3 ml de medio M199 (Gibco) suplementado con SFB al 20%, heparina 25 ug/ml (Sigma-Aldrich) y ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) (Sigma-

Aldrich®), L-Glutamina, penicilina, estreptomina y fungizona, en las mismas concentraciones anteriores. El medio fue cambiado cada dos días y las células cultivadas en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y temperatura de 37°C. Para amplificar las células HUVECs, estas fueron lavadas con PBS 1x y resuspendidas utilizando tripsina (Trypsin-EDTA 0,25%, Gibco). La actividad de la tripsina fue reducida por dilución agregando medio de cultivo en una proporción de 1:10. Luego las células fueron traspasadas a (2 a 5 pasajes) placas nuevas y cultivadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, las células fueron resuspendidas utilizando tripsina, como ya se indicó, centrifugadas a 1500 rpm, resuspendidas en buffer de crio-preservación (Dimetil sulfóxido:SFB en proporción 1:9) en volumen de 1 ml y almacenadas en nitrógeno líquido a -80°C. Los cultivos primarios de células HUVECs fueron utilizadas en ensayos de angiogénesis *in-vitro* entre los pasajes 3 al 6.

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

Líneas de osteosarcoma humano SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron obtenidas de ATCC, USA. Se detalla origen de cada línea, propiedad de crecimiento en placa, morfología, medio de cultivo, frecuencia de renovación del medio, tasa de sub-cultivación y su preservación en nitrógeno líquido.

Línea Celular	SaOS	MG63	U2OS	HOS	G292
Origen	OS humano primario de niña caucásica de 11 años	OS humano	OS humano de niña caucásica de 15 años	OS humano de niña caucásica de 13 años	OS humano de niña caucásica de 9 años
Crecimiento	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente
Morfología	Epitelial	Fibroblasto	Epitelial	Mixta	Fibroblasto
Medio de Cultivo	Mckoy's 5α medio mdificado + SFB 15%	DMEM + SFB 10%	Mckoy's 5α medio mdificado + SFB 10%	DMEM + SFB 10%	Mckoy's 5α medio mdificado + SFB 10%
Frecuencia de renovación	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 luego de sembradas, luego 2 a 3 veces por semana
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
Preservación	Medio de cultivo 95%, DMSO 5%	Medio de cultivo 95%, DMSO 5%	Medio de cultivo 95%, DMSO 5%	Medio de cultivo 95%, DMSO 5%	Medio de cultivo 95%, DMSO 5%

Generación de medios de cultivo condicionados

2 x 10⁵ células de cada una de las 5 líneas celulares de osteosarcoma humano (SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292) fueron sembradas en placas 60 mm, crecidas hasta una confluencia del 70 a 80%, luego de lo cual el medio de cultivo fue descartado, las células lavadas 3 veces con PBS y cultivadas en medio DMEM libre de SFB, suplementado con antibióticos, antifúngico y L-glutamina. Luego de 24 hrs. de cultivo, el medio de cultivo fue obtenido y traspasado a tubos de 1,5 ml, centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos para la eliminación de detritos celulares, filtrado en filtros de 0,22 um y almacenado en alícuotas de 500 ul a -80°C, para ser utilizado posteriormente como medio de cultivo condicionado (MCC). Las células que quedan adheridas a la placa fueron tratadas con tripsina, resuspendidas en 1 ml de PBS y cuantificadas en un contador de células automático LUNA™ (Logos Biosystems). En consideración a que cada línea celular tiene una capacidad proliferativa distinta, al final del periodo de acondicionamiento del cultivo, el número de células que condicionaron el medio es variable y este será un factor de corrección a considerar en la evaluación comparativa de la capacidad angiogénica entre las distintas líneas celulares o entre distintas condiciones. Al momento de su uso, el MCC será descongelado en hielo y utilizado sólo una vez.

Obtención de RNA total y generación del cDNA

El ARN total fue extraído con reactivo Trizol® Reagent (ambion) a partir de células crecidas en monocapa siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN total fue resuspendido en 50 ul de agua libre de nucleasas (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen) y cuantificado mediante método de quimioluminiscencia con kit

Qubit® RNA BR (Invitrogen™). La integridad del ARN total se determinó mediante la visualización de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S, utilizando electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 mg/ml).

Una alícuota de 200ng de ARN total fue tratada con RQ1 DNase (Promega) por 30 minutos a 37°C, luego se agregaron 1,5 ul de RQ DNase stop solution (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 esta muestra de RNA libre de DNA, utilizando partidores al azar (Random Primers, Promega). La muestra fue ARN tratada con DNasa fue incubada a 70°C por 5 minutos. Luego se le agregó transcriptasa reversa (ImProm II™ reverse transcriptase, Promega), Buffer (ImProm II™ 5X reaction buffer, Promega), MgCl₂ 25mM (Promega), dNTPs 100mM (Promega) y RNAasa out (Recombinant RNasin® ribonuclease inhibitor, Promega). Finalmente se incubó a 42°C por 50 minutos.

PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR fueron preparadas en un volumen total de 10ul conteniendo 5ul de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®), partidores específicos para RUNX2, COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el ARN ribosomal 18S, en concentraciones de 200 a 600 nM según corresponda, 1 ul de cDNA y agua libre de nucleasas. Los partidores fueron diseñados y analizados utilizando programas CLUSTAL-W y Primer Blast, u obtenidos según reportes previos (Tabla II). La eficiencia de amplificación de cada partidador fue validada respecto al control endógeno 18S. El método utilizado para realizar la cuantificación mediante qPCR fue el del delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Los resultados fueron graficados

como promedio +/- SEM (error estándar) obtenido de tres experimentos independientes y cada uno de estos en duplicado. Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas mediante un test de t de student y se indican como *, $p < 0,05$.

Tabla II. Secuencia de partidores utilizados.

Lista de partidores utilizados para cuantificar expresión de ARNm, mediante RT-qPCR, de los genes humanos evaluados en esta tesis. Se indica la secuencia de partidores sentido (FW) y antisentido (RV) en sentido 5' a 3', tamaño del amplicon en pares de bases (PB), longitud de cada partidor y temperatura de *annealing* (TM).

Gen	Partidores	Secuencia (5'→3')	Amplicon (pb)	Longitud	TM
18S	FW	CAACTTTCGATGGTAGTCG	110	19	60
	RV	CCTTCCTGGATGTGGTA		18	60
COL5A1	FW	GTCATCCCACCATCACCAAAGCC	92	23	60
	RV	ATCGGGAAGGCACCTGCAGAATG		23	60
CYR61	FW	ATGAATTGATTGCAGTTGGAAA	86	22	60
	RV	TAAAGGGTTGTATAGGATGCGA		22	60
END1	FW	GGATGACAATGGACCTCTCAG	101	21	60
	RV	TCAGACACAAACACTCCCTTAG		22	60
ANG	FW	CCCTCACAGAGAAAACCTAAG	200	21	60
	RV	GGTAAGCCATTTTACAAGC		20	60
VEGFA	FW	AGCCTTGCCTTGCTGCTCTAC	83	21	60
	RV	TGATGATTCTGCCCTCCTCTT		22	60

Obtención de proteínas totales

Extractos de proteínas totales celulares fueron obtenidos desde placas de cultivo con confluencia entre un 80 a 90%, como se detalla a continuación. Las placas de cultivo fueron puestas sobre hielo y las células fueron recolectadas en 1 ml de PBS frío conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche). La suspensión de células fue transferida a un tubo eppendorf de 1,5 ml mantenido en hielo y luego centrifugada a 5000 RPM durante 5 minutos a 4°C en centrifuga refrigerada (Mikro 200R, Hettich®). El sobrenadante fue descartado y las células sedimentadas fueron mantenidas en hielo, resuspendidas en buffer de lisis sin colorante (250 ul de Tris HCl (pH 6,8) 2M, 2 ml de SDS 10 %, 1ml de Glicerol, 1,2 gr de Urea y c.s.p. 8,6 ml de Agua) y sonicadas por 10 segundos. La concentración de proteína totales fue cuantificada mediante el método del ácido bicinconínico (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) en lector de Elisa con el programa Gen5 Data Analysis Software (Biotek®). Posteriormente, se adicionó al buffer de carga que contiene la muestra de proteínas totales DTT 1M al 11% y azul de bromofenol al 1% y se almaceno a -80 °C.

Western Blot

40-70 ug de proteínas totales fueron fraccionadas utilizando gel SDS-PAGE (poliacrilamida al 10%) en buffer de corrida (25 mM Tris-HCl, 0,2 M glicina, 0,35 % SDS) a 30 mA, 180V, por aproximadamente 3 horas y transferidas a membrana de nylon (Hybond™-N+, Amershan Biosciences) mediante transferencia húmeda en buffer de transferencia (3,03 gr de Trizma-base; 14,4 gr de Glicina y 200ml de Metanol más agua doble destilada en c.s.p. 1lt) por 120 minutos a 300 mA y 120V.

Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% (Dry fat milk, Biorad®) en PBS Tween 1% (PBS-T) por 1 hora, lavadas dos veces con PBS-T por 5 minutos e incubadas con los anticuerpos primarios en PBS-T con leche al 1%. Para la detección de Runx2 y CYR61, las membranas fueron incubada alternativamente con el anticuerpo primario monoclonal anti-Runx2 (gentileza del Dr. Stein) diluido 1:500 v/v o con anticuerpo policlonal anti-Cyr61 (NB 100-356, Novus Biologicals) diluido 1:2000 v/v, por 12 hrs a 4°C y con agitación. Para la detección de Actina, las membranas fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-actina (sc-1615, Santa Cruz®) diluido 1:2000 v/v por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Luego, las membranas fueron lavadas dos veces por 5 minutos y una tercera vez por 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente y con agitación, seguido por incubación con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa anti-mouse (n^ocat, Santa Cruz®) diluido 1:2000 v/v o anti-rabbit (n^ocat, Santa Cruz®) diluido 1/2000 v/v o con anti-goat (sc-2020, Santa Cruz®) diluido 1:2000 v/v, por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Finalmente, los anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit fueron lavados tres veces por 5 minutos con PBS-T a temperatura ambiente y con agitación, mientras que el anticuerpo secundario anti-goat fue lavado dos veces por 5 minutos y una tercera vez por 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente y con agitación.

Las bandas proteicas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante Kit de detección quimioluminiscente (EZ-ECL Solution A y B, Biological Industries) y reveladas utilizando películas fotosensibles BioMax® Light Film (Kodak). La intensidad de la señal fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Image J® y normalizada por la señal de Actina (control de carga). Los resultados

fueron analizados y graficados en base a un promedio de tres experimentos independientes +/- SEM. Se utilizó test de t de student para evaluar las diferencias significativas entre las distintas líneas celulares y se indican como * $p < 0,05$.

Transducción con Adenovirus

Con el propósito de sobre-expresar Runx2 en las líneas celulares de OS humano, se utilizó el vector adenoviral AdV-GFP-Runx2 que contiene el gen de Runx2 *wild type* y la proteína fluorescente verde (GFP) para su detección. Como control negativo se utilizó AdV-GFP, que únicamente expresa el gen de GFP. 2×10^5 células de cada línea celular fueron sembradas en placas de 60 mm y cultivadas en su medio de cultivo correspondiente hasta una confluencia de 60-70%. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se adicionó 900 μ l de medio de cultivo para transducción (medio de cultivo correspondiente suplementado con 1% de SFB más penicilina, estreptomycin, l-glutamina y fungizona en mismas concentraciones anteriores al 0,2%) y transducidas por 4 horas con 30×10^{10} opu/ml (optical particle units) de AdV-Runx2-GFP o AdV-GFP y cultivadas en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 37°C. Luego, se adicionaron a cada placa de cultivo 600 μ l del mismo medio de cultivo para transducción y las células fueron cultivadas por 10 horas más en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 37°C. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo para transducción y se adicionaron 3 ml de medio cultivo estándar, según corresponda a cada línea celular. Para producir medio condicionado, el medio de cultivo para transducción fue reemplazado por DMEN sin SFB y con penicilina, estreptomycin, l-glutamina y fungizona. Finalmente las células fueron crecidas por 24 horas tras la transducción adenoviral.

Extractos de proteínas totales fueron obtenidos para verificar la sobre-expresión de Runx2, así como la expresión de SYR61 y actina, mediante western blot. Además, se obtuvo ARN total para evaluar la expresión de genes blanco de Runx2, mediante RT-qPCR y western blot. Para ensayos de angiogénesis *in-vitro* se obtuvo el medio condicionado sin SFB a las 24 horas, el cual fue centrifugado y filtrado en filtros de 0,2 μ m, para luego ser congelado a -80°C .

Transfección con siRNA

3×10^5 células fueron sembradas en placas de 60 mm y cultivadas en 3 ml del correspondiente medio de cultivo estándar y cultivadas hasta obtener una confluencia del 60%. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS y transfectadas en 2 ml de medio Opti-MEM® (Gibco®) con 20uM de siRNA-Runx2 (Dharmacon®) o con 20uM de siRNA non-silencing (siRNA control) (Dharmacon®), utilizando oligofectamina (Invitrogen®), según las instrucciones del fabricante, e incubadas por 4 horas en atmósfera humidificada con CO_2 al 5% y temperatura de 37°C . Posteriormente, se adiciono a las placas 1 ml del correspondiente medio de cultivo 3x (30% SFB, L-glutamina 3x, antibióticos 3x y antimicótico 3x) para obtener concentraciones estándar de SFB, l-glutamina, antibióticos y antimicótico, para continuar con el cultivo de las células por 24 horas más. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS y cultivadas en 3 ml de medio D-MEM sin SFB por un período adicional de 24 horas, con el fin de obtener medio de cultivo condicionado, así como muestras de ARN y proteínas totales.

Transducción con shRNA

Se sembraron 3×10^5 células de la línea de osteosarcoma humano SaOS en placas p60. Se crecieron hasta una confluencia del 50% para luego retirar el medio y lavarlas con PBS. Posteriormente se adicionó 3 ml de polibreno 8 ug/mL a cada placa y luego 600ul de lentivirus por goteo a cada placa. Este posee el shRNA para Runx2 o el shRNA Control, el cual fue generado según lo descrito por Pratap, et al., 2008. Finalmente luego de 24 horas se cambió por medio completo correspondiente a la línea SaOS.

Ensayo de angiogénesis in-vitro

Ensayos de angiogénesis *in-vitro* fueron realizados en un sistema de placas de 24 pocillos cubiertos con matrigel reducido en factores de crecimiento (BD matrigeltm matrix). El matrigel, almacenado en alícuotas a -80° C, se descongela a 4° C durante la noche (no más de 12 horas), se adicionan 200ul de matrigel a cada pocillo de la placa y luego se incuba a 37° C y 5% de CO_2 por un período de 30 minutos para lograr la polimerización del matrigel.

Células HUVECs, cultivadas a una confluencia de 80%, fueron lavadas 3 veces con PBS, tripsinizadas (Trypsin-EDTA 0,25%, Gibco), centrifugadas a 1.500 rpm y resuspendidas en un tubo estéril de 1,5 ml en su correspondiente medio de cultivo sin suplementar, a una concentración cercana y no mayor a 1×10^6 /ml. 4×10^4 células HUVECs en no más de 40ul de medio de cultivo fueron mezcladas con 500ul de MCC, sembradas en cada uno de los pocillo cubiertos con matrigel e incubadas a 37° C y 5% de CO_2 durante 3 a 6 horas, hasta la formación de estructuras tubulares. Luego cada pocillo fue observado bajo microscopio y

fotografiado en al menos 9 campos distintos con aumento 10x, obteniendo fotografías representativas de cada pocillo.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa Image J®. Se cuantificó los brotes y uniones entre células endoteliales, y polígonos (unión entre 3 o más células), obteniéndose un puntaje angiogénico según fórmula descrita por Aranda and Owen (2009). Los distintos puntajes angiogénicos fueron corregidos según el número de células cuantificado al final del periodo de acondicionamiento del medio de cultivo y estandarizados por 1×10^4 células.. Cada experimento fue realizado en triplicado con medio condicionado de cada una de las distintas líneas celulares. Los resultados fueron graficados y analizados como promedio +/- SEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas con prueba de ANOVA o t-test según corresponda y se indican como *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$ o ***, $p < 0,001$.

Análisis estadísticos y gráficos

Todos los resultados se muestran como promedio de al menos 3 experimentos junto al error estándar (SEM) correspondiente.

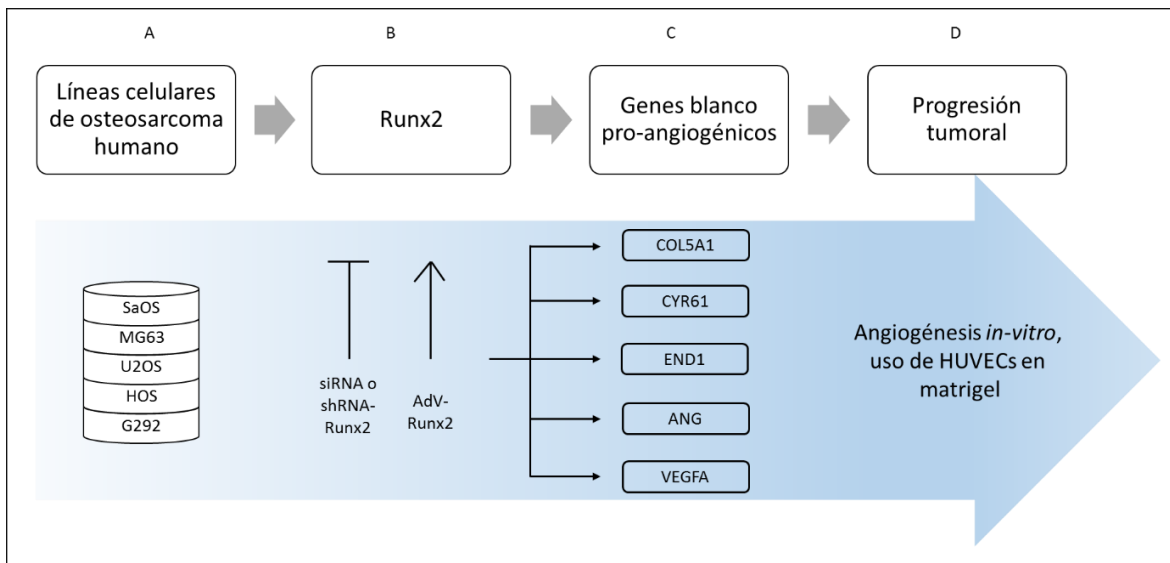
Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el software GraphPad Prism® utilizando prueba estadística de t de student o ANOVA según corresponda. Los resultados significativamente estadísticos fueron en base a un $p < 0,05$, *, $p < 0,005$, ** o $p < 0,001$, *** según corresponda.

Todos los resultados fueron graficados utilizando el software Microsoft Office Excel Professional Plus 2013.

Modelo de estudio propuesto

Figura n°1: Esquema resumen del modelo de estudio propuesto.

- (A) Se utilizarán 5 líneas diferentes de osteosarcoma humanas para los distintos ensayos.
- (B) La expresión de Runx2 será modulada en las distintas líneas celulares. Se sobre-expresará Runx2 mediante transducción con adenovirus para Runx2, y se inhibirá su expresión mediante uso de siRNA o shRNA para Runx2.
- (C) Se evaluará la expresión de distintos genes blanco de Runx2 mediante técnica de RT-qPCR y Western Blot en las distintas líneas celulares de osteosarcoma humano.
- (D) Se realizará un ensayo de angiogénesis *in-vitro* para evaluar la capacidad de angiogénesis de los medios de cultivo condicionados obtenidos del cultivo de las distintas líneas celulares.



RESULTADOS

- *Objetivo 1: Evaluar la expresión de Runx2 en líneas celulares de osteosarcoma humano y la capacidad angiogénica de cada una de estas.*

Con el fin de establecer el nivel de expresión de Runx2 en nuestro modelo celular de osteosarcoma, se evaluó por Western Blot la expresión diferencial de este factor transcripcional en un panel comercial de 5 líneas celulares de osteosarcoma humano (SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292). Estas líneas celulares fueron establecidas a partir de muestras de osteosarcoma provenientes de pacientes pediátricos (Tabla I) Los resultados muestran que la línea celular SaOS presenta altos niveles de proteína Runx2 y que las líneas HOS y G292 presentan niveles intermedios de este factor, mientras que las líneas celulares U2OS y MG63 muestra niveles bajos o prácticamente no detectables de Runx2 (Figura 2 A-B). Así, nuestro panel de líneas celulares refleja una variabilidad en los niveles de Runx2 que ha sido reportada previamente en muestras de osteosarcoma y que asocia elevados niveles de este factor con una mala respuesta a la quimioterapia, metástasis y pobre supervivencia (Sadikovic, et al., 2010; Won, et al., 2009).

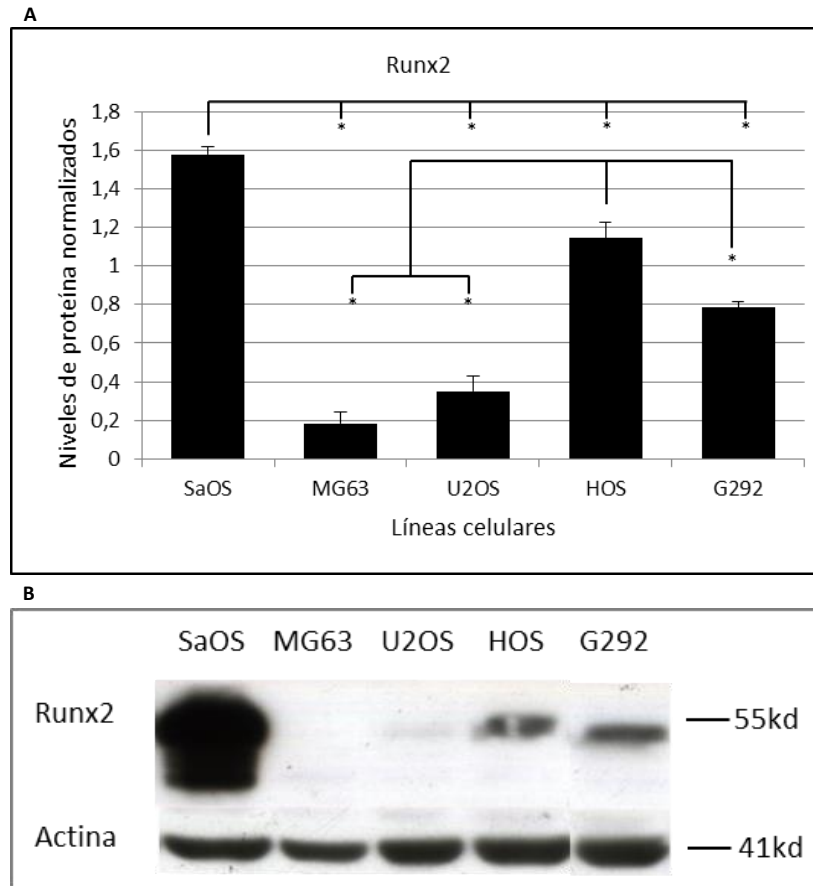


Figura n°2: Niveles de proteína de Runx2 en 5 líneas celulares de OS humano. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta una confluencia del 80%. Se extrajo proteína total, y los niveles de Runx2 y actina fueron analizados mediante western blot. **(A)** Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por actina. **(B)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2 y Actina. Se observa una mayor expresión de Runx2 en la línea celular de OS humano SaOS, niveles intermedios para las líneas HOS y G292, bajos para la línea U2OS y muy bajos para la línea MG63.

(A) Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre líneas celulares se indican como *, $p < 0,05$.

Estando en conocimiento del nivel de expresión de Runx2 en cada línea celular, se determinó la capacidad de cada una de ellas para inducir angiogénesis y si esta capacidad se correlaciona con los niveles de expresión de Runx2. Para ello se utilizaron los respectivos MCC en un ensayo *in-vitro* de formación de estructuras tubulares en matrigel utilizando células HUVECs.

Se observó que el MCC de la línea SaOS (altos niveles de proteína Runx2) exhibe una mayor capacidad angiogénica, mientras que el MCC de las líneas HOS y G292 (niveles intermedios de proteína Runx2) y de las líneas U2OS y MG63 (niveles bajos y casi indetectables de proteína Runx2) presentaron capacidad angiogénica intermedia y baja, respectivamente (Figuras 3 A-B). De este modo se observa una correlación positiva entre los niveles de expresión protéica de Runx2 y la capacidad angiogénica *in-vitro* de las líneas celulares de osteosarcoma humano.

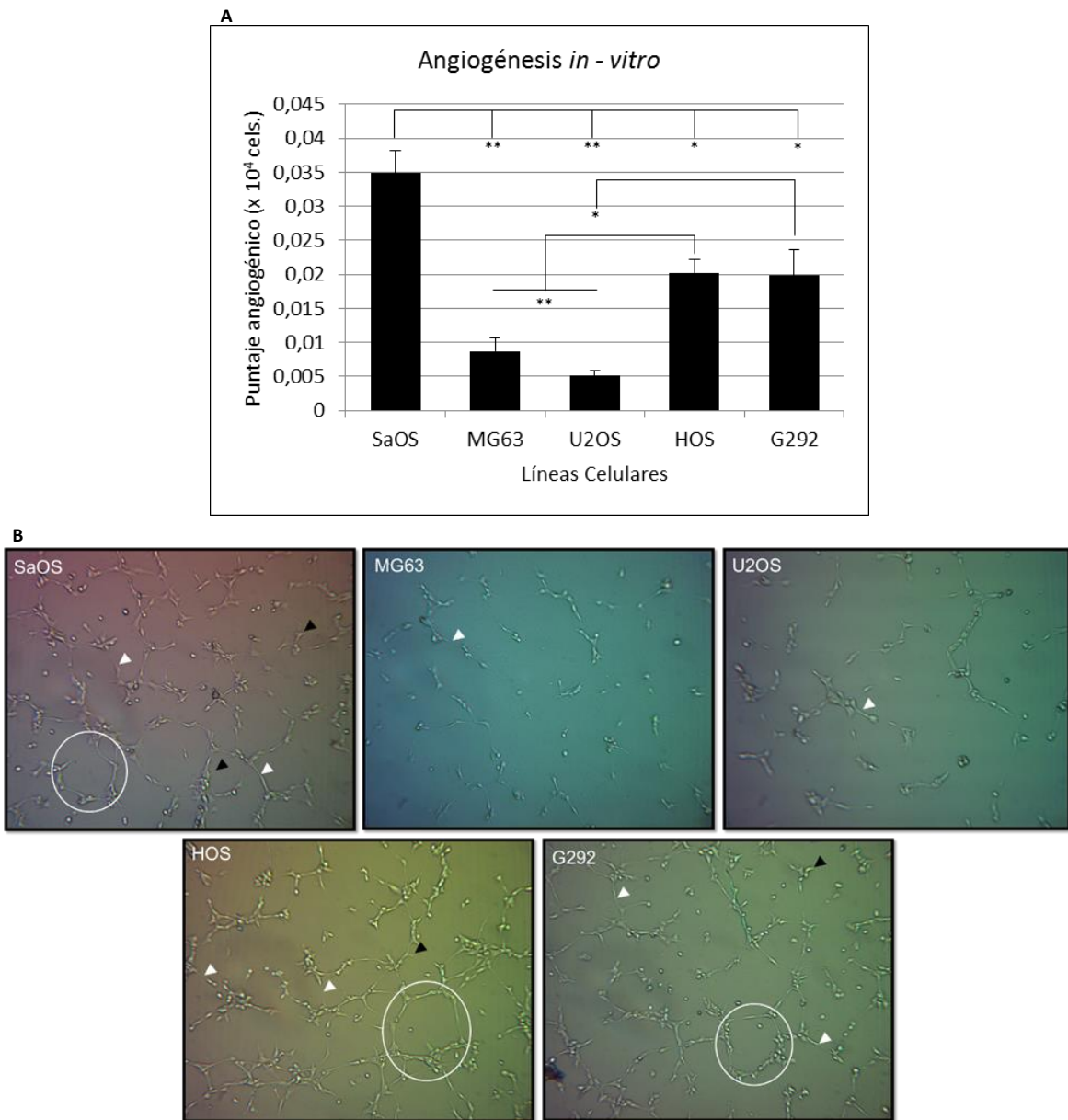


Figura n°3: Capacidad angiogénica de HUVECs sometidas a MCC de 5 líneas de OS humano. Se obtuvieron los MCC de las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292. Luego se sembraron las HUVECs en matrigel con los MCC y se analizó la formación de estructuras tubulares. **(A)** La capacidad angiogénica fue cuantificada mediante fórmula de puntaje angiogénico. **(B)** Se muestran imágenes representativas de angiogénesis *in-vitro* de líneas de OS humano.

Se observa un mayor puntaje (normalizado por 10000 células) en la línea SaOS que es la que presenta mayor expresión de Runx2. Por el contrario MG63 y U2OS son las líneas con menor puntaje angiogénico, siendo estas las con menores niveles de expresión de Runx2. **(B)** Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre líneas celulares se indican como *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$. (Círculo: polígono de ECs, flecha blanca: unión entre ECs y flecha negra: brote de ECs).

- *Objetivo 2: Identificar y determinar la expresión de genes blanco de Runx2 con función pro-angiogénica en células de osteosarcoma humano.*

Una vez establecida la correlación entre el nivel de expresión de Runx2 y la capacidad angiogénica contenida en el MCC de cada línea celular de osteosarcoma, se propuso identificar genes blanco de Runx2, que codifiquen para proteínas con función pro-angiogénica y que sean secretadas al medio extracelular. Con este fin, se realizó un análisis de dos bases de datos de microarray generadas en la línea celular SaOS. La primera fue generada al modular la expresión de Runx2 mediante siRNA, situación que modifica la abundancia del ARN mensajero transcrito a partir de genes regulados por este factor y que son detectados mediante el uso de Affymetrix microarray (Hu-U133Plus2 chips). Esta estrategia experimental está dirigida a la búsqueda de genes blancos putativos de Runx2 evidenciado por cambios en la modulación de sus respectivos niveles de transcritos (van der Deen, et al., 2012).

La segunda base datos de Chip on CHIP, fue generada al inmunoprecipitar regiones promotoras nativas que unen el factor transcripcional Runx2, que posteriormente son aisladas, amplificadas, marcadas y desafiadas contra un microarray de regiones promotoras (human HG18 Refseq promoter array). Esta estrategia está dirigida a la búsqueda de genes blancos cuyas regiones promotoras serían potencialmente reguladas por Runx2 (van der Deen, et al., 2012).

El total de genes potencialmente regulados por Runx2, seleccionados a partir de ambas bases de datos, fueron analizados mediante el software DAVID 6.7 (Functional Annotation Bioinformatics Microarray data base), que permitió la

selección 22 genes con función angiogénica, de los cuales solo 4 codifican para proteínas de secreción: Endotelina 1 (END1), Angiogenina (ANG), Colágeno tipo V alfa 1 (COL5A1) e Inductor angiogénico rico en cisteína 61 (CYR61) (Figura 4). El análisis in silico de las regiones promotoras de estos 4 genes mostro la presencia de sitios de unión para Runx2.

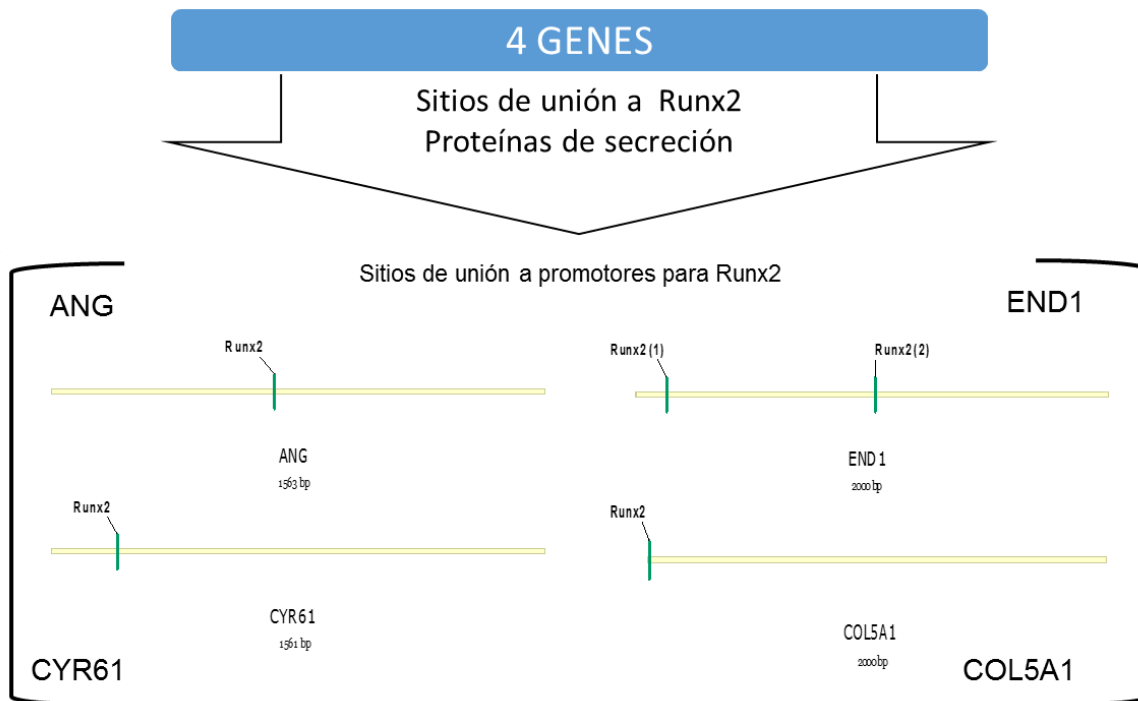
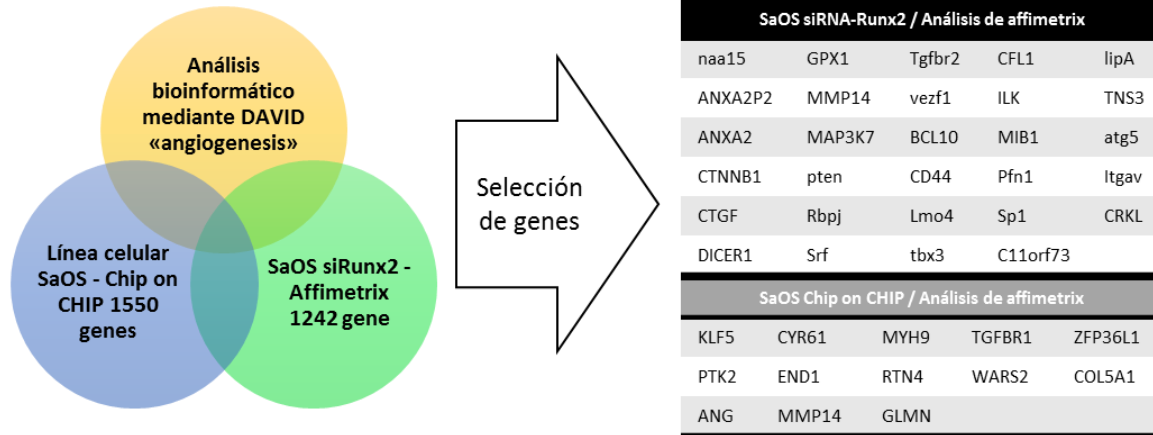


Figura n°4: Genes seleccionados con capacidad pro-angiogénica que codifican para proteínas de secreción y presentan sitios de unión para Runx2 en sus promotores. Se identificaron genes pro-angiogénicos utilizando un ensayo de siRNA-Runx2 y Chip on CHIP para Runx2 en la línea celular SaOS de osteosarcoma humano. En ambos casos el análisis fue realizado mediante affimetrix. Los genes identificados fueron analizados mediante el software bioinformático DAVID 6.7 (Functional Annotation Bioinformatics Microarray data base) permitiendo clasificarlos según su función. Se obtuvieron 42 genes relacionados a angiogénesis. 4 de estos genes (ANG, CYR61, END1 y COL5A1) codificaban para proteínas de secreción que a su vez presentan sitios de unión por parte de Runx2 en sus promotores.

Una vez identificado este grupo de genes blanco de Runx2 con función pro-angiogénica, se realizó un análisis del nivel de expresión de estos genes en cada una de las líneas celulares de osteosarcoma humano SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292, mediante cuantificación de los niveles de ARNm por PCR en tiempo real (Figura 5 A-E). Las líneas celulares SaOS (altos niveles de Runx2) y MG63 (niveles casi indetectables de Runx2) presentaron, de forma consistente y significativa, los mayores y menores niveles de expresión para COL5A1, CYR61, END1 y ANG, respectivamente. En las otras líneas celulares (U2OS, HOS y G292), que presentan niveles bajos o intermedios de Runx2, se observó una expresión variable de los genes pro-angiogénicos (COL5A1, CYR61, END1 y ANG) y cuyo rango de expresión varió entre lo detectado en SaOS y MG63.

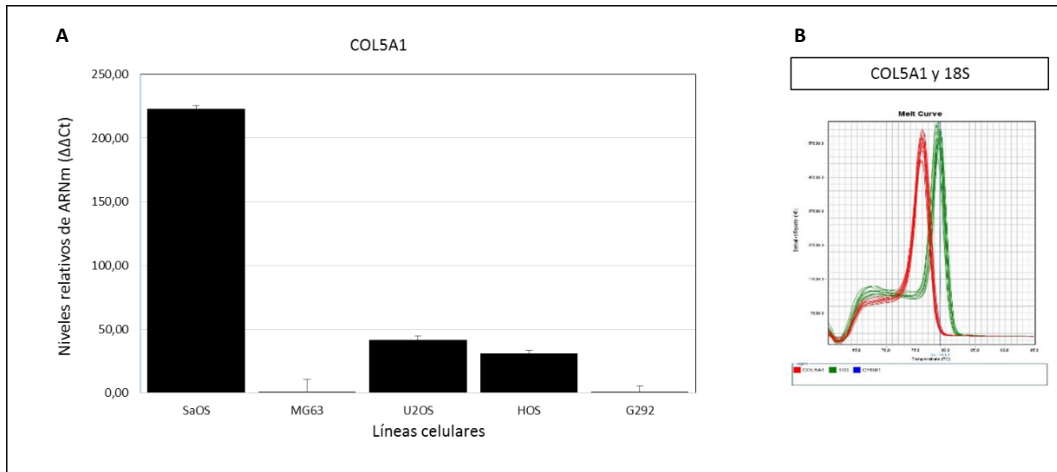


Figura n°5-A: Niveles de ARNm y curva de melting de COL5A1. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para COL5A1 fueron analizados mediante método $\Delta\Delta Ct$ para RT-PCR utilizando partidores específicos. **(A)** Cuantificación relativa del ARNm de COL5A1 mediante método RT-qPCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(B)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1 y el control endógeno 18S (verde).

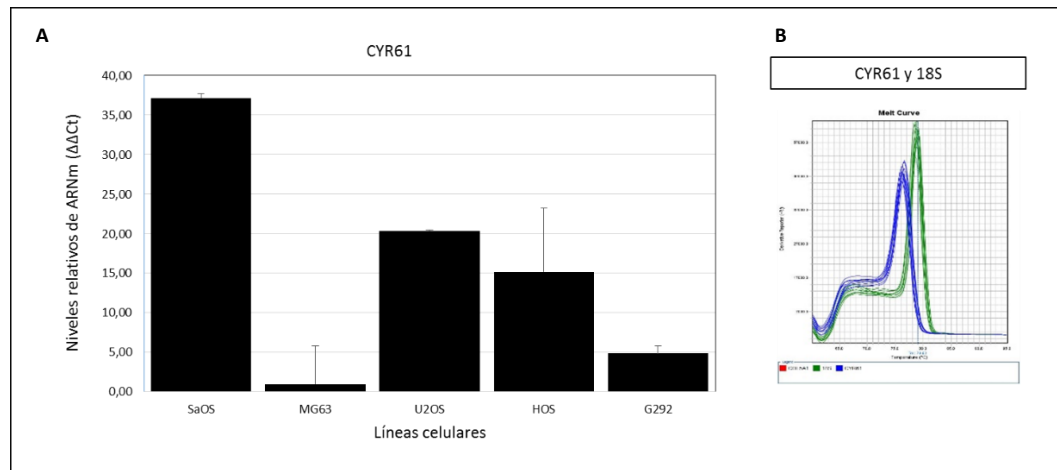


Figura n°5-B: Niveles de ARNm y curva de melting de CYR61. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para CYR61 fueron analizados mediante método $\Delta\Delta Ct$ para RT-qPCR utilizando partidores específicos. **(A)** Cuantificación relativa del ARNm de CYR61 mediante método RT-qPCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(B)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de CYR61 y el control endógeno 18S (verde).

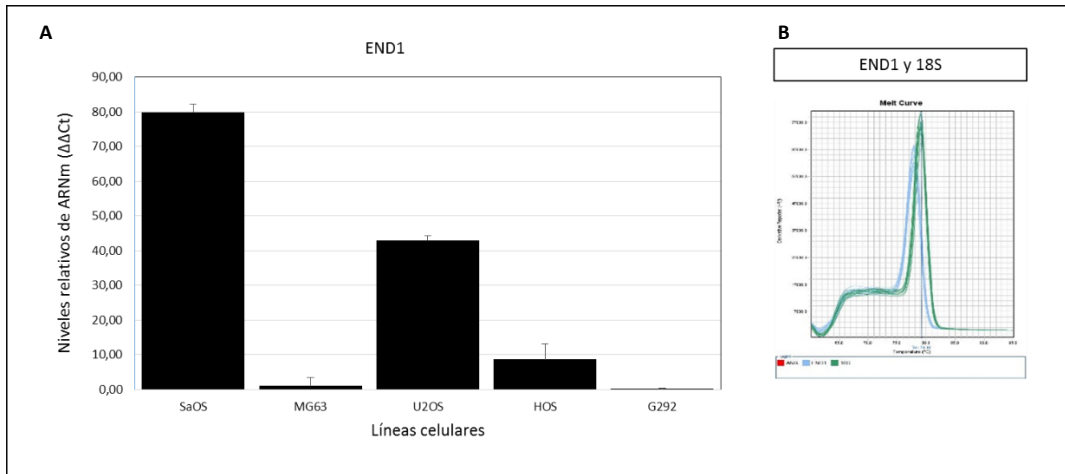


Figura n°5-C: Niveles de ARNm y curva de melting de END1. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para END1 fueron analizados mediante método $\Delta\Delta Ct$ para RT-qPCR utilizando partidores específicos. **(A)** Cuantificación relativa del ARNm de END1 mediante método RT-qPCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(B)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de END1 y el control endógeno 18S (verde).

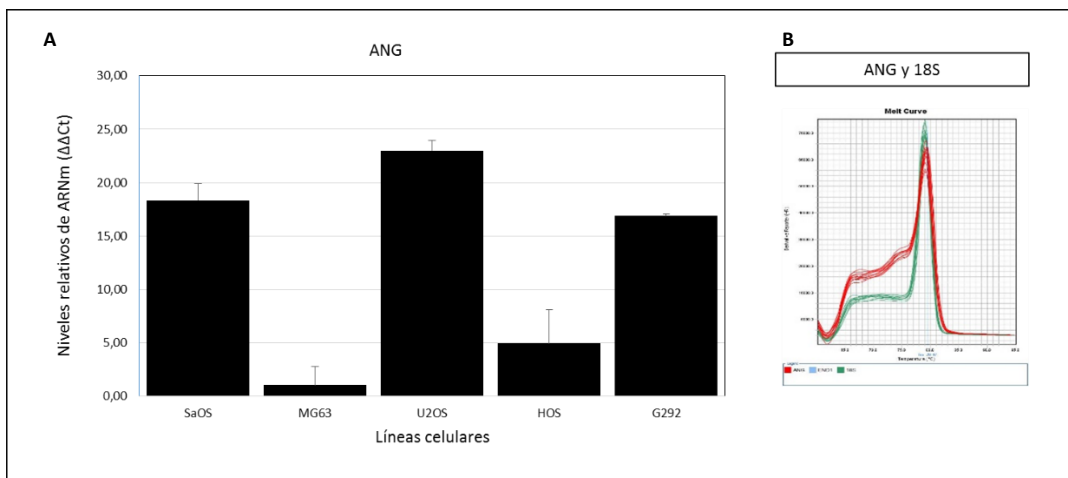


Figura n°5-D: Niveles de ARNm y curva de melting de ANG. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para ANG fueron analizados mediante método $\Delta\Delta Ct$ para RT-qPCR utilizando partidores específicos. **(A)** Cuantificación relativa del ARNm de ANG mediante método RT-qPCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(B)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de ANG y el control endógeno 18S (verde).

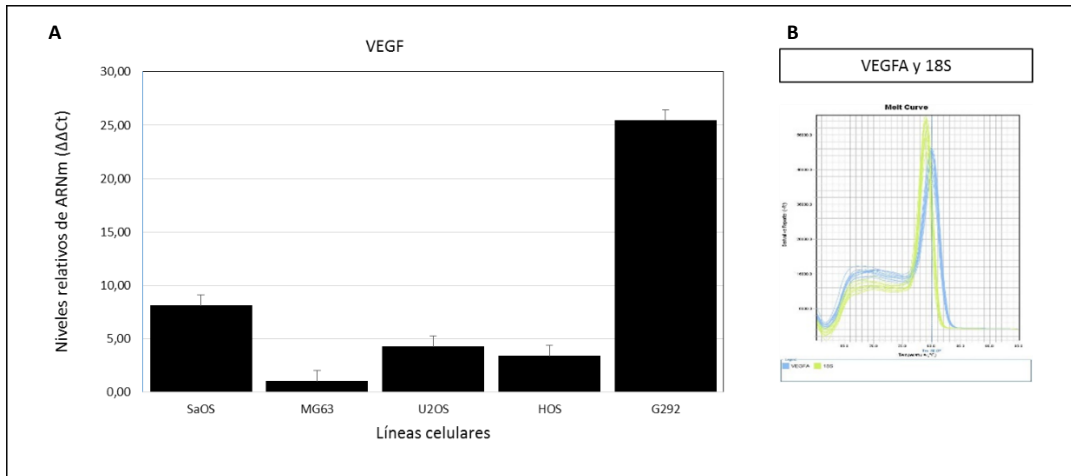


Figura n°5-E: Niveles de ARNm y curva de melting de VEGFA. Las líneas SaOS, MG63, U2OS, HOS y G292 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia, se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta Ct$ para RT-qPCR utilizando partidores específicos. **(A)** Cuantificación relativa del ARNm de VEGFA mediante método RT-qPCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(B)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de VEGFA y el control endógeno 18S (verde).

- *Objetivo 3: Analizar la función de Runx2 en la expresión de genes blanco pro-angiogénicos en células de osteosarcoma humano.*

Una vez validada la expresión de los genes COL5A1, CYR61, END1 y ANG en células de osteosarcoma humano, se procedió a evaluar la función de Runx2 como factor de transcripción en la regulación de la expresión de estos genes angiogénicos. Para esto se realizaron 2 estrategias, primero la sobre-expresión de Runx2, mediante infección con vector adenoviral en líneas celulares con baja e intermedia expresión de Runx2 y capacidad angiogénica (MG63, U2OS, HOS y G292), y en segundo lugar realización del knock-in de Runx2 mediante siRNA-Runx2 en una línea celular con elevada expresión de Runx2 y alta capacidad angiogénica (SaOS). En este análisis se incluyó, como control positivo, el gen VEGF caracterizado previamente como un conocido gen blanco de Runx2 (Zelzer, et al., 2001).

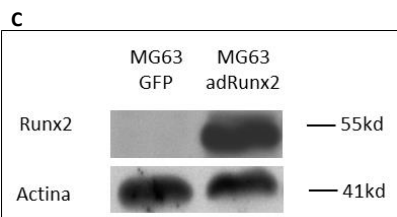
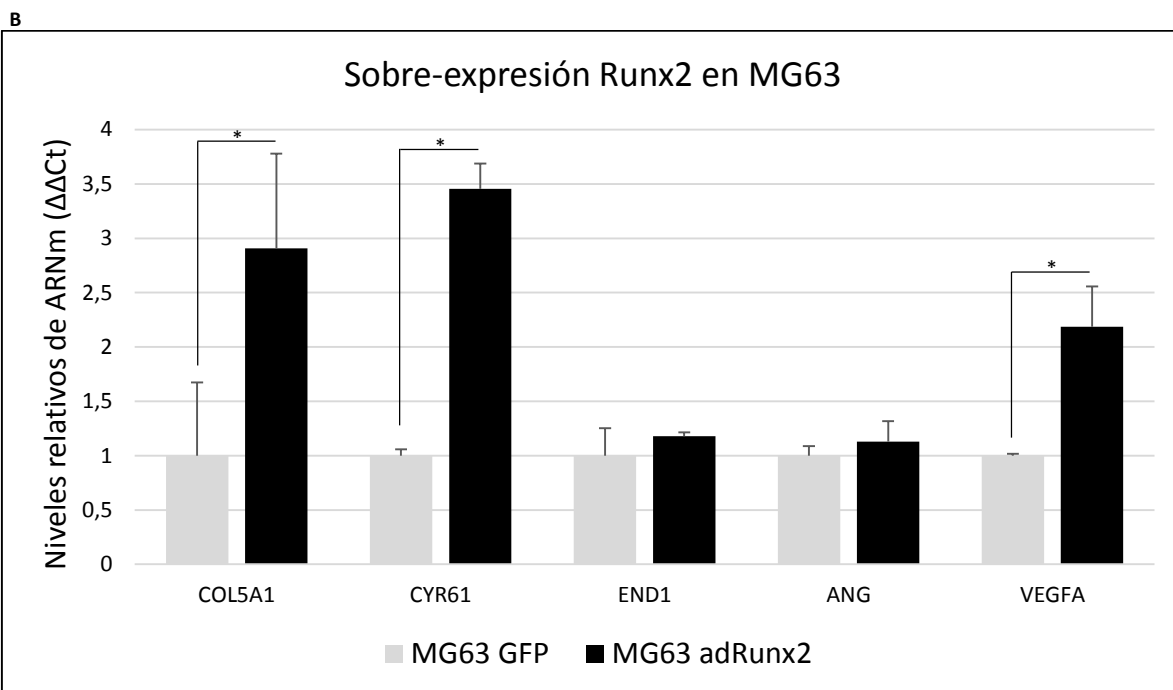
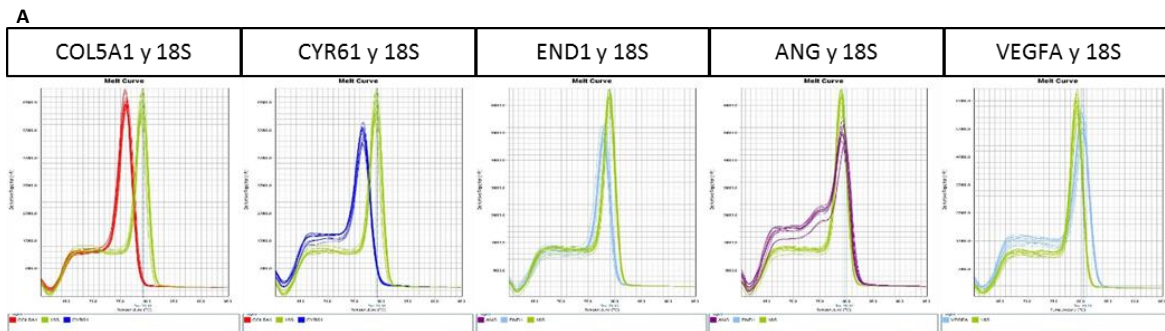
En la línea celular MG63, que exhibe niveles casi indetectables de Runx2, en respuesta a la sobre-expresión de Runx2 se observa un consistente y significativo aumento en los niveles de ARNm para COL5A1, CYR61 y VEGFA (Figuras 6).

En la línea celular U2OS, que presenta niveles bajos de Runx2, la sobre-expresión de Runx2 indujo un aumento en los niveles de mensajero para CYR61 y ANG, siendo este mayor y significativo para VEGFA, pero observo además una disminución en el nivel de transcritos para END1 (Figura 7).

En la línea celular HOS, que muestra niveles intermedios de Runx2, en respuesta a la sobre-expresión de Runx2 se observa un consistente aumento en los

niveles de ARNm para los cinco genes angiogénicos analizados, siendo este aumento mayor y significativo para CYR61, END1, ANG y VEGFA (Figuras 8).

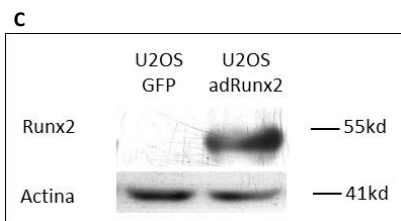
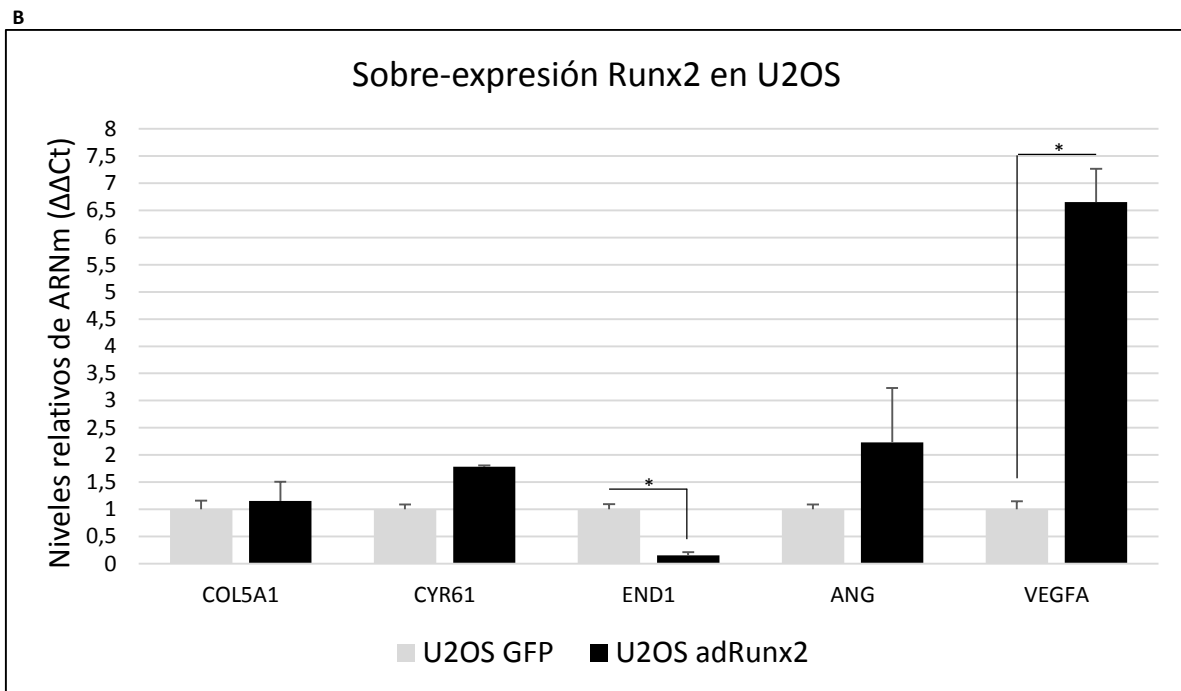
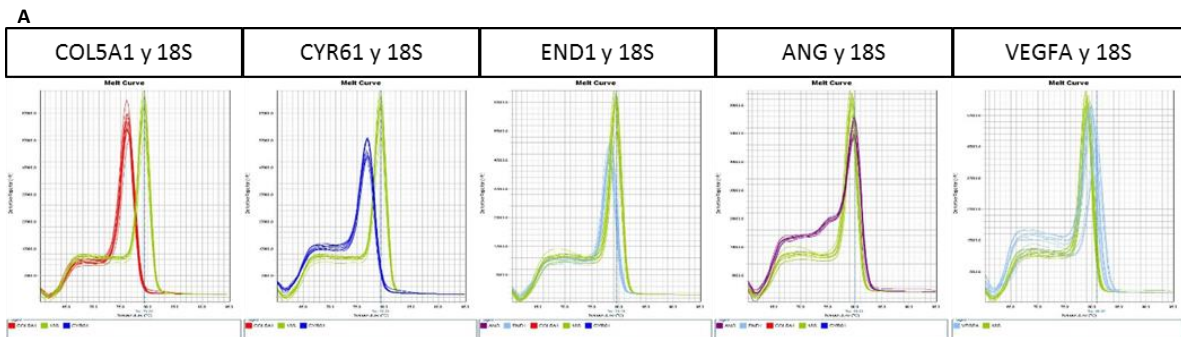
En la línea celular G292, que registra niveles intermedios de Runx2, se observó, en respuesta a la sobre-expresión de Runx2, un aumento en los niveles de ARNm para COL51A, CYR61 y VEGFA (Figura 9).



Figuras n°6: Niveles de ARNm y curvas de melting de los genes pro-angiogénicos al sobre-expresar Runx2 en la línea celular MG63. La línea celular MG63 fue cultivada hasta un 70-80% de confluencia y se transdujo con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Luego se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR utilizando partidores específicos.

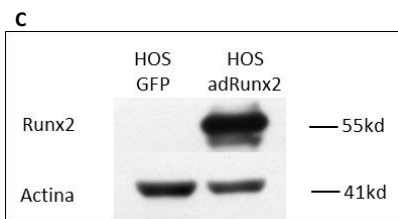
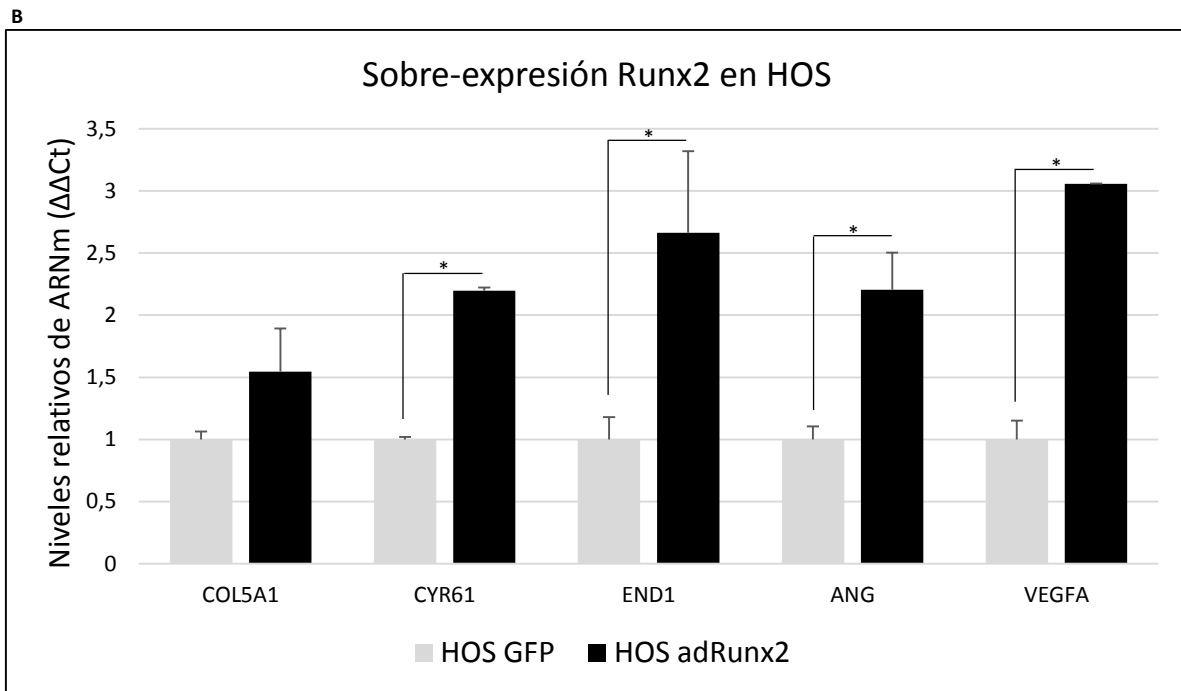
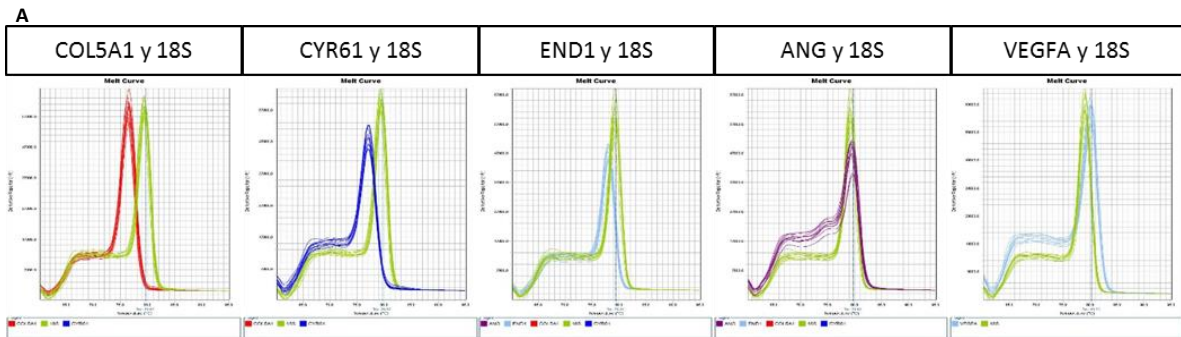
(A) Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el control endógeno 18S (en verde) en la línea celular MG63 de OS humano. **(B)** Cuantificación relativa del ARNm de los genes pro-angiogénicos mediante método RT-PCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2 y Actina. Se observa un aumento de la expresión de Runx2 al comparar la línea MG63 GFP (control) vs MG63 adRunx2 al sobre-expresar Runx2 mediante transducción adenoviral.

Las diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular control (GFP) respecto de la con sobre-expresión de Runx2 (adRunx2) se indican como *; $p < 0,05$.



Figuras n°7: Niveles de ARNm y curvas de melting de los genes pro-angiogénicos al sobre-expresar Runx2 en la línea celular U2OS. La línea celular U2OS fue cultivada hasta un 70-80% de confluencia y se transdujo con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Luego se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR utilizando partidores específicos. **(A)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el control endógeno 18S (en verde) en la línea celular U2OS de OS humano. **(B)** Cuantificación relativa del ARNm de los genes pro-angiogénicos mediante método RT-PCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2 y Actina. Se observa un aumento de la expresión de Runx2 al comparar la línea U2OS GFP (control) vs U2OS adRunx2 al sobre-expresar Runx2 mediante transducción adenoviral.

Las diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular control (GFP) respecto de la con sobre-expresión de Runx2 (adRunx2) se indican como *; $p < 0,05$.

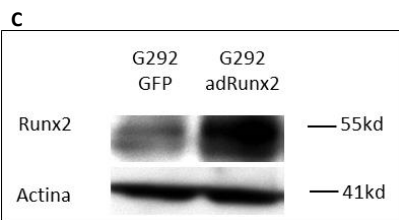
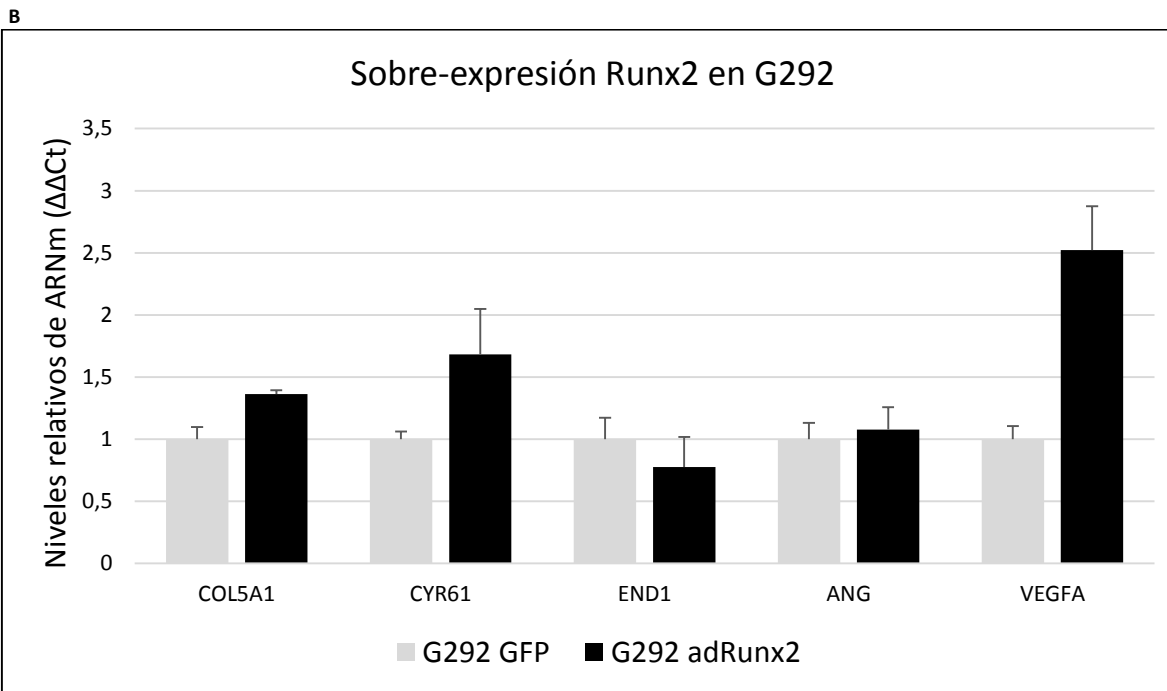
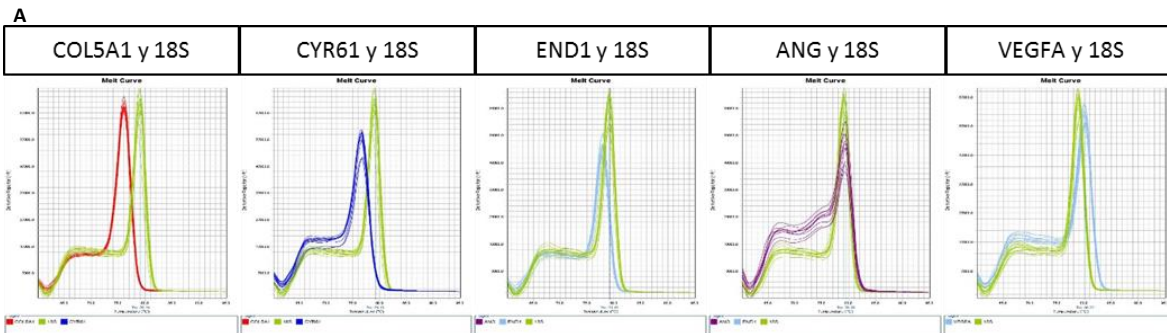


Figuras n°8: Niveles de ARNm y curvas de melting de los genes pro-angiogénicos al sobre-expresar Runx2 en la línea celular HOS.

La línea celular HOS fue cultivada hasta un 70-80% de confluencia y se transdujo con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Luego se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para

COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR utilizando partidores específicos. **(A)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el control endógeno 18S (en verde) en la línea celular HOS de OS humano. **(B)** Cuantificación relativa del ARNm de los genes pro-angiogénicos mediante método RT-PCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2 y Actina. Se observa un aumento de la expresión de Runx2 al comparar la línea HOS GFP (control) vs HOS adRunx2 al sobre-expresar Runx2 mediante transducción adenoviral.

Las diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular control (GFP) respecto de la con sobre-expresión de Runx2 (adRunx2) se indican como *; $p < 0,05$.



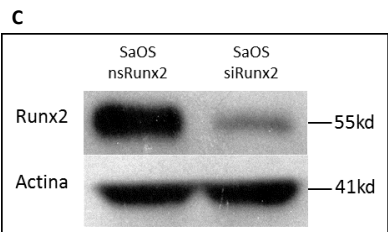
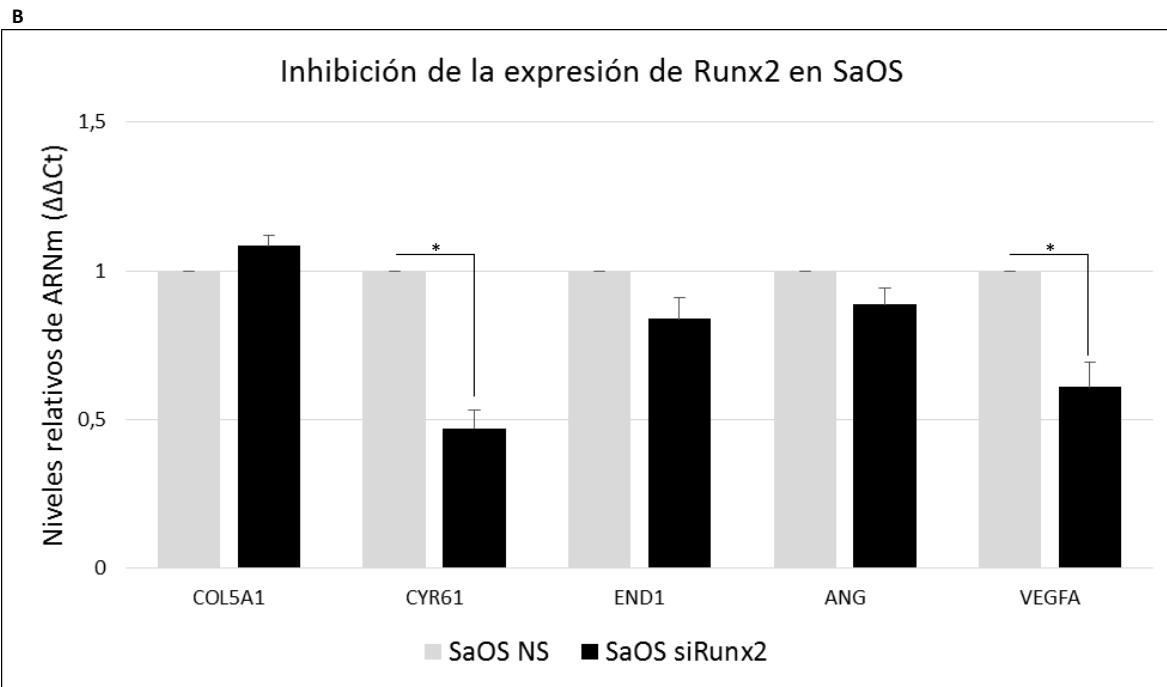
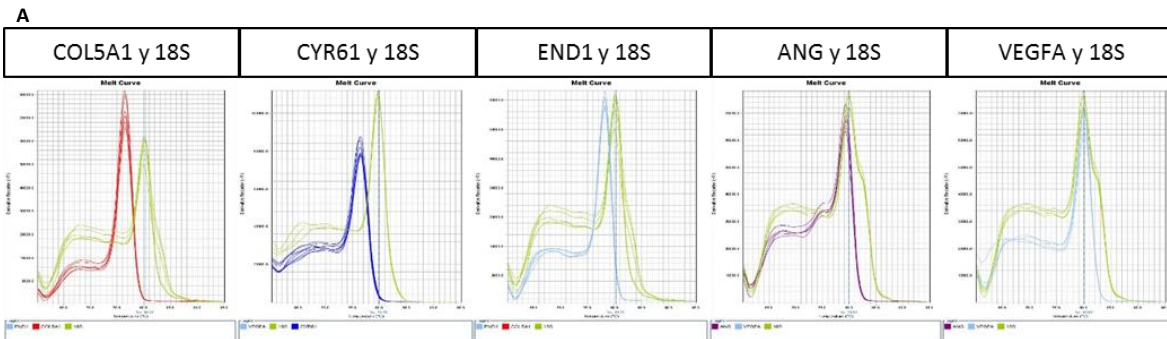
Figuras n°9: Niveles de ARNm y curvas de melting de los genes pro-angiogénicos al sobre-expresar Runx2 en la línea celular G292.

La línea celular G292 fue cultivada hasta un 70-80% de confluencia y se transdujo con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Luego se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para

COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR utilizando partidores específicos. **(A)** Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el control endógeno 18S (en verde) en la línea celular G292 de OS humano. **(B)** Cuantificación relativa del ARNm de los genes pro-angiogénicos mediante método RT-PCR. Las barras muestran datos (promedio \pm SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2 y Actina. Se observa un aumento de la expresión de Runx2 al comparar la línea G292 GFP (control) vs G292 adRunx2 al sobre-expresar Runx2 mediante transducción adenoviral.

Las diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular control (GFP) respecto de la con sobre-expresión de Runx2 (adRunx2) se indican como *; $p < 0,05$.

Para los experimentos de inhibición de la expresión de Runx2 y su efecto en la expresión de genes pro-angiogénicos, se seleccionó la línea celular SaOS por presentar altos niveles de la proteína Runx2 y alta capacidad angiogénica. Al silenciar la expresión de Runx2 mediante siRNA-Runx2 en SaOS, se observó una caída significativa de los niveles de CYR61 y VEGF (Figura 10).



Figuras n°10: Niveles de ARNm y curvas de melting de los genes pro-angiogénicos al inhibir la expresión de Runx2 en la línea celular SaOS.

La línea celular SaOS fue cultivada hasta un 60% de confluencia y se transfectó con un siRNA para inhibir la expresión de Runx2 o un non silencing (nsRNA). Luego se extrajo ARN total y los niveles de mensajero para COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA fueron analizados mediante método $\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR utilizando partidores específicos.

(A) Se muestran las curvas de melting de los partidores de COL5A1, CYR61, END1, ANG, VEGFA y el control endógeno 18S (en verde) en la línea celular SaOS de OS humano. **(B)** Cuantificación relativa del ARNm de los genes pro-angiogénicos mediante método RT-PCR. Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. **(C)**

Las diferencias estadísticamente significativas entre la línea celular control (NS) respecto de la con inhibición de la expresión de Runx2 (siRunx2) se indican como *; $p < 0,05$.

En resumen, de los cuatro genes angiogénicos analizados, se observó de manera consistente que los niveles de ARNm de CYR61 aumentaron en respuesta a la sobre-expresión de Runx2 en las líneas celulares MG63, U2OS, HOS y G292, siendo significativo este aumento en las líneas MG63 y HOS. Por otro lado, se observó una disminución significativa de los niveles de ARNm para CYR61, luego de silenciar la expresión del factor transcripcional Runx2 en la línea celular SaOS. En base a estos resultados se consideró confirmar si la regulación en los niveles de ARNm de CYR61, mediada por sobre-expresión o inhibición de Runx2 en MG63 y SaOS, respectivamente, se traduce en cambios en los niveles de la proteína CYR61.

El análisis inicial de los niveles de proteína CYR61 muestra que la línea celular SaOS exhibe altos niveles de esta proteína, mientras que la línea celular MG63 presenta bajos niveles de la proteína CYR61 (Figura 11), concordante con los niveles de ARNm observados en estos dos tipos celulares (Figura 5-B). Consecuentemente, la sobre-expresión de Runx2, mediada por vectores adenovirales, en la línea MG63 induce un incremento en los niveles de expresión de la proteína CYR61 (Figura 12), mientras que el silenciamiento de la expresión de Runx2 en la línea SaOS mediante siRNA-Runx2 produce una disminución en los niveles de la proteína CYR61 (Figura 13), siendo esta aún mayor en el caso del uso de shRNA-Runx2, mediada por vectores lentivirales (Figura 14). Estos resultados muestran que en células de osteosarcoma Runx2 puede regular la expresión de proteínas de secreción con capacidad angiogénica.

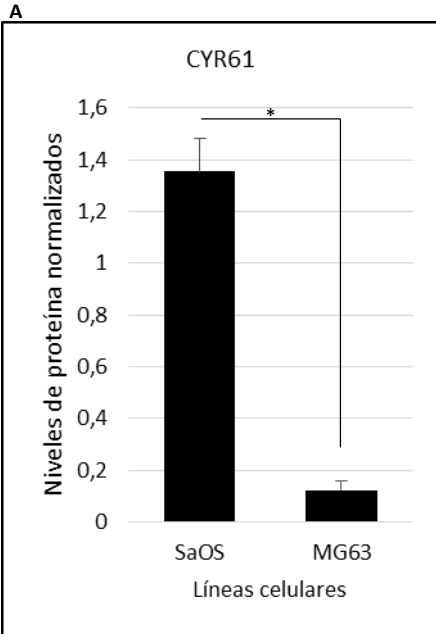
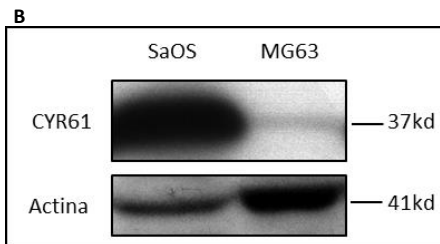


Figura n°11: Niveles de proteína de CYR61 en SaOS y MG63.

Las líneas SaOS y MG63 fueron cultivadas hasta una confluencia del 80%. Se extrajo proteína total, y los niveles de CYR61 y actina fueron analizados mediante western blot. **(A)** Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por actina. **(B)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para CYR61 y Actina. Se observa una mayor expresión de CYR61 en la línea celular de OS humano SaOS y muy bajos para la línea MG63.

(A) Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como *, $p < 0,05$: expresión de SaOS vs MG63.



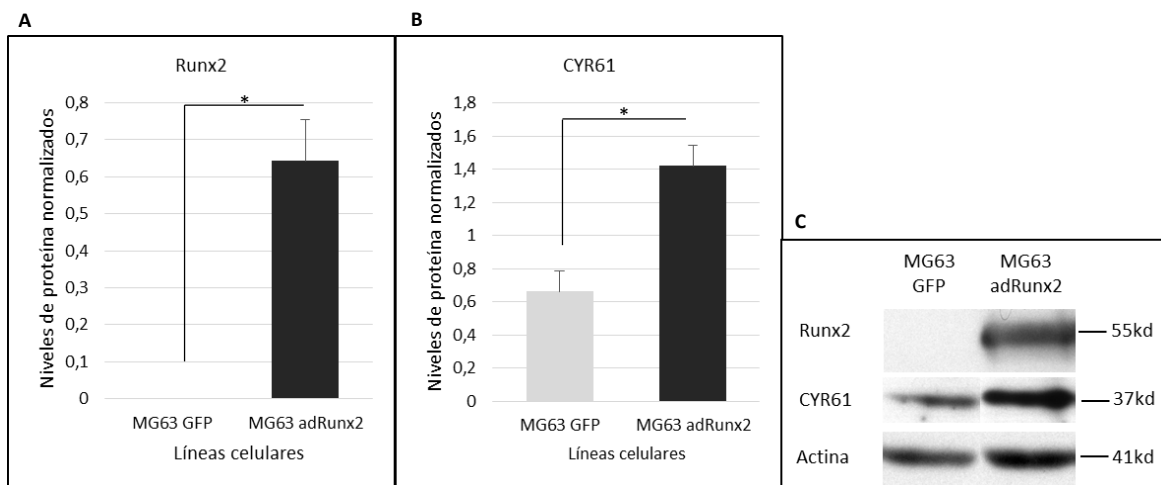


Figura n°12: Niveles de proteína de Runx2 y CYR61 al sobre-expresar Runx2 en MG63. La línea MG63 fue cultivada hasta una confluencia del 70-80%. Se transdujo con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Luego se extrajo proteína total, y los niveles de Runx2, CYR61 y Actina fueron analizados mediante western blot. Los niveles de proteína de Runx2 **(A)** y Cyr61 **(B)** fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por actina. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2, CYR61 y Actina. Se observa un aumento significativo de la expresión de la proteína de Runx2 y CYR61, en la línea celular MG63 de OS humano.

(A) Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como *, $p < 0,05$: expresión de MG63 GFP vs MG63 adRunx2.

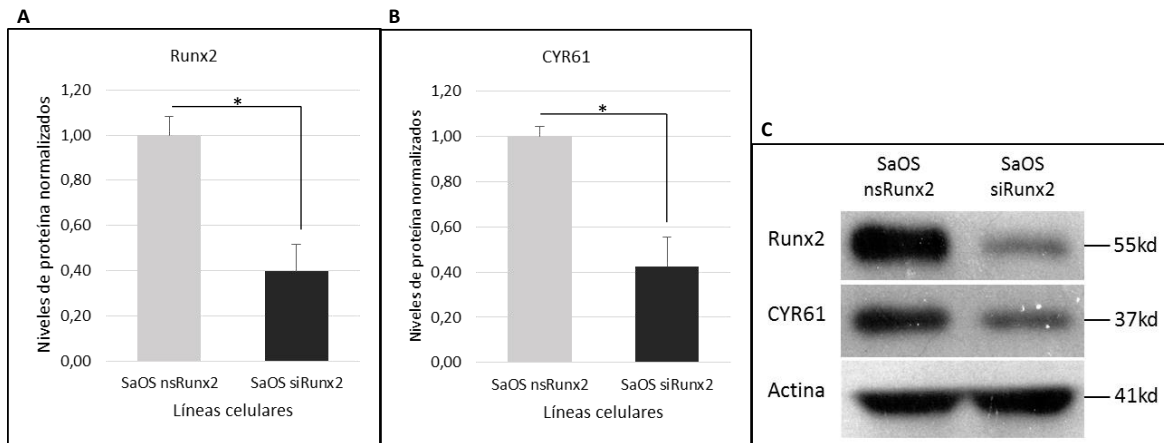


Figura n°13: Niveles de proteína de Runx2 y CYR61 al inhibir la expresión de Runx2 en SaOS. La línea SaOS fue cultivada hasta una confluencia del 60%. Se transfectó con un RNA interferente (siRNA) para inhibir la expresión de Runx2 o un control inespecífico (non silencing). Luego se extrajo proteína total, y los niveles de Runx2, CYR61 y Actina fueron analizados mediante western blot. Los niveles de proteína de Runx2 **(A)** y Cyr61 **(B)** fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por actina. **(C)** Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2, CYR61 y Actina. Se observa una disminución significativa de la expresión de la proteína de Runx2 y CYR61, en la línea celular SaOS de OS humano con siRNA para Runx2.

(A y B) Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como *, $p < 0,05$: expresión de SaOS nsRunx2 vs SaOS siRunx2.

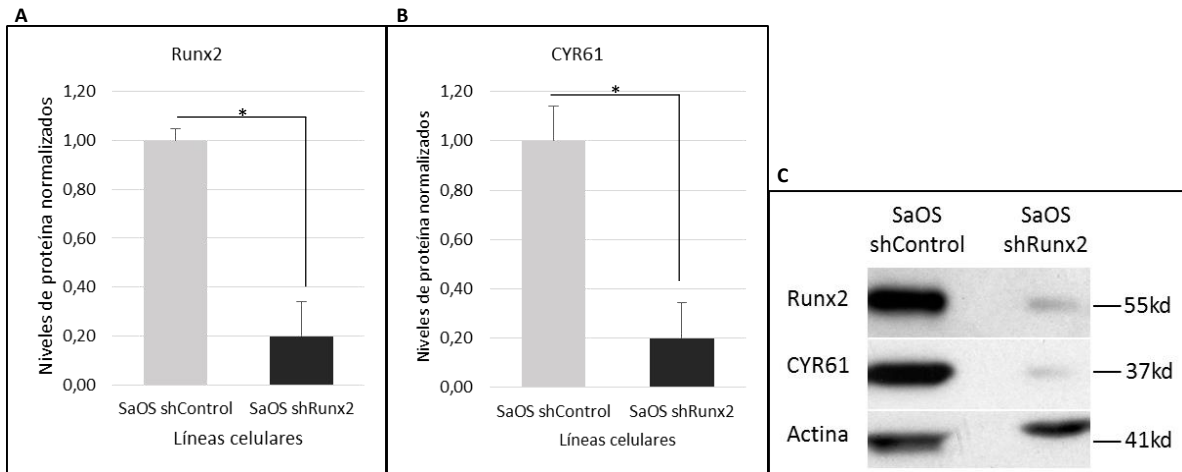


Figura n°14: Niveles de proteína de Runx2 y CYR61 al inhibir la expresión de Runx2 en SaOS. Se utilizó la línea celular previamente transfectada con un shRNA para inhibir de manera estable la expresión de Runx2 o un shControl. Esta línea celular fue cultivada hasta una confluencia del 70-80%. Luego se extrajo proteína total, y los niveles de Runx2, CYR61 y Actina fueron analizados mediante western blot. Los niveles de proteína de Runx2 (**A**) y Cyr61 (**B**) fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados por actina. (**C**) Se muestra un resultado representativo de las bandas inmunoreactivas obtenidas para Runx2, CYR61 y Actina. Se observa una disminución significativa de la expresión de la proteína de Runx2 y CYR61, en la línea celular SaOS de OS humano con shRNA para Runx2.

(**A y B**) Las barras muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como *, $p < 0,05$: expresión de SaOS shControl vs SaOS shRunx2.

- *Objetivo 4: Determinar el rol funcional de Runx2 en la capacidad angiogénica de células de osteosarcoma humano.*

Con el fin de establecer el rol funcional de Runx2 en la capacidad que las células del osteosarcoma ejercen sobre células endoteliales para desarrollar un proceso neo-angiogénico tumoral, se realizó un ensayo *in-vitro* de formación de estructuras tubulares en matrigel utilizando células HUVECs estimuladas con MCC, obtenido a partir del cultivo de células de osteosarcoma con sus niveles de Runx2 modulados por sobre expresión o silenciamiento. Así, al utilizar MCC obtenido del cultivo de células MG63 que sobre-expresan Runx2, se observa un aumento significativo de su capacidad angiogénica (Figura n°15 A-C).

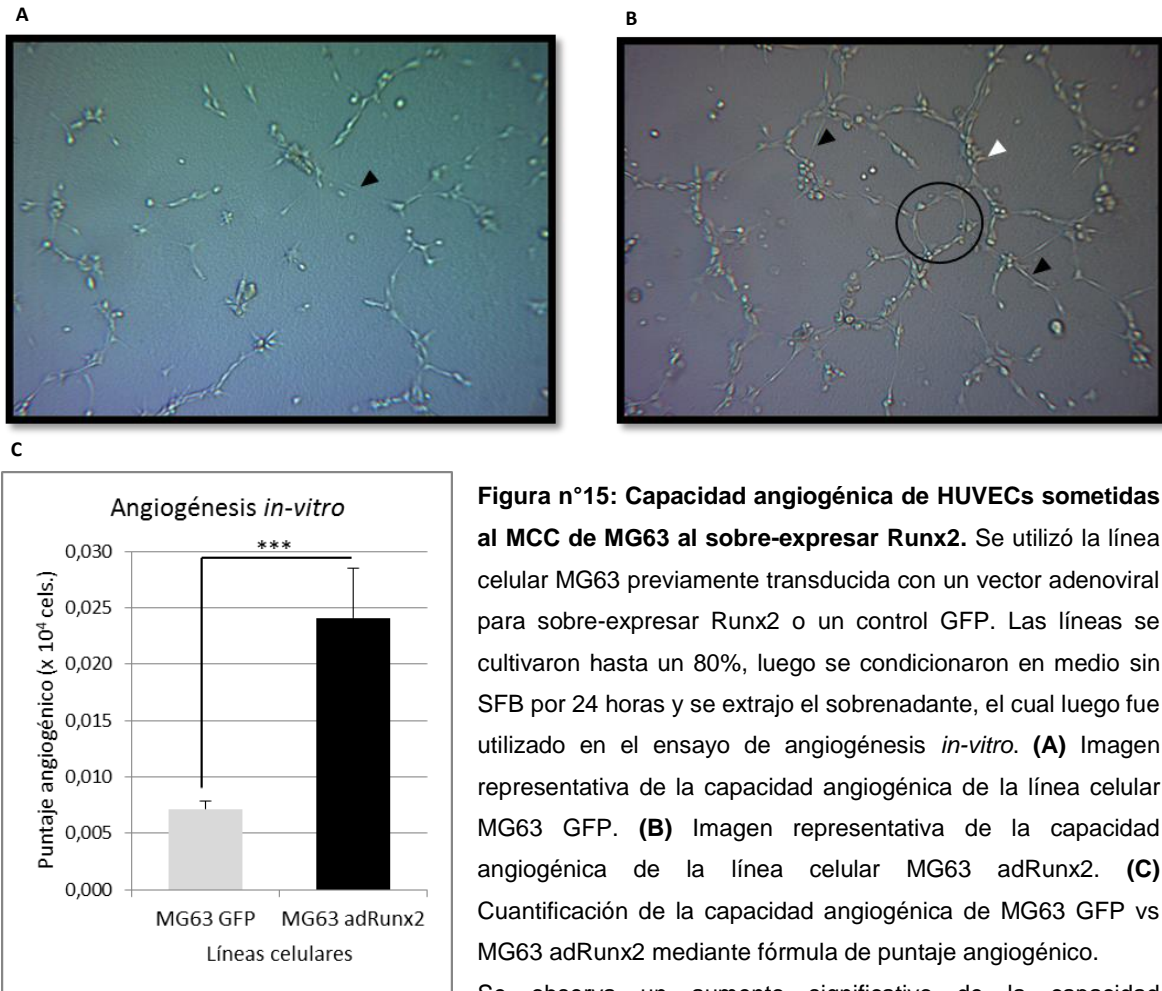


Figura n°15: Capacidad angiogénica de HUVECs sometidas al MCC de MG63 al sobre-expresar Runx2. Se utilizó la línea celular MG63 previamente transducida con un vector adenoviral para sobre-expresar Runx2 o un control GFP. Las líneas se cultivaron hasta un 80%, luego se condicionaron en medio sin SFB por 24 horas y se extrajo el sobrenadante, el cual luego fue utilizado en el ensayo de angiogénesis *in-vitro*. **(A)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular MG63 GFP. **(B)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular MG63 adRunx2. **(C)** Cuantificación de la capacidad angiogénica de MG63 GFP vs MG63 adRunx2 mediante fórmula de puntaje angiogénico.

Se observa un aumento significativo de la capacidad angiogénica del medio de MG63 adRunx2 vs el de MG63 GFP. Las barras **(C)** muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como ***, p<0,001: expresión de MG63 GFP vs MG63 adRunx2.

(Círculo: polígono de ECs. Flecha negra: unión entre ECs. Flecha blanca: brote de ECs).

Por el contrario, la estimulación de las células HUVECs con el MCC obtenido del cultivo de células SaOS con una expresión silenciada de Runx2, mediante uso de siRNA y shRNA, muestra una disminución significativa de la capacidad angiogénica tanto como con el siRNA-Runx2 (Figuras n°16 A-C) como con el shRNA-Runx2 (Figura n°17 A-C), siendo mayor la caída en este último.

Estos resultados proponen el rol funcional de Runx2 para modular la capacidad tumoral de inducir neo-angiogénesis a través de la regulación de la expresión de moléculas pro-angiogénicas secretadas que ejercen una señalización sobre las células endoteliales para inducir neo-vascularización del tumor.

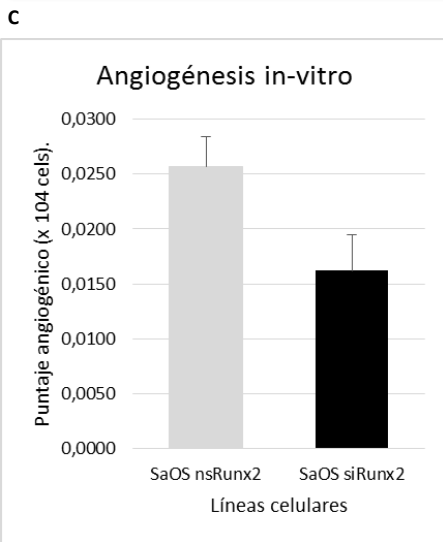
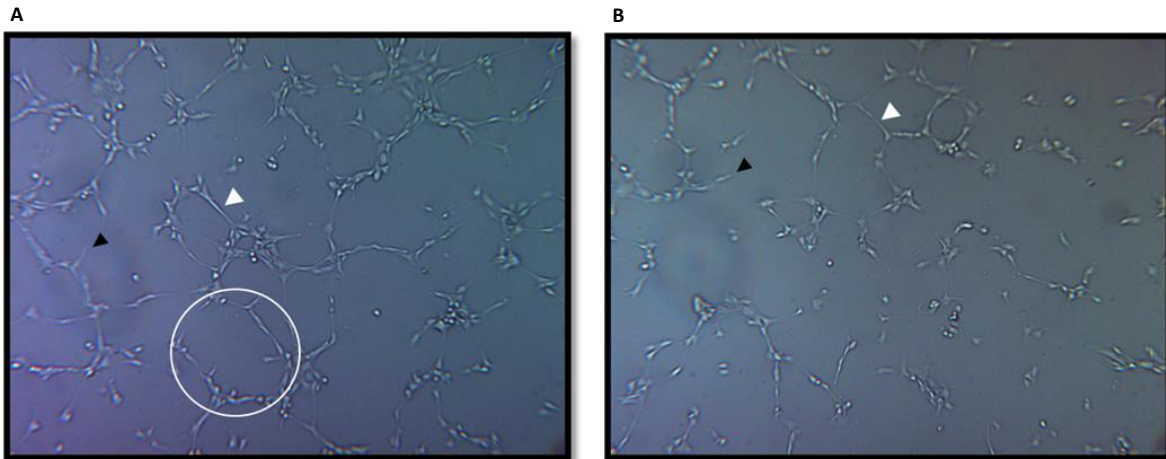


Figura nº16: Capacidad angiogénica de HUVECs sometidas al MCC de SaOS al inhibir Runx2. Se utilizó la línea celular SaOS previamente transfectada con un siRNA para inhibir la expresión de Runx2 y un control nsRNA-Runx2. Las líneas se cultivaron hasta un 80%, luego se condicionaron en medio sin SFB por 24 horas y se extrajo el sobrenadante, el cual luego fue utilizado en el ensayo de angiogénesis *in-vitro*. **(A)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular SaOS nsRunx2. **(B)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular SaOS siRunx2. **(C)** Cuantificación de la capacidad angiogénica de SaOS nsRunx2 vs SaOS siRunx2 mediante fórmula de puntaje angiogénico. Se observa una disminución de la capacidad angiogénica del medio de SaOS siRunx2 vs SaOS nsRunx2. Las barras **(C)** muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. (Círculo: polígono de ECs. Flecha blanca: unión entre EC. Flecha negra: brote de EC).

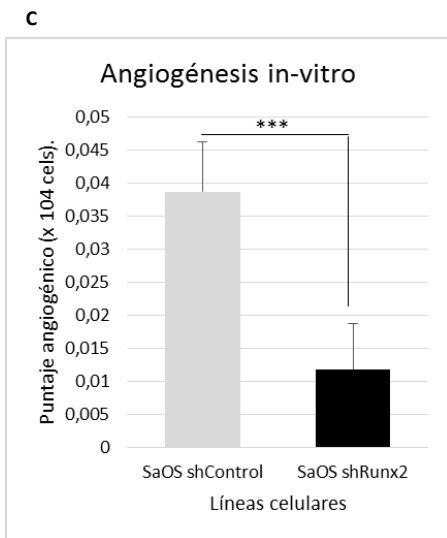
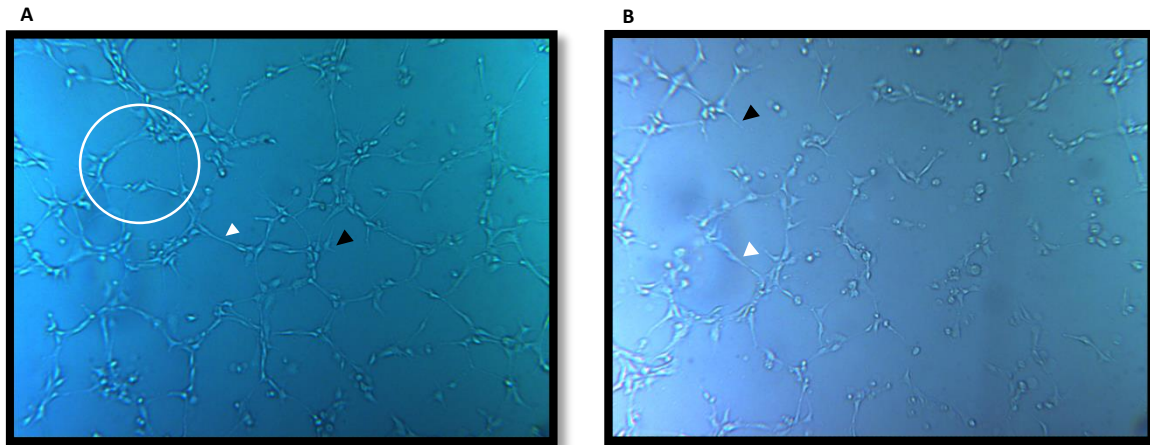


Figura n°17: Capacidad angiogénica de HUVECs sometidas al MCC de SaOS al inhibir Runx2. Se utilizó la línea celular SaOS previamente transfectada con un shRNA-Runx2 para inhibir la expresión de Runx2 y un control shRNA-Control. Las líneas se cultivaron hasta un 80%, luego se condicionaron en medio sin SFB por 24 horas y se extrajo el sobrenadante, el cual luego fue utilizado en el ensayo de angiogénesis *in-vitro*. **(A)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular SaOS shControl. **(B)** Imagen representativa de la capacidad angiogénica de la línea celular SaOS shRunx2. **(C)** Cuantificación de la capacidad angiogénica de SaOS shControl vs SaOS shRunx2 mediante fórmula de puntaje angiogénico. Se observa una disminución de la capacidad angiogénica del medio de SaOS shRunx2 vs SaOS shControl.

Las barras **(C)** muestran datos (promedio +/- SEM) obtenidos de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas respecto de otra línea celular se indican como ***, $p < 0,001$: expresión de SaOS shControl vs SaOS shRunx2.

(Círculo: polígono de ECs. Flecha blanca: unión entre ECs. Flecha negra: brote de ECs).

DISCUSIÓN

Expresión de Runx2 y angiogénesis en células de osteosarcoma humano.

El osteosarcoma corresponde a una enfermedad de etiología desconocida y heterogénea respecto a su asociación a diversas alteraciones genéticas (Broadhead, et al., 2011; Savage and Mirabello, 2011). Esto nos lleva a la utilización de distintas líneas celulares de osteosarcoma humano para así tener un grupo de estudio más heterogéneo, similar a lo que uno puede encontrar en la clínica, de modo de evitar proyecciones erróneas de los distintos resultados obtenidos siendo que demos más o menos importancia a lo caracterizado en una u otra línea celular. En osteosarcoma ha observado una asociación entre la expresión de Runx2 y la clínica. Es así como se observa una aumentada expresión de este factor en tumores que responden mal a la quimioterapia en comparación con los que tienen buena respuesta. Más aún se observó que altos niveles de Runx2 se correlacionan con metástasis y una tendencia hacia menor sobrevida (Martín, et al., 2011). Además, se ha observado una asociación entre la angiogénesis tumoral, revelada mediante análisis de inmunohistoquímica para VEGF y una menor sobrevida global y libre de enfermedad (Chen, et al., 2013), siendo también en algunos casos, los niveles de expresión de VEGF, asociados a una mayor densidad microvascular (Kaya, et a., 2000; Chen, et al., 2012) y desarrollo de metástasis (Kaya, et al., 2000; Jung, et a., 2005; Lin, et al., 2011; Qu, et al., 2011; Lampli, et al., 2012).

Para determinar esta asociación entre expresión de Runx2 y angiogénesis se realizó un análisis de la expresión de la proteína de Runx2 en distintas líneas de

osteosarcoma humanas además de un ensayo de angiogénesis *in-vitro*. Interesantemente la línea SaOS mostró los mayores niveles de proteína para Runx2 así como también la mayor capacidad angiogénica. Del mismo modo la línea MG63 que presentó niveles casi nulos de expresión de Runx2 mostró la menor capacidad de angiogénesis *in-vitro*. Las líneas celulares U2OS, HOS y G292 presentaron niveles bajos (U2OS) a intermedios (HOS y G292) de expresión de Runx2 al igual que su capacidad angiogénica.

En el caso de las todas las líneas celulares analizadas se observa una correlación entre la expresión de Runx2 y la capacidad para promover angiogénesis *in-vitro*, siendo más llamativa esta asociación en las líneas SaOS y MG63. Debemos considerar que Runx2 posee la capacidad de modular la expresión de distintos genes, pudiendo corresponder algunos de ellos a genes que codifican para proteínas de secreción y estas ejercer una eventual función angiogénica. De hecho, experimentos *ex-vivo* y estudios utilizando ratones transgénicos han demostrado que Runx2 regula la expresión de VEGF tanto en osteoblastos como condroblastos, durante el proceso de osificación endocondral (Salnikow, et al., 2002). Además, la sobre-expresión de Runx2 en fibroblastos se asocia a un aumento de la expresión de VEGF total y su proteína secretada (Zelzer, et al., 2001). En cáncer de próstata la expresión de Runx2 está asociada a la expresión de dos genes angiogénicos, VEGF y MMP9, los cuales aumentan su expresión en respuesta a una sobre-expresión de Runx2 en líneas celulares de cáncer prostático (Akech, et al., 2010). En líneas celulares de cáncer de mama también se ha observado que la

modulación, mediada por Runx2, de la expresión de los genes VEGF y MMP9, se asocia a una mayor capacidad de invasión y metástasis (Pratap, et al., 2006).

Runx2 controla genes blanco angiogénicos en líneas celulares de osteosarcoma humano.

Interesantemente, experimentos ChIP on Chip en células SaOS destinado al análisis de unión de Runx2 a regiones promotoras del genoma, muestra que este factor se une preferentemente a la secuencia TGTGGT como principal sitio de unión, dentro de las primeras 2000 pares de bases (Meyers, et al., 1993). Sin embargo, también han sido validados, como sitios de unión a Runx2, las combinaciones 5´-(T/A/C)G(T/A/C)GG(T/G) (van der Deen, et al., 2012). Al realizar la búsqueda de sitios de unión mediante el software TFSEARCH encontramos las siguientes secuencias específicas para cada uno de los genes seleccionados. Específicamente CYR61, ANG y VEGFA poseen 2, 2 y 3 sitios de unión a Runx2, respectivamente. Dentro de esto la secuencia TGTGGT está presente tanto en CYR61 como ANG. En el caso de VEGFA se encuentran presentes las secuencias TGCTGT en 1 de los sitios. COL51 posee sólo un sitio de unión con un 92% de homología para TGCGGT. Finalmente END1 posee 2 sitios de unión con un 88,7% de homología para TGAGGT.

La línea SaOS que expresa los mayores niveles de Runx2, presentó altos niveles de ARNm cada uno de estos genes angiogénicos, por el contrario la línea

MG63 que presenta los menores niveles de Runx2, presentó los niveles más bajos de ARNm para cada uno de estos genes.

Analizados los niveles de mensajeros de los genes blanco de Runx2 seleccionados, realizamos la sobre-expresión de Runx2 con el fin de analizar su rol en la regulación de la expresión de estos genes. Interesantemente al sobre-expresar Runx2, CYR61 aumento sus niveles de expresión en todas las líneas celulares analizadas. CYR61 es expresado durante el desarrollo embrionario en condensaciones de células mesenquimáticas (O'Brien and Lau, 1992). Su expresión permite el proceso de diferenciación condrocítica a nivel del esbozo de extremidades (Wong, et al., 1997). Esta expresión aumenta en etapas más avanzadas del desarrollo esquelético, asociada a los condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento (Latinkic, et al., 2001). Interesantemente, CYR61 favorece la diferenciación de osteoblastos a través de su función sobre la vía $\alpha\beta3$ /ILK (Si, et al., 2006; Su, et al., 2010), pero inhibe la osteoclastogénesis, permitiendo así la formación de tejido óseo e inhibiendo su reabsorción (Crockett, et al., 2007). Así, es interesante considerar que como Runx2 se expresa gradualmente durante las etapas de diferenciación osteoblástica, podría estar regulando los niveles de CYR61 asociados a la formación de esqueleto.

CYR61 es expresada en células de osteosarcoma humanas y sus niveles se correlacionan con los de Runx2

Anteriormente ya mencionamos que CYR61 poseía sitios de unión para Runx2 en su región promotora. De este modo es que se realizó un análisis de la expresión de la proteína de CYR61 en las líneas celulares MG63 y SaOS, considerando que estas son las que expresan los menores y mayores niveles de Runx2, respectivamente. Así, se observó que los niveles de mensajero y proteína para CYR61 se encuentra en bajos niveles en MG63 y altos en SaOS y por otro lado sus niveles aumentan al sobre-expresar Runx2 en MG63, mientras que disminuyen al silenciar Runx2 en SaOS. Además, CYR61 es uno de los genes que fue consistentemente modulado por la sobre-expresión de Runx2 en otras líneas celulares (U2OS, HOS y G292). Estos resultados obtenidos, junto a los resultados del potencial angiogénico exhibido por las líneas celulares SaOS y MG63, permiten observar una relación entre altos o bajos niveles de expresión de Runx2 y CYR61, con una alta o baja capacidad de angiogénesis *in-vitro*.

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado sabemos que CYR61 (CCN1) es una proteína rica en cistina, miembro de la familia de proteínas CCN (Lv, H., et al., 2009; Koon, H., et al., 2008). Corresponde a una proteína de secreción, asociada a matriz extracelular, que participa en la regulación de distintas funciones celulares tanto fisiológicas como patológicas (Athanasopoulos, A.N., et al., 2007; Leu, S., et al., 2002). Su unión a distintos receptores se encuentra asociada a funciones tales como adhesión, migración, diferenciación, invasividad, senescencia, sobrevida y apoptosis celular, síntesis y proliferación de DNA y expresión de genes

(Lau, L.F., 2011; Lau, L.F. and Chen, C., 2009). A su vez participa en distintos procesos fisiológicos como angiogénesis y desarrollo cardiovascular y desarrollo osteocartilaginoso durante el período embrionario, como también en procesos fisiopatológicos como reparación tisular y fibrosis (miofibroblastos, cardiomiocitos, tejido vascular y osteocartilaginoso en proliferación), procesos inflamatorios (enfermedad inflamatoria intestinal y artritis) y enfermedades vasculares (retinopatía y re-estenosis post-angioplastía) (Lau, L.F., 2011; Lau, L.F. and Chen, C., 2009).

En relación a cáncer, se ha observado la expresión de CYR61 en cáncer mamario, en sus fenotipos más agresivos (Tsai, M., et al., 2000 y 2002), en gliomas asociado a mayor vascularización tumoral (Xie, D., et al., 2004a y 2004b), en adenocarcinoma gástrico más agresivo con mayor compromiso de linfonodos y recurrencia asociada (Lin, M., et al., 2005), en cáncer de páncreas asociado a desarrollo de metástasis (Holloway, S.E., et al., 2005; Sun, S.J., et al., 2008) y en cáncer de próstata más agresivo (Lv, H., et al. 2009).

En biopsias humanas de osteosarcoma la expresión de CYR61 esta aumentada, al ser comparadas con tejido óseo normal, y se correlaciona con pobre supervivencia (Sabile, A.A., et al. 2012, Fromigue, O., et al. 2011). La expresión de CYR61 es mayor aún en las metástasis y máxima en las muestras asociadas a recurrencia. Esta expresión aumenta con el grado tumoral y se correlaciona con su agresividad (Fromigue, O., et al. 2011). El silenciamiento de CYR61 muestran una disminución de la capacidad migratoria e invasiva tanto de líneas celulares de OS murinas como humanas, por el contrario su sobre-expresión conduce a un aumento de ambas cualidades. Además este silenciamiento se asocia a un pequeño aumento

de la apoptosis celular favoreciendo la respuesta de los distintos agentes quimioterapéuticos utilizados en OS (Fromigue, O., et al. 2011).

En modelo murino de osteosarcoma, la sobre-expresión de CYR61 en células tumorales se correlaciona con un aumento del número y tamaño de las metástasis pulmonares *in vivo* (Fromigue, O., et al. 2011), así como también con una mayor velocidad de crecimiento del tumor primario, número y densidad tumoral metastásica pulmonar, y menor sobrevida murina (Sabile, A.A., et al. 2012). Por otro lado la inhibición de la expresión de CYR61 se asocia a una reducción de la frecuencia de metástasis.

En esta tesis se ha demostrado una relación funcional entre la expresión de Runx2 y la regulación de la expresión del gen CYR61. Runx2 es reconocido en distintos tipos de cáncer, como el de próstata y mama, como un factor asociado a parámetros de progresión tumoral, y por otro lado la expresión de CYR61 está asociada a mayor progresión tumoral en diversos tipos de cáncer, incluyendo osteosarcoma. Interesantemente, tanto Runx2 como CYR61 son expresados en osteosarcoma y se asocian a una mayor agresividad de este. Específicamente, nuestros datos experimentales sugieren que Runx2 regularía el proceso de neo-angiogénesis tumoral a través de la modulación de la expresión de los genes pro-angiogénicos CYR61, COL5a1, END1, ANG y VEGFA.

Runx2 promueve la angiogénesis en osteosarcoma.

De acuerdo a los resultados en relación al control de la expresión de Runx2 sobre genes angiogénicos existen diversos antecedentes, en cáncer de próstata y mama, que vinculan el rol de Runx2 con progresión tumoral y específicamente con los genes VEGF, OPN y MMP9, que participan en el proceso angiogénico. Sin embargo el rol de Runx2 en angiogénesis tumoral no ha sido demostrado a la fecha.

En base a la hipótesis planteada que considera que el factor de transcripción Runx2 promueve la angiogénesis en osteosarcoma, se realizaron experimentos de angiogénesis *in-vitro* realizando la sobre-expresión de Runx2 en la línea MG63 y el silenciamiento de la expresión de Runx2 en la línea SaOS. En el primer caso se observó un aumento significativo de la capacidad angiogénica del MCC, obtenido del cultivo de células MG63 que sobre expresaron Runx2, sobre células HUVECs. Por otro lado en el caso del silenciamiento de la expresión en células SaOS, se realizaron dos experimentos, uno con siRNA-Runx2 y un segundo con shRNA-Runx2. En ambos casos se obtuvo una disminución de la capacidad angiogénica del MCC obtenido del cultivo de células SaOS con silenciamiento de Runx2, siendo más significativa esta disminución en el caso del uso de shRNA. Al sobre-expresar Runx2 en MG63 observamos un claro aumento en la expresión de CYR61 lo que se asocia a este aumento de angiogénesis *in-vitro*, mientras que al silenciar la expresión de Runx2 en SaOS se produce una caída en la expresión de CYR61, lo que se asocia a una mayor disminución de la angiogénesis *in-vitro*.

CYR61, ejercería su función angiogénica a través de la inducción de la migración de células microvasculares humanas endoteliales que se evidencia en un modelo de neo-vascularización en corneas de ratas (Babic, A.M., et al. 1998). La actividad angiogénica de CYR61 puede ser atribuida a su acción sobre la integrina $\alpha\beta3$, la cual es expresada en la superficie de las células endoteliales, vía que mediaría en estas células las funciones de migración, adhesión celular, proliferación, supervivencia y formación de estructuras tubulares (angiogénesis *in vitro*) (Leu, S., et al. 2002). De hecho, la proteína CYR61 con el sitio de unión a integrina mutado, carece de actividad pro-angiogénica sobre células HUVECs (Chen, N., et al. 2004).

En relación con esta función angiogénica, se ha observado en un modelo murino *in vivo*, con expresión nula para el gen de CYR61, una insuficiencia en el desarrollo vascular placentario (Mo, F., et al. 2002), como también defectos en el desarrollo cardiovascular (Mo, F. and Lau, L.F. 2006). Además, se ha establecido que CYR61 participa en la regulación positiva del factor angiogénico VEGF-A (Chen, C., et al. 2001) como también en el reclutamiento de progenitores CD34 positivos, lo que se asocia a mayor proliferación y neo-vascularización (Grote, K., et al. 2007). Además en cáncer pancreático se observa un alza de la expresión de CYR61 y de la integrina $\alpha\beta3$, tanto en el tumor primario como en sus metástasis peritoneales. Más aun, el modelo ortotópico de este cáncer en ratón demuestra una inmunohistoquímica positiva para CYR61 tanto en el tumor primario como en sus metástasis, siendo mayor en estas últimas. A su vez también se observa marcación

positiva para $\alpha\beta 3$ tanto en el tumor primario como las metástasis, y una colocalización de CYR61 con este receptor (Holloway, S.E., et al., 2005).

También VEGFA, reconocido por su capacidad angiogénica, se ha visto relacionado con la expresión de Runx2. Existe evidencia que, durante el desarrollo embrionario, Runx2 estaría regulando la expresión de VEGF. Ratones Knockout Runx2^{-/-} presentan una alteración en la diferenciación osteoblástica y en la vascularización de la médula ósea (Otto, et al., 1997), como también falla en la vascularización a nivel del cartílago (Kim, et al., 1999). Además en ratones wild-type se observa una expresión positiva de VEGF en condrocitos hipertróficos, mientras que en el ratón knockout Runx2^{-/-} hay una ausencia de esta, como también falta de la inducción de sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en las células endoteliales pericondriales. Más aun, la sobre-expresión de Runx2 induce un aumento en la transcripción y producción del VEGF secretado (Zelzer, et al., 2001).

Finalmente, existe evidencia que indicaría que VEGF estimula la producción de CYR61 en una línea celular primaria de osteoblastos humanos, cuyo MCC es utilizado para estimular la formación de estructuras tubulares *in vitro* por células HUVECs. Al comparar la actividad angiogénica del MCC obtenido de osteoblastos previamente estimulada con VEGFA, con el MCC obtenido de osteoblastos en ausencia de tratamiento con VEGF, se obtiene una mayor capacidad angiogénica, dependiente de una mayor expresión de CYR61 y consecuentemente mayor cantidad de este en el MCC (Athanasopoulos, et al., 2007). Esto sugiere que, durante el proceso de neo-angiogénesis tumoral, Runx2 regularía la expresión de

VEGF y que a su vez tanto Runx2 como un efecto autocrino de VEGF, podrían actuar sinérgicamente para regular la expresión de CYR61.

Así, en esta tesis hemos logrado establecer el rol funcional de Runx2 en la regulación positiva del proceso de neo-angiogénesis tumoral, asociado a la modulación de la expresión de genes blancos pro-angiogénicos en células de osteosarcoma.

CONCLUSIONES

- Se demostró por primera vez el rol funcional de Runx2 en la capacidad angiogénica de células tumorales, en particular en líneas celulares de osteosarcoma humano.
- Existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de Runx2 y la capacidad angiogénica en líneas celulares de osteosarcoma humano.
- Runx2 modula la angiogénesis y la expresión de los genes pro-angiogénicos COL5A1, CYR61, END1, ANG y VEGFA, y de la proteína de CYR61 en líneas celulares de osteosarcoma humano.
- Se propone el rol funcional de Runx2 para modular la capacidad tumoral de inducir neo-angiogénesis a través de la regulación de la expresión de moléculas pro-angiogénicas secretadas que ejercen una señalización sobre las células endoteliales para inducir neo-vascularización del tumor.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla III. Tablas con resumen de ensayos de ensayos de metástasis *in vivo*, utilizando líneas celulares de osteosarcoma humano en modelo murino inmunosuprimido. Tabla III-A presenta ensayos ortotópicos, tabla III-B de inyección en cola y tabla III-C subcutáneos. En cada una se detalla línea celular, cepa de ratón, método de inyección, tiempo de medición del tumor primario y/o metástasis pulmonares, metástasis extra-pulmonares y autor.

Tabla III-A

ENSAYO ORTOTÓPICO						
Línea Celular	Cepa Ratón	Método inyección	Tpo. medición tumor 1rio.	1ra. MTT pulmonar	MTT extra - pulmonares	Autor
SaOS-2	Balb/c Nude ^{1,10,12,23} NOD/SCID ¹⁶	Percutáneo tibia ^{1,10,12,16,23,26}	20d ¹ 4 sem ¹² 112d ¹⁶ 2 sem ²³ 3 sem ²⁶	<35d ¹ , 12sem ¹² No ¹⁶ 4 sem ²³ 3 sem (micro) 5 sem (macro) ²⁶	No ¹⁶ Sospecha ²³	¹ Dass 2006 ¹⁰ Dass 2007 ¹² Xu 2009 ¹⁶ Yuan 2009 ²³ Lin 2012 ²⁶ Dass 2007
SaOS-LM7	NOD/SCID ¹⁶	Percutáneo tibia ¹⁶	8 sem ¹⁶	70d ¹⁶	No ¹⁶	¹⁶ Yuan 2009
U2OS	Balb/c nude ¹ NOD/SCID ¹⁶	Percutáneo tibia ^{1,16}	No ¹	No ¹ Si (tiempo ND) ¹⁶	No ¹⁶	¹ Dass 2006 ¹⁶ Yuan 2009
143B	Balb/c nude ^{1,5,8} athymic nude ² , NCRnu/nu (nude) ³ NOD ⁶ NOD/SCID ¹⁶ Nu/NuFoxN1 Nu ¹⁷ SCID/CB ^{17,20} Athymic ²⁷	Percutáneo tibia ^{1,2,6,16,17,20,27} Cirugía ^{8,13}	18d ¹ 2sem ^{2,8,16} 9d (subc) ³ 3sem ¹³ 8d ¹⁷ 7d ²⁰ 4sem ²⁷	Sólo micromet. ¹ 4sem ² 30 d ³ 27 d ⁶ 6 sem ¹³ 35 d ¹⁶ 21 d ²⁰	Pared costal ² Orejuela auricular ⁶ No ¹⁶	¹ Dass 2006, ² Luu2005 ³ Guo 2008 ⁶ Brennecke 2013 ⁸ Gomes 2007 ¹³ Tome 2009 ¹⁶ Yuan 2009 ¹⁷ Shapovalov ²⁰ Gvozdenovic ²⁷ Luo 2008
T85 (HOS)	athymic nude ² SCID ¹¹ NOD/SCID ¹⁶	Percutáneo tibia ^{2,16} Percutáneo y cirugía ¹¹	No ^{2,16} 4-6sem ¹¹	No ² 8 sem (escasas) ¹¹	No en hígado ¹¹ No ¹⁶	² Luu 2005 ¹¹ Yang 2007 ¹⁶ Yuan 2009
MNNG/HOS	Athymic nude ² Balb/c nude ⁸	Percutáneo tibia ² Cirugía ^{8,13}	2sem ² 1sem ⁸ 3sem ³	Sólo micromet. ² 6sem ¹³		² Luu 2005 ⁸ Gomes 2007 ¹³ Tome2009
KRIB (v-Ki-ras HOS)	Athymic nude ²⁵ Balb/c nude ²⁴	Percutáneo tibia ^{24,25}	4sem ²⁵	4sem ²⁵ Sí ²⁴	No ²⁵	²⁵ Berlin 1993 ²⁴ Labrinidis 2009
K-HOS	Balb/c nude	Percutáneo tibia	14d	4-6sem		²⁴ Labrinidis 2009
MG63	Athymic nude ⁴ NOD/SCID ¹⁶ Athymic ²⁷	Percutáneo tibia anterior ^{4,16,27}	4sem ⁴ 116d ¹⁶ No ²⁷	8 a 10sem ⁴ No ¹⁶		⁴ Su 2009 ¹⁶ Yuan 2009 ²⁷ Luo 2008
MG63.2	Athymic nude	Percutáneo tibia anterior	2sem	4sem		⁴ Su 2009
G292	SCID NOD/SCID ¹⁶	Percutáneo tibia ¹⁶ Percutáneo y cirugía ¹¹	2sem ¹¹ No ¹⁶	6-8sem ¹¹ No ¹⁶	No en hígado ¹¹ No ¹⁶	¹¹ Yang 2007 ¹⁶ Yuan 2009

Tabla III-B

ENSAYOS DE INYECCIÓN EN COLA					
Línea Celular	Cepa Ratón	Primera señal pulmonar	1ra. MTT pulmonar	MTT extra - pulmonares	Autor
SaOS-LM6	Athymic nude		8 sem (macro) 5-6 sem (micro)		Jia 1999
SaOS2-LM7	Athymic nude ^{1,2,3}	3-5sem (microm) ³	6 sem ³		¹ Li 2006 ² Goguet 2013 ³ Jia 2002
SaOS-2	Balb/c nude ⁵		16,21 sem	No	⁵ Kimura 2002
G292	Balb/c nude ⁵		No	No	⁵ Kimura 2002
Hos	Balb/c nude ⁵		No	No	⁵ Kimura 2002
U2OS	Balb/c nude ⁵ Cr1:nu/un (CD-1) BR athymic mice ¹⁸		No ⁵ 8sem ¹⁸	No ⁵	⁵ Kimura 2002 ¹⁸ Manara 2000
MG63	Balb/c nude ⁵		No	No	⁵ Kimura 2002
HuO9	Balb/c nude ⁵		16 sem	No	⁵ Kimura 2002

Tabla III-C

ENSAYOS SUBCUTÁNEOS						
Línea Celular	Cepa Ratón	Método inyección	Tpo. medición tumor 1rio.	1ra. MTT pulmonar	MTT extra - pulmonares	Autor
SaOS-2	Balb/c nude ⁵ NOD/SCID ⁷ SCID ¹⁹	Flanco	Sí (>30d) ⁷ Sí (16sem) ¹⁹ No ⁵			⁵ Kimura2002 ⁷ Lauvrak 2013 ¹⁹ Pereira 2009
T85 (HOS)	Balb/c nude ⁵ NOD/SCID ⁷	Flanco	Sí (10-20d) ⁷ No ⁵			⁵ Kimura2002 ⁷ Lauvrak 2013
MG63	Balb/c nude ⁵ NOD/SCID ⁷ Athymic ²⁷	Flanco	Sí (>120d) ⁷ No ⁵ No ²⁷			⁵ Kimura2002 ⁷ Lauvrak 2013 ²⁷ Luo 2008
G292	Balb/c nude ⁵ NOD/SCID ⁷	Flanco	Sí (60-80d) ⁷ Si ⁵			⁵ Kimura2002 ⁷ Lauvrak 2013
U2OS	Balb/c nude ⁵ NOD/SCID ⁷ Cr1:nu/nu (CD-1)BR athymic mice ¹⁸	Flanco	Sí (>100d) ⁷ No ⁵			⁵ Kimura2002 ⁷ Lauvrak 2013 ¹⁸ Manara 2000
HuO9	Balb/c nude ⁵		Sí ⁵			⁵ Kimura2002
143B	NOD/SCID ⁷ Athymic nude Foxn1 ^u ⁹	Flanco ⁷	Sí (10-20d) ⁷	No ⁹	No ⁹	⁷ Lauvrak 2013 ⁹ Zhang 2013
HOS-MNNG	NOD/SCID ⁷	Flanco	Sí (10-20d) ⁷			⁷ Lauvrak 2013
LM8 (Ratón)	C3H/HeNcrI ²¹	Flanco	Sí (7d) ²¹	25d ²¹	Hígado ²¹	²¹ Arlt 2011

BIBLIOGRAFÍA

1. Akech, J., Wixted, J.J., Bedard, K., et al. Runx2 Association with Progression of Prostate Cancer in Patients: Mechanisms Mediating Bone Osteolysis and Osteoblastic Metastatic Lesions. *Oncogene*, 11:29, 2010.
2. Ambartsumian, N., Klingelhöfer, J., Grigorian, M., et al. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, 20:4685-95, 2001.
3. Andela, V.B., Siddiqui, F., Groman, A., et al. An immunohistochemical analysis to evaluate an inverse correlation between Runx2/Cbfa1 and NFκB in human osteosarcoma. *J. Clin. Pathol.*, 58:328-30, 2005.
4. Angstadt, A.Y., Thayanithy, V., Subramanian, S., et al. A genome-wide approach to comparative oncology: high-resolution oligonucleotide aCGH of canine and human osteosarcoma pinpoints shared microaberrations. *Cancer Genet.*, 205(11):572-87, 2012.
5. Aranda, E. and Owen, G.I. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol. Res.* 42:377-89, 2009.
6. Asou, Y., Rittling, S.R., Yoshitake, H., et al. Osteopontin Facilitates Angiogenesis, Accumulation of Osteoclasts, and Resorption in Ectopic Bone. *Endocrinology*, 142:1325-32, 2001.
7. Athanasopoulos, A.N., Schneider, D., Keiper, T., et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Up-regulation of CCN1 in Osteoblasts Mediates Proangiogenic Activities in Endothelial Cells and Promotes Fracture Healing. *The Journal of Biological Chemistry*, 282;37:26746-53, 2007.
8. Babic, A., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V., et al. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:6355-60, 1998.
9. Bajpai, J., Gamanagatti, S., Sharma, M.C., et al. Noninvasive imaging surrogate of angiogenesis in osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer.*, 54(4):526-31, 2010.
10. Baniwal, S.K., Khalid, O., Gabet, Y., et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Molecular Cancer*, 9:258, 2010.
11. Barnes, G.L., Hebert, K.E., Kamal, M., et al. Fidelity of Runx2 Activity in Breast Cancer Cells Is Required for the Generation of Metastases-Associated Osteolytic Disease. *Cancer Res.*, 64:4506-13, 2004.

12. Barnes, G.L., Javed, A., Waller, S.M., 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* 63:2631-37, 2003.
13. Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K., et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nature*, 8:212-26, 2008.
14. Berge, G., Pettersen, S., Grotterød, I., et al. Osteopontin-an important downstream effector of S100A4-mediated invasion and metastasis. *Int. J. Cancer*, 129:780-90, 2011.
15. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2:737-44, 2000.
16. Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., et al. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J Clin Oncol.*, 20:776-90, 2002.
17. Blasberg, J.D., Goparaju, C.M., Pass, H.I., et al. 2010. Lung Cancer Osteopontin Isoforms Exhibit Angiogenic Functional Heterogeneity. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 139:1587-93, 2010.
18. Blyth, K., Cameron, E.R. and Neil, J.C. The runx genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*, 5:376-87, 2005.
19. Blyth, K., Vaillant, F., Jenkins, A., et al. Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood cells, Molecules, and Diseases*, 45:117-23, 2010.
20. Blyth, K., Vaillant, F., Hanlon, L., et al. Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer Res.* 66(4):2195-201, 2006.
21. Broadhead, M.L., Clark, J.C.M., Myers, D.E., et al. The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. *Sarcoma*, 2011:1-12, 2011.
22. Browne, G., Nesbitt, H., Ming, L., et al. Bicalutamide-induced hypoxia potentiates RUNX2-mediated Bcl-2 expression resulting in apoptosis resistance. *British Journal of Cancer* 107:1714-21, 2012.
23. Butterworth, K.T., McCarthy, H.O., Devlin, A., et al. Hypoxia selects for androgen independent LNCaP cells with a more malignant geno- and phenotype. *Int. J. Cancer*, 123:760-8, 2008.

24. Carmeliet, P. and Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473:298-307, 2011.
25. Chakraborty, G., Jain, S. and Kundu, G.C. Osteopontin Promotes Vascular Endothelial Growth Factor–Dependent Breast Tumor Growth and Angiogenesis via Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Cancer Res.*, 68:152-62, 2008.
26. Chen, C., Mo, F. and Lau, L.F. The Angiogenic Factor Cyr61 Activates a Genetic Program for Wound Healing in Human Skin Fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 276:47329-37, 2001.
27. Chen, N., Leu, S., Todorovic, V., et al. Identification of a Novel Integrin $\alpha\beta 3$ Binding Site in CCN1 (CYR61) Critical for Pro-angiogenic Activities in Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 279:44166-76, 2004.
28. Chen, Y., Yang, Y., Yuan, Z., et al. Predicting chemosensitivity in osteosarcoma prior to chemotherapy: An investigational study of biomarkers with immunohistochemistry. *Oncology Letters*, 3:1011-16, 2012.
29. Chen, D., Zhang, Y.J., Zhu, K.W., et al. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.*, 34(3):1895-9, 2013.
30. Chua, C., Chiu, Y., Yuen, H., et al. Suppression of Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Aggressiveness by FTY720: Validating Runx2 as a Potential Antimetastatic Drug Screening Platform. *Clin Cancer Res.*, 15:4322-35, 2009.
31. Chuang, L.S. and Ito, Y. Runx3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors. *Oncogene*, 29:2605-15, 2010.
32. Colla, S., Morandi, F., Lazzaretti, M., et al. Human myeloma cells express the bone regulating gene Runx2/Cbfa1 and produce osteopontin that is involved in angiogenesis in multiple myeloma patients. *Leukemia*, 19:2166-76, 2005.
33. Crockett, J.C., Schutze, N., Tosh, D., et al. The matricellular protein CYR61 inhibits osteoclastogenesis by a mechanism independent of $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$. *Endocrinology*, 148:5761-8, 2007.
34. de Nigris, F., Mancini, F.P., Schiano, C., et al. Osteosarcoma Cells Induce Endothelial Cell Proliferation During Neo-Angiogenesis. *J Cell Physiol*, 228:846-52, 2013.
35. de Nigris, F., Crudele, V., Giovane, A., et al. CXCR4/YY1 inhibition impairs VEGF network and angiogenesis during malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(32):14484-9, 2010.

36. de Nigris, F., Rossiello, R., Schiano, C., et al. Deletion of Yin Yang 1 protein in osteosarcoma cells on cell invasion and CXCR4/angiogenesis and metastasis. *Cancer Res.* 68(6):1797-808, 2008.
37. de Oliveira, R.L., Hamm, A. and Mazzone, M. Growing tumor vessels: More than one way to skin a cat – Implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Molecular Aspects of Medicine*, 32:71-87, 2011.
38. Du, X., Jiang, T., Sheng, X., et al. Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 115:371-6, 2009.
39. Ek, E.T.H., Dass, C.R., Contreras, K.G., et al. Inhibition of orthotopic osteosarcoma growth and metastasis by multitargeted antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Clinical and Experimental Metastasis*, 24:93-106, 2007c.
40. Ek, E.T.H., Dass, C.R., Contreras, K.G., et al. Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Gene Therapy*, 14:616-26, 2007a.
41. Ek, E.T.H., Dass, C.R., Contreras, K.G., et al. PEDF-derived synthetic peptides exhibit antitumor activity in an orthotopic model of human osteosarcoma. *J. Orthop. Res.*, 25(12):1671-80, 2007b.
42. Endo, T., Ohta, K. and Kobayashi, T. Expression and function of Cbfa-1/Runx2 in thyroid papillary carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(6):2409-12, 2008.
43. Fisher, J.L., Mackie, P.S., Howard, M.L., et al. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. *Clin Cancer Res.*, 7:1654-60, 2001.
44. Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, 3:643-51, 2003.
45. Fowler, M., Borazanci, E., McGhee, L., et al. RUNX1 (AML-1) and RUNX2 (AML-3) cooperate with prostate-derived Ets factor to activate transcription from the PSA upstream regulatory region. *J Cell Biochem.*, 97:1–17, 2006.
46. Fromigue, O., Hamidouche, Z., Vaudin, P., et al. CYR61 Downregulation Reduces Osteosarcoma Cell Invasion, Migration, and Metastasis. *J. Bone Miner. Res.*, 26(7):1533-42, 2011.
47. Galindo, M., Pratap, J., Young, D.W., et al. The Bone-specific Expression of Runx2 Oscillates during the Cell Cycle to Support a G1-related Antiproliferative Function in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:20274-85, 2005.

48. Giacomelli, F., Marciano, R., Pistorio, A., et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics*, 20:87-96, 2004.
49. Grote, K., Salguero, G., Ballmaier, M., et al. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood*, 110(3):877-85, 2007.
50. Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 124:175-89, 2006.
51. Hirama, M., Takahashi, F. and Takahashi, K. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Letters*, 198:107-17, 2003.
52. Holloway, S.E., Beck, A.W., Girard, L., et al. Increased Expression of Cyr61 (CCN1) Identified in Peritoneal Metastases from Human Pancreatic Cancer. *J. Am. Coll. Surg.*, 200(3):371-7, 2005.
53. Horvai, A.E., Roy, R., Borys, D., et al. Regulators of skeletal development: a cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Modern Pathology*, 25:1452-61, 2012.
54. Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., et al. Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Embo. J.* 20:723-33, 2001.
55. Javed, A., Barnes, G.L., Pratap, J., et al. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3_CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(5):1454-59, 2005.
56. Jia, W., Gao, X.J., Zhang, Z.D., et al. S100A4 silencing suppresses proliferation, angiogenesis and invasion of thyroid cancer cells through downregulation of MMP-9 and VEGF. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 17(11):1495-508, 2013.
57. Jung, S., Moon, E., Seo, H., et al. Expression and Significance of TGF-[beta] Isoform and VEGF in Osteosarcoma. *Orthopedics*; 28:8:755, 2005.
58. Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Untreated Osteosarcoma Is Predictive of Pulmonary Metastasis and Poor Prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 6:572-7, 2000.
59. Kaya, M., Wada, T., Kawaguchi, S., et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br. J. Cancer.*, 86(6):864-9, 2002.
60. Kim, I.S., Otto, F., Zabel, B., et al. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.* 80:159-70, 1999.

61. Koeneman, K.S, Yeung, F. and Chung, L. Osteomimetic Properties of Prostate Cancer Cells: A Hypothesis Supporting the Predilection of Prostate Cancer Metastasis and Growth in the Bone Environment. *Prostate*, 39:246-61, 1999.
62. Komori, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.*, 339:189-95, 2010.
63. Komori, T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *J. Cell. Biochem.*, 99:1233-39, 2006.
64. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., et al. Targeted Disruption of *Cbfa1* Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*, 89:755-64, 1997.
65. Koon, H.W., Zhao, D., Xu, H., et al. Substance P-mediated expression of the pro-angiogenic factor CCN1 modulates the course of colitis. *Am. J. Pathol.*, 173(2):400-10, 2008.
66. Kurek, K.C., Del Mare, S., Salah, Z., et al. Frequent Attenuation of the WWOX Tumor Suppressor in Osteosarcoma Is Associated with Increased Tumorigenicity and Aberrant RUNX2 Expression. *Cancer Res.*, 70:5577-86, 2010.
67. Kwon, T., Zhao, X., Yang, Q., et al. Physical and Functional Interactions Between Runx2 and HIF1 α Induce Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression. *J. Cell. Biochem.*, 112:3582-93, 2011.
68. Lammi, J., Fan, M., Rosenthal, H.G., et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int. Orthop.*, 36(11):2307-13, 2012.
69. Latinkic, B.V., Mo, F., Greenspan, J.A., et al. Promoter function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing, and role of the serum response element. *Endocrinology* 142:2549-57, 2001.
70. Lau, C., Harris, C., Lu, X., et al. Frequent Amplification and Rearrangement of Chromosomal Bands 6p12-p21 and 17p11.2 in Osteosarcoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 39:11-21, 2004.
71. Lau, L.F. and Chen, C. Review. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41(4):771-83, 2009.
72. Lee, S.W., Jeong, H.K., Lee, J.Y., et al. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1 α - mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol. Med.*, 4(9):924-38, 2012.

73. Leong, D.T., Lim, J., Goh, X., et al. Cancer-related ectopic expression of the bone-related transcription factor RUNX2 in non-osseous metastatic tumor cells is linked to cell proliferation and motility. *Breast Cancer Research* 12(5):R89, 2010.
74. Lester F. Lau. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68:3149-63, 2011.
75. Leu, S., Lam, S. and Lau, L. Pro-angiogenic Activities of CYR61 (CCN1) Mediated through Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha 6\beta 1$ in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 29;277(48):46248-55, 2002.
76. Lewis, I.J., Nooij, M.A., Whelan, J., et al. Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Natl Cancer Inst.*, 99:112-28, 2007.
77. Lim, M., Zhong, C, Yang, S., et al. Runx2 regulates survivin expression in prostate cancer cells. *Laboratory Investigation* 90:222-33, 2010.
78. Lin, F., Zheng, S.E., Shen, Z., et al. Relationships between levels of CXCR4 and VEGF and blood-borne metastasis and survival in patients with osteosarcoma. *Med. Oncol.* 28(2):649-53, 2011.
79. Lin, M., Zuon, C., Chang, C., et al. Cyr61 Induces Gastric Cancer Cell Motility/Invasion via Activation of the Integrin/Nuclear Factor-KB/Cyclooxygenase-2 Signaling Pathway. *Clin. Cancer Res.*, 11:5809-20, 2005.
80. Little, G.H., Noushmehr, H., Baniwal, S.K., et al. Genome-Wide Runx2 occupancy in prostate cancer cells suggests a role in regulating secretion. *Nucleic Acid Research*, 1-10, 2011.
81. Lu, X., Lu, Y., Zhao, Y., et al. Cell Cycle Regulator Gene CDC5L, a Potential Target for 6p12-p21 Amplicon in Osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.*, 6(6):937-46, 2008.
82. Lucero, C., Vega, O., Osorio, M., et al. The Cancer-Related Transcription Factor Runx2 Modulates Cell Proliferation in Human Osteosarcoma Cell Lines. *J. Cell Physiol.*, 228(4), 2013.
83. Luo, X., Chen, J., Song, W., et al. Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. *Laboratory Investigation*, 88:1264-77, 2008.
84. Lv, H., Fan, E., Sun, S., et al. Cyr61 is up-regulated in prostate cancer and associated with the p53 gene status. *J Cell Biochem.*, 106(4):738-44, 2009.

85. Man, T.K., Lu, X.Y., Jaeweon, K., et al. Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma. *BMC Cancer*, 7;4:45, 2004.
86. Martin, J.W., Zielenska, M., Stein, G.S., et al. Review Article. The Role of RUNX2 in Osteosarcoma Oncogenesis. *Sarcoma*, 282745, 2011.
87. Mendoza-Villanueva, D., Deng, W., López-Camacho, C., et al. The Runx2 transcriptional co-activator, CBF β , is essential for invasion of breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 9:171, 2010.
88. Meyers, S., Downing, J. R., and Hiebert, S. W. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence specific DNA-binding proteins. The runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.*, 13:6336-45, 1993.
89. Ministerio de Salud. Guía Clínica Osteosarcoma en persona de 15 años y más. Santiago: Minsal, 2013.
90. Mo, F. and Lau, L.F. The Matricellular Protein CCN1 Is Essential for Cardiac Development. *Circ. Res.*, 99:961-69, 2006.
91. Mo, F., Muntean, A.G., Chen, C., et al. CYR61 (CCN1) Is Essential for Placental Development and Vascular Integrity. *Mol. Cell. Biol.*, 22(24):8709, 2002.
92. Nagaraja, G.M., Othman, M., Fox, B.P., et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene*, 25:2328-38, 2006.
93. Nathan, S.S., Pereira, B.P., Zhou, Y.F., et al. Elevated expression of Runx2 as a key parameter in the etiology of osteosarcoma. *Mol Biol Rep.*, 36:153-8, 2009.
94. O'Brien, T.P. and Lau, L.F. Expression of the Growth Factor-inducible Immediate Early Gene *cyr61* Correlates with Chondrogenesis during Mouse Embryonic Development. *Cell. Growth Differ.*, 3:645-54, 1992.
95. Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 107:789-800, 2001.
96. Ohba, T., Cates, J., Cole, H., et al. Autocrine VEGF/VEGFR1 Signaling in a Subpopulation of Cells Associates with Aggressive Osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.*, 2014.
97. Onodera, Y., Miki, Y., Suzuki, T., et al. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression. *Cancer Sci.*, 101:2670-75, 2010.

98. Osato, M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*, 23:4284-96, 2004.
99. Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89:765-71, 1997.
100. Overholtzer, M., Rao, P., Favis, R., et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *PROC. NATL. ACAD. SCI.*, 100(20):11547-52, 2003.
101. Pande, S., Browne, G., Padmanabhan, S., et al. Oncogenic Cooperation Between PI3K/Akt Signaling and Transcription Factor Runx2 Promotes the Invasive Properties of Metastatic Breast Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* 228: 1784-92, 2013.
102. Pereira, B.P., Zhou, Y., Gupta, A., et al. Runx2, p53 and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1). *J. Cell. Physiol.*, 221(3):778-88, 2009.
103. Pompetti, F., Rizzo, P., Simon, R.M., et al. Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors. *Journal of cellular biochemistry*, 63(1):37-50, 1996.
104. Pratap, J., Galindo, M., Zaidi, S.K., et al. Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts. *Cancer Res.* 63(17):5357-62, 2003.
105. Pratap, J., Imbalzano, K.M., Underwood, J.M., et al. Ectopic Runx2 Expression in Mammary Epithelial Cells Disrupts Formation of Normal Acini Structure: Implications for Breast Cancer Progression. *Cancer Res.*, 69:6807-14, 2009.
106. Pratap, J., Javed, A., Languino, L.R., et al. The Runx2 Osteogenic Transcription Factor Regulates Matrix Metalloproteinase 9 in Bone Metastatic Cancer Cells and Controls Cell Invasion. *Mol. Cell. Biol.*, 8581-91, 2005.
107. Pratap, J., Lian, J.B. and Stein, G.S. Metastatic bone disease: Role of transcription factors and future targets. *Bone*, 48:30-6, 2011.
108. Pratap, J., Wixted, J.J., Gaur, T., et al. Runx2 Transcriptional Activation of Indian Hedgehog and a Downstream Bone Metastatic Pathway in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, 68:7795-802, 2008.
109. Qu, Y., Xu, J., Jiang, T., et al. Difference in pre and postchemotherapy vascular endothelial growth factor levels as a prognostic indicator in osteosarcoma. *J. Int. Med. Res.*, 39(4):1474-82, 2011.

110. Quan, G.M.Y., Ojaimi, J., Li, Y., et al. Localization of pigment epithelium derived factor in growing mouse bone. *Calcified Tissue International*, 76:146-53, 2005.
111. Riminucci, M., Corsi, A., Peris, K., et al. Coexpression of bone sialoprotein (BSP) and the pivotal transcriptional regulator of osteogenesis, Cbfa1/Runx2, in malignant melanoma. *Calcif. Tissue Int.* 73(3):281-9, 2003.
112. Sabile, A.A., Arlt, M.J., Muff, R., et al. Cyr61 Expression in Osteosarcoma Indicates Poor Prognosis and Promotes Intratibial Growth and Lung Metastasis in Mice. *J. Bone Miner. Res.*, 27(1):58-67, 2012.
113. Sadikovic, B., Thorner¹, P., Chilton-MacNeill, S., et al. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC Cancer*, 10:202, 2010.
114. Sadikovic, B., Yoshimoto, M., Chilton-MacNeill, S., et al. Identification of interactive networks of gene expression associated with osteosarcoma oncogenesis by integrated molecular profiling. *Human Molecular Genetics*, 18(11):1962-75, 2009.
115. Salnikow, K., Kluz, T., Costa, M., et al. The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor-1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol.*, 22:1734-41, 2002.
116. San Martín, I., Varela, N., Gaete, M., et al. Impaired cell cycle regulation of osteoblast-related transcription factor Runx2/Cbfa1 in osteosarcoma cells. *J. Cell Physiol.*, 221(3):560-71, 2009.
117. Savage, S.A. and Mirabello, L. *Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology*. Sarcoma, 13 páginas, 2011.
118. Schroeder, T.M., Jensen, E.D. and Westendorf, J.J. Runx2: A Master Organizer of Gene Transcription in Developing and Maturing Osteoblasts *Birth Defects Research (Part C)* 75:213-25, 2005.
119. Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, T., et al. Stimulation of Endothelial Cell Migration by Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor through Cooperative Mechanisms Involving the $\alpha\beta 3$ Integrin, Osteopontin, and Thrombin. *Am. J. Pathol.*, 149:293-305, 1996.
120. Shapovalov, Y., Benavidez, D., Zuch, D., et al. Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma. *Int. J. Cancer*, 127:67-76, 2010.

121. Si, W., Kang, Q., Luu, H.H., et al. CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol. Cell Biol.* 26:2955-64, 2006.
122. Smida, M., Abdenaji, W., Douira-Khoms, W., et al. Childhood soft tissue chondroma. Two cases report. *Tunis Med.*, 89(4):379-82, 2011.
123. Su, J.L., Chiou, J., Tang, C.H., et al. CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the avb3 integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *J. Biol. Chem.*, 285:31325-36, 2010.
124. Sugawara, M., Kato, N., Tsuchiya, T., et al. RUNX2 expression in developing human bones and various bone tumors. *Pathology International*, 61:565-71, 2011.
125. Sulzbacher, I., Birner, P., Trieb, K., et al. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch*, 441:345-49, 2002.
126. Sun, Z.J., Wang, Y., Cai, Z., et al. Involvement of Cyr61 in growth, migration, and metastasis of prostate cancer cells. *Br. J. Cancer*, 18;99(10):1656-67, 2008.
127. Tanaka, Y., Abe, M., Hiasa, M., et al. Myeloma Cell-Osteoclast Interaction Enhances Angiogenesis Together with Bone Resorption: A Role for Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Osteopontin. *Clin Cancer Res.*, 13:816-23, 2007.
128. Tang, H., Wang, J., Bai, F., et al. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer. *Biochem. Cell Biol.*, 85:103-10, 2007.
129. Thomas, D.M., Johnson, S.A., Sims, N.A., et al. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J Cell Biol.*, 167:925-34, 2004.
130. Tsai, M., Bogart, D.F., Li, P., et al. Short reports. Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 21:964-73, 2002.
131. Tsai, M., Hornby, A., Lakins, J., et al. Expression and Function of CYR61, an Angiogenic Factor, in Breast Cancer Cell Lines and Tumor Biopsies. *Cancer Res.*, 60:5603-07, 2000.
132. Tzeng, H.E., Tsai, C.H., Chang, Z.L., et al. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. *Biochem. Pharmacol.*, 85(4):531-40, 2013.

133. Unemori, E., Ferrara, N., Bauer, E., et al. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, 153(3):557-62, 1992.
134. van der Deen, M., Akech, J., Lapointe, D., et al. Genomic Promoter Occupancy of Runt-related Transcription Factor RUNX2 in Osteosarcoma Cells Identifies Genes Involved in Cell Adhesion and Motility. *The Journal of Biological Chemistry* 287(7):4503-17, 2012.
135. van der Deen, M., Akech, J., Wang, T., et al. The Cancer-Related Runx2 Protein Enhances Cell Growth and Responses to Androgen and TGF β in Prostate Cancer Cells. *J. Cell. Biochem.* 109:828-37, 2010.
136. van der Deen, M., Taipaleenmäkia, H., Zhang, Y., et al. MicroRNA-34c Inversely Couples the Biological Functions of the Runt-related Transcription Factor RUNX2 and the Tumor Suppressor p53 in Osteosarcoma. *J. Biol. Chem.*, 288:21307-19, 2013.
137. Vladimirova, V., Waha, A., Lückcrath, K., et al. Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J. Neurosci. Res.* 86(11):2450-61, 2008.
138. Wang, S.W. and Speck, N.A. Purification of core-binding factor, a protein that binds the conserved core site in murine leukemia virus enhancers. *Mol. Cell Biol.*, 12:89-102, 1992.
139. Westendorf, J.J. Transcriptional Co-Repressors of Runx2. *J. Cell. Biochem.* 98:54-64, 2006.
140. Wilson, A. and Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.*, 6:93-106, 2006.
141. Won, K.Y., Park, H. and Park, Y. Prognostic implication of immunohistochemical Runx2 expression in osteosarcoma. *Tumori*, 95:311-16, 2009.
142. Wong, M., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V., et al. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 192:492-508, 1997.
143. Xie, D., Yin, D., Tong, X., et al. Cyr61 Is Overexpressed in Gliomas and Involved in Integrin-Linked Kinase-Mediated Akt and β -Catenin-TCF/Lef Signaling Pathways. *Cancer Res.*, 64:1987-1996, 2004.
144. Xie, D., Yin, D., Wang, H., et al. Levels of Expression of CYR61 and CTGF Are Prognostic for Tumor Progression and Survival of Individuals with Gliomas. *Clin. Cancer Res.*, 10:2072-81, 2004.

145. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407:242-48, 2000.
146. Yang, J., Yang, D., Sun, Y., et al. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer*, 117(21):4925-38, 2011.
147. Young, D., Hassan, M., Yang, X., et al. Mitotic retention of gene expression patterns by the cell fate-determining transcription factor Runx2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(9):3189-9, 2007.
148. Zelzer, E., Glotzer, D.J., Hartmann, C., et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbaf1/Runx2. *Mechanisms of Development*, 106: 97-106, 2001.
149. Zhang, Z., Deepak, V., Meng, L., et al. Analysis of HDAC1-mediated regulation of Runx2-induced osteopontin gene expression in C3h10t1/2 cells. *Biotechnol Lett.*, 34:197-203, 2012.
150. Zhang, H.Y., Jin, L., Stilling, G.A., et al. RUNX1 and RUNX2 upregulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. *Endocrine* 35(1):101-11, 2009.
151. Ziros, P.G., Basdra, E.K. and Papavassiliou, A.G. Runx2: of bone and stretch. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40:1659-63, 2008.