

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS DE MELANOMA B16-F1  
CON EXPRESIÓN DE PTHRP PARA EVALUAR SU EFECTO EN  
OSTEOCITOS**

Que para obtener el Título de Biólogo presenta:

**ADRIANA JEANETTE RAMIREZ SOSA**

Ensenada, Baja California. Junio 2018.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS DE MELANOMA B16-F1  
CON EXPRESIÓN DE PTHRP PARA EVALUAR SU EFECTO EN  
OSTEOCITOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

**ADRIANA JEANETTE RAMIREZ SOSA**

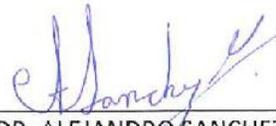
APROBADO POR:



DR. PIERRICK GERARD JEAN FOURNIER  
Director de tesis



DR. CARLOS ALBERTO FLORES LÓPEZ  
Codirector de tesis



DR. ALEJANDRO SANCHEZ GONZALEZ  
Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de esta tesis fue posible a los conocimientos transmitidos durante la carrera en la Licenciatura de Biología en la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y en mi estancia en el Departamento de Innovación Biomédica en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE).

Agradezco al Dr. Pierrick Fournier, mi director de tesis, por aceptarme y permitirme participar en su grupo de trabajo. Por asesorarme con su gran experiencia y confiar en mí para la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis, al Dr. Carlos Flores, por enseñarme y guiarme durante los años que estuve trabajando con él, en distintos proyectos de Biología Molecular. Gracias por introducirme al mundo de lo molecular. Al Dr. Alejandro Sánchez por brindarme la confianza y aceptar ser parte de mi comité, a pesar de la prisa. Por ser entusiasta y darme los ánimos para la presentación de mi tesis.

Al grupo de trabajo P&P, especialmente a Florian, Andrea, Danna y Arturo, por ayudarme y enseñarme las técnicas de laboratorio que realice en mi tesis. A Fernando, por asesorarme y ayudarme con las dudas que se me presentaban dentro y fuera del laboratorio. A la Dra. Patricia Juárez por su retroalimentación y experiencia.

A mi mamá por apoyarme en toda la licenciatura, a mi papá por estar conmigo. Hermanas, Tania y Carmen, espero ser la guía y hermana mayor que merecen. Familia, gracias por ayudarme a creer en mí e intentar, los amo.

A mi amiga Marylu, con quien inicié esta aventura en CICESE. A mis amigos de la carrera por animarme y compartir conocimientos, durante esta trayectoria. Alfredo, Juan Cons, Teresa, Juan Corral, Jorge, Diana, Alex y Gustavo, gracias.

A mis amigas de toda la vida, Andrea y Caro, que aunque no me entendían la mayoría del tiempo, me comprendían y animaban. Las quiero.

## RESUMEN

Resumen de la tesis de **Adriana Jeanette Ramirez Sosa** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2018.

### **Modificación genética de células de melanoma B16-F1 con expresión de PTHrP para evaluar su efecto en osteocitos**

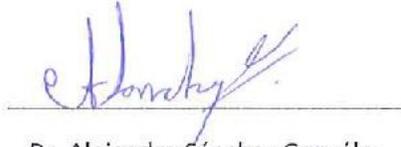
Resumen aprobado por



Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier



Dr. Carlos Alberto Flores López



Dr. Alejandro Sánchez González

Los cánceres de mama y de próstata son los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia y mortalidad, y >80% de los pacientes en etapas avanzadas desarrollará metástasis a huesos. Esta afinidad para los huesos se debe a las interacciones entre las células cancerosas y óseas y la remodelación ósea que favorece la progresión del cáncer. Aunque los osteocitos representan >90% de las células del hueso y son los principales coordinadores de la remodelación ósea, su papel en la metástasis ósea no ha sido estudiado. Las células cancerosas en los huesos producen PTHrP, proteína relacionada con la hormona paratiroidea. Esta proteína regula la actividad de los osteocitos, por lo que las células cancerosas podrían afectar los osteocitos y la remodelación ósea. El objetivo de este proyecto fue modificar células de melanoma, B16-F1, para producir PTHrP con el fin de estudiar el efecto de la PTHrP de las células cancerosas en los osteocitos. Sub-clonamos la secuencia de la PTHrP en el vector pLJM1 y usamos un sistema lentiviral para transducir células B16-F1. Por RT-qPCR, confirmamos que las nuevas células, B16-PTHrP, sobreexpresan la PTHrP. Cuando cultivamos las células sin antibióticos, se mantuvo la expresión de PTHrP, indicando que la transducción es estable. Con un ensayo MTT, confirmamos que la expresión de PTHrP no cambió la proliferación de las células cancerosas. Al ser inoculadas en el corazón de ratones, las células B16-PTHrP produjeron metástasis óseas. Aunque no se pudo detectar la expresión y secreción de la proteína por HPLC, ni por función biológica en hemicalvarias de ratón, la disminución de la tasa *Rankl/Opg* en co-cultivo de células B16-PTHrP con células de médula ósea, nos demuestra que hay expresión de la PTHrP en las células B16-F1 modificadas y que causa efectos de formación o destrucción ósea, según el tiempo de tratamiento con PTHrP.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 7  |
| 1.1 Cáncer .....  | 7  |
| 1.2 Metástasis .....  | 7  |
| 1.3 Metástasis ósea y ciclo vicioso de la metástasis ósea .....                   | 8  |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....  | 11 |
| 2.1 PTHrP y hueso .....   | 11 |
| 2.2 Papel de la PTHrP en los osteocitos.....                                      | 12 |
| 2.3 PTHrP y metástasis ósea .....   | 14 |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 15 |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....   | 17 |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....   | 17 |
| 5.1 Objetivo general.....   | 17 |
| 5.2 Objetivos específicos.....  | 17 |
| <b>6. METODOLOGÍA</b> .....   | 18 |
| 6.1 Desarrollo de vector lentiviral bicistrónico.....                             | 18 |
| 6.1.1 Subclonación de IRES-DsRed2 en el vector de expresión lentiviral pLJM1..... | 18 |
| 6.1.2 Subclonación de PTHrP o eGFP en el plásmido pLJM1-IRES-DsRed2 .....         | 19 |
| 6.2 Cultivo celular .....   | 20 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.3 Validación de expresión de vectores bicistrónicos .....                                | 21        |
| 6.3.1 Transfección .....   | 21        |
| 6.3.2 Transducción con partículas lentivirales .....                                       | 22        |
| 6.4 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR .....                                       | 23        |
| 6.5 Estabilidad de expresión de la PTHrP.....  | 25        |
| 6.6 Ensayo de proliferación celular.....   | 25        |
| 6.7 Preparación de medios condicionados .....  | 25        |
| 6.8 Detección de la expresión de PTHrP a nivel proteico por HPLC .....                     | 26        |
| 6.9 Selección de clones de células B16-F1 con expresión de PTHrP.....                      | 26        |
| 6.10 Efecto de las células B16-PTHrP en la expresión de genes en células tipo osteoblastos | 27        |
| 6.11 Experimentación animal .....  | 28        |
| 6.11.1 Manejo y cuidado de ratones .....   | 28        |
| 6.11.2 Disección de calvarias .....  | 28        |
| 6.11.3 Cultivo de calvarias .....  | 29        |
| 6.11.3.1 Caracterización histológica .....   | 30        |
| 6.11.4 Inoculación intracardiaca.....  | 32        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>  | <b>34</b> |
| 7.1 Preparación de un vector bicistrónico para expresión de PTHrP o eGFP con DsRed2 .....  | 34        |
| 7.2 Preparación de células B16-F1 con expresión de GFP o PTHrP .....                       | 38        |

|   |           |
|---|-----------|
| 7.2.1 Transducción lentiviral para expresión de PTHrP o GFP en células B16-F1.....  | 38        |
| 7.2.2 Cuantificación de la expresión de ARNm de la PTHrP por RT-qPCR .....  | 41        |
| 7.2.3 Estabilidad de la expresión de PTHrP en células B16-F1 .....  | 42        |
| 7.2.4 Estabilidad de la expresión de eGFP en células B16-F1 .....   | 43        |
| 7.3 La expresión de PTHrP en células B16-F1 no interfiere en la proliferación.....  | 44        |
| 7.4 Experimento piloto de metástasis ósea por inoculación intracardiaca de células<br>cancerosas con expresión de PTHrP en ratones C57BL/6..... | 46        |
| 7.5 Detección por HPLC de la secreción de la PTHrP en células B16-F1 transducidas .....   | 48        |
| 7.6 Efecto de medios condicionados en un modelo de cultivo <i>ex vivo</i> de calvaria de ratón ..   | 50        |
| 7.7 Selección de clones con expresión de PTHrP derivados de células B16-F1 modificadas ..   | 52        |
| 7.7.1 Efecto directo de la PTHrP producida por células cancerosas en la expresión de genes<br>en células tipo osteoblastos.....                 | 54        |
| <b>8. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>10. LITERATURA CITADA.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>11. ANEXOS.....</b>  | <b>70</b> |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad causada por cambios en el genoma provocados por factores físicos, químicos o biológicos. Estos cambios generan una gran cantidad de desarreglos celulares, que se destacan principalmente por un crecimiento y división descontrolado (NIH, 2015). Hanahan y Weinberg (2000) han propuesto que las células cancerosas se caracterizan por tener señales de crecimiento autónomas, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, angiogénesis, potencial replicativo ilimitado, evasión del sistema inmune, adaptación del metabolismo energético e invasión y metástasis.

El cáncer de mama y de próstata son los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia y mortalidad entre mujeres y hombres, en todo el mundo (Ferlay *et al.* 2013). La mayoría de estos pacientes (>90%) mueren por la diseminación del cáncer a otros tejidos o metástasis.

## 1.2 Metástasis

La metástasis se refiere al esparcimiento de células cancerosas de un tumor primario a otras partes del cuerpo (Seyfried y Huysentruyt, 2013). Este proceso involucra una serie de pasos, la cual inicia con el desprendimiento de las células cancerosas del tumor primario, intravasación dentro del sistema circulatorio sanguíneo o linfático, para diseminarse a otros tejidos o nodos linfáticos, evasión del sistema inmune, extravasación de los capilares sanguíneos o linfáticos, e invasión y proliferación en órganos distantes (Seyfried y Huysentruyt, 2013; NIH, 2017). A su vez las células metastásicas son capaces de establecer un microambiente que facilita la angiogénesis y proliferación, resultando en tumores malignos secundarios.

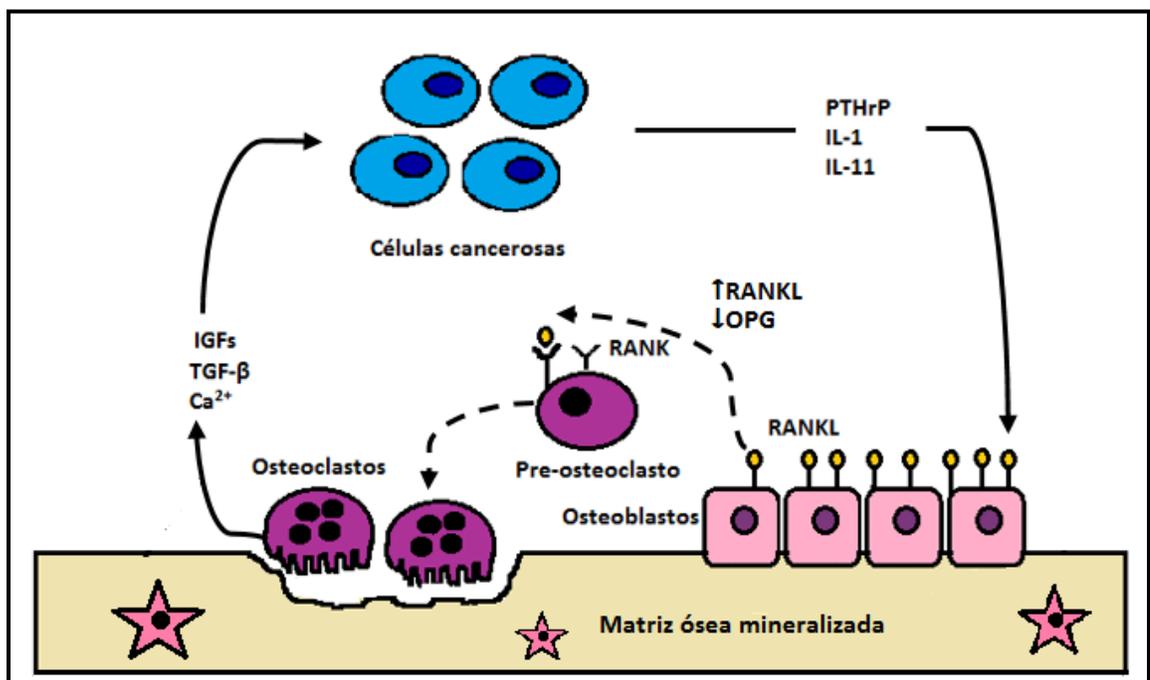
Los sitios con mayor frecuencia de metástasis por células de cáncer de mama y próstata son pulmón, hígado, cerebro y huesos (NIH, 2017).

### 1.3 Metástasis ósea y ciclo vicioso de la metástasis ósea

La mayoría (>80%) de los pacientes con cáncer de mama o próstata en etapas avanzadas, tienen metástasis ósea. Las lesiones causadas en la metástasis ósea pueden ser de dos tipos: osteoblástica u osteolítica. La primera es causada por un exceso de la actividad de los osteoblastos, lo que conlleva a la formación de hueso anormal. Por otro lado, las lesiones osteolíticas son la consecuencia del incremento en la actividad de los osteoclastos, lo que genera destrucción ósea. Los dos tipos de metástasis ósea provocan una serie de complicaciones en el esqueleto, como dolor de huesos, fracturas, hipercalcemia y síndromes de compresión de medula espinal y nervios. Por lo tanto, implica una disminución en calidad de vida en los pacientes con este padecimiento (Kingsley, 2007).

La metástasis es un proceso de varios pasos, cuando las células tumorales metastatizan a hueso, desencadenan una serie de desajustes que promueven la proliferación de células cancerosas en la medula ósea. Primero, las células tumorales liberan productos tales como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), la interleucina 1 (IL-1) o la interleucina 11 (IL-11) que activan la expresión de RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B) en los osteoblastos (Thomas, et al., 1999). RANKL será reconocido por su receptor RANK (receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B) en las células precursoras de osteoclastos, lo que induce la diferenciación en osteoclastos y la resorción del hueso. La osteólisis, ocasionada por los osteoclastos, activa la liberación de calcio extracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y factores de crecimiento provenientes de la matriz ósea, tales como el factor de crecimiento

transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) (Guise, 2002; Mundy, 2002). Los factores de crecimiento se unen a sus receptores en las células tumorales, aumentando la proliferación y/o incrementando la producción de los factores pro-osteolíticos, iniciando con lo que se denomina “ciclo vicioso” (Mundy, 2002) (Fig. 1). El ciclo vicioso se refiere al proceso de interacciones entre las células tumorales y las células óseas, por el cual se favorece el crecimiento y supervivencia tumoral en el microambiente óseo (Mundy, 2002; Fournier, *et al.*, 2006).



**Figura 1. Ciclo vicioso de la metástasis ósea osteolítica.** Factores secretados por las células cancerosas, como la PTHrP, IL-1 e IL-11, incrementan la expresión de RANKL en los osteoblastos, induciendo indirectamente la maduración de los osteoclastos. La resorción ósea, ocasionada por los osteoclastos, libera componentes de la matriz ósea mineralizada, tales como  $Ca^{2+}$ , TGF- $\beta$  e

IGF, que favorecen el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas en el microambiente óseo (modificado de Mundy, 2002).

Estudios científicos han sugerido diversos factores que contribuyen al ciclo vicioso entre las células cancerosas y el hueso. A pesar de este conocimiento, no existe tratamiento que logre curar la metástasis ósea. Por lo tanto es necesario continuar investigando los mecanismos moleculares para el desarrollo de agentes terapéuticos.

Considerando la importancia de las interacciones entre las células cancerosas y óseas, una gran cantidad de estudios han sido desarrollados para conocer el rol de los osteoclastos y osteoblastos, que representan solamente el 10% de las células del hueso. Los osteocitos que representan el 90% de las células del hueso, son los principales coordinadores y ejecutores de la remodelación ósea, han recibido muy poca atención en el campo de la metástasis ósea. Por esta razón, se propone estudiar las interacciones entre las células cancerosas y los osteocitos. Tomando en cuenta el papel del receptor PTH/PTHrP en los osteocitos y la secreción de la PTHrP por las células cancerosas en el hueso, el objetivo del trabajo es determinar cuál es el rol que desempeña la PTHrP secretada por las células de cáncer en los osteocitos y el hueso.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 PTHrP y hueso

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP, también conocida como PTHLH), fue descubierta en los años 80s como un factor secretado por células cancerosas que causan hipercalcemia por malignidad (Philbrick, *et al.*, 1996). La PTHrP generalmente está compuesta de 141 aminoácidos, sin embargo, se ha demostrado que debido a splicing alternativo de ARNm también se puede encontrar de 139 y 173 aminoácidos (Brandt, *et al.* 1994). La PTHrP y la hormona paratiroidea (PTH) comparten diversas características biológicas, debido a la gran homología en la secuencia N-terminal, razón por la cual hay unión y activación del mismo receptor (PTHR1) (Philbrick, *et al.*, 1996).

Después de su identificación y clonación molecular, la comunidad científica puso mayor atención en el rol fisiológico de la PTHrP. Se ha identificado que esta proteína es responsable de la formación normal del hueso endocondral y de controlar la proliferación del cartílago en las placas de crecimiento (Mundy y Edwards, 2008). La PTHrP también tiene un rol muy importante en el desarrollo pre y postnatal, ya que está involucrada en el transporte de calcio maternal al feto, mediante la membrana placental (Gensure, *et al.* 2005). Así mismo, además de tener un papel crítico en la morfogénesis de la glándula mamaria, se han detectado niveles elevados de la PTHrP durante la lactancia, los cuales se han identificado que contribuye a la movilización de calcio de los huesos y de regular el transporte de calcio del torrente sanguíneo a la leche materna (Gensure, *et al.* 2005).

En la década de los 90s, se descubrió que la PTHrP está involucrada en la formación de hueso y distintos autores pusieron gran interés en la búsqueda del papel fisiológico de la

proteína dentro del ambiente óseo (Martin, 2005). Mediante la delección del gen de PTHrP, se determinó en ratones heterocigotos (*Pthrp<sup>+/-</sup>*) que la PTHrP, derivada de osteoblastos, es esencial para el mantenimiento de la masa del hueso trabecular en animales postnatales (Miao, *et al.*, 2004). En el mismo estudio se evidenció que la ablación de la PTHrP disminuye el número de osteoclastos, ya que los niveles de RANKL, molécula de membrana de osteoblastos, decrecen y no hay activación de su receptor (Miao, *et al.*, 2004; Martin, 2005).

## 2.2 Papel de la PTHrP en los osteocitos

Los osteocitos son formados a partir de osteoblastos que fueron “enterrados” durante el proceso de depositación de hueso y permanecen regularmente distribuidos dentro de la matriz ósea mineralizada (Manolagas, 2000). Los osteocitos comprenden aproximadamente el 90% de las células óseas dentro de la matriz o en la superficie del hueso. Están individualmente encapsulados en lagunas y exhiben procesos dendríticos citoplasmáticos que se proyectan a lo largo de canalículos dentro de la matriz mineralizada (Bonewald, 2011). Las prolongaciones provenientes de osteocitos vecinos se tocan entre ellas dentro de los canalículos y establecen comunicaciones intercelulares. A la red descrita anteriormente se le denomina sistema lacuno-canalicular, y se ha demostrado que es sensitiva a estímulos mecánicos, característica muy importante para la regulación de la remodelación ósea (Bozal, 2013). A su vez, también existen conexiones directas e indirectas entre los osteocitos y los osteoblastos, los osteoclastos y las células de revestimiento óseo (Bellido, 2014). Además de la regulación de la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, resultados anteriores indican que los osteocitos pueden localmente tener una actividad de resorción o formación de hueso, durante condiciones de demanda de calcio, como lo es la lactancia (Qing, *et al.* 2012).

Durante la lactancia, se ha observado que existe un engrandecimiento significativo de las lagunas osteocitarias, tanto en el hueso cortical como trabecular, en comparación con ratones vírgenes o después de la lactancia, demostrando que los osteocitos son capaces de remover y reemplazar su matriz perilacunar (Qing, *et al.* 2012). Por otro lado, dentro de este estudio se determinó que en los ratones lactantes existe un incremento en los niveles de expresión de genes utilizados por los osteoclastos para la resorción ósea, tales como la TRAP y la catepsina K, y estos niveles regresan a niveles similares a los de ratones vírgenes, una vez que dejan de lactar. Estas observaciones sugieren que los osteocitos contribuyen en la remoción de mineral de sus lagunas y canalículos durante la lactancia (Qing, *et al.* 2012). Esta remodelación se infiere que es mediada por el receptor de PTH/PTHrP debido a que a los animales lactantes carentes de este gen en osteocitos no son capaces de remodelar su matriz perilacunar (Qing, *et al.*, 2012). Por lo tanto, se propone que el receptor de PTH/PTHrP juega un papel muy importante en la viabilidad y función de los osteocitos (Bonewald, 2011).

Por otro lado, distintos investigadores determinaron que la expresión, en osteocitos, de una forma constitutivamente activada del receptor de la PTH/PTHrP (caPTHr1), en ratones transgénicos, es suficiente para incrementar la remodelación ósea, ya que aumentan las cantidades de osteoclastos y osteoblastos y su actividad (O'Brien, *et al.*, 2008). La caPTHr1 en osteocitos causa la elevación de los niveles de RANKL y M-CSF y la sobreactivación de osteoclastos incrementando la resorción ósea. Igualmente la activación del PTHR1 en los osteocitos aumenta el número de osteoblastos y la formación de hueso. Este fenómeno fue asociado con la regulación negativa de producción de esclerostina, un inhibidor de los

osteoblastos. Estos descubrimientos revelan que los osteocitos son los blancos y mediadores de los dos efectos más importantes de la PTH o la PTHrP en el hueso (O'Brien, *et al.*, 2008).

Estos descubrimientos pueden tener implicaciones para ciertas condiciones como la hipercalcemia de malignidad o la metástasis ósea, donde existen niveles altos de expresión de PTHrP que pueden causar remodelación osteocítica.

### 2.3 PTHrP y metástasis ósea

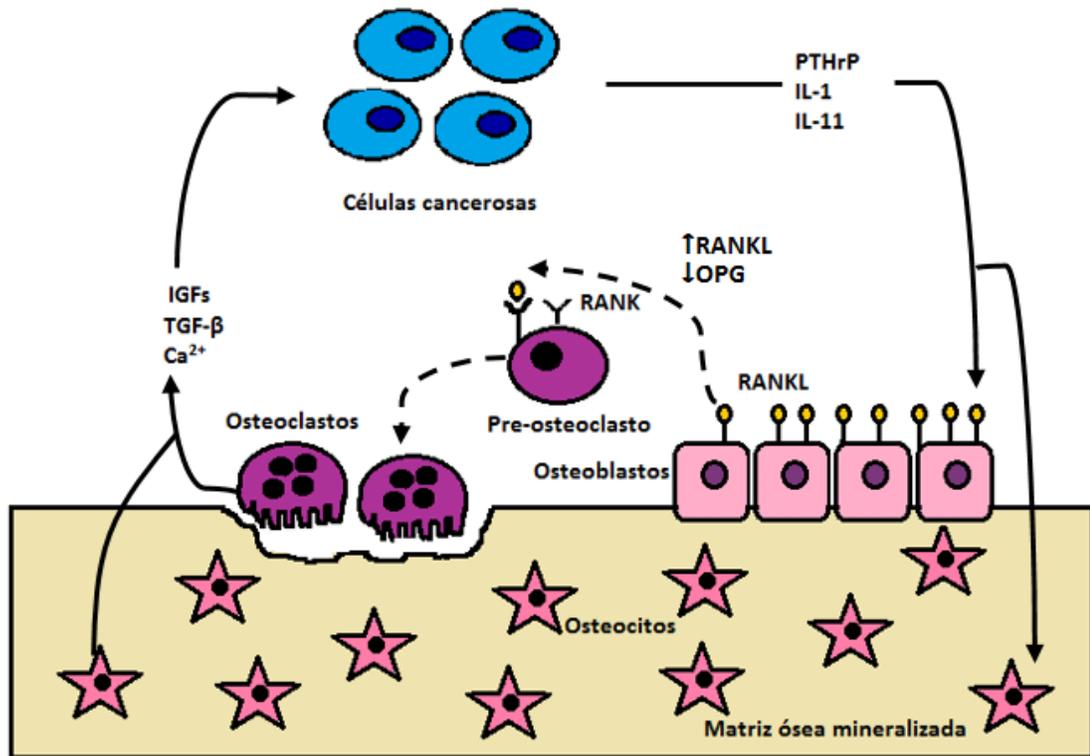
El hueso es uno de los sitios más recurrentes de metástasis en los pacientes con cáncer de mama o de próstata. Evidencia histomorfométrica sugiere que las células metastásicas de cáncer mama tienen la capacidad de inducir la resorción ósea mediante la estimulación de osteoclastos (Taube, *et al.*, 1994). Como se ha mencionado anteriormente, la PTHrP es una proteína clave en la metástasis ósea debido a que está involucrada en la osteólisis osteoclástica. Experimentos han demostrado que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de la PTHrP, en ratones desnudos inoculados con células de cáncer de mama, tiene la capacidad de inhibir las lesiones osteolíticas, disminuyéndolas en número y tamaño, en comparación a los controles. Lo que sugiere que la expresión de PTHrP por células de mama cancerosas, es importante para el desarrollo y progresión de la metástasis ósea (Guise, *et al.*, 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La PTHrP, producida por células cancerosas, tiene un papel fundamental en la metástasis ósea, ya que induce la expresión de genes involucrados en la destrucción de hueso. Con esta inducción de la resorción ósea, se liberan los factores de crecimiento del hueso lo que promueve la proliferación de las células cancerosas en este tejido.

Se conoce que durante la lactancia, la glándula mamaria eleva su producción de la PTHrP que va a inducir, indirectamente, a los osteoclastos a través la activación de osteoblastos. Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la PTHrP también activa a los osteocitos, los cuales van a resorber directamente la matriz ósea a dentro de las canalículas, gracias la expresión de genes específicos de osteoclastos (Fig.2). Por lo tanto, podríamos pensar que la PTHrP podría activar a los osteocitos durante la metástasis ósea.

La línea celular B16-F1 derivada de un melanoma de ratones C57BL/6 no producen PTHrP y se conoce que al ser inoculadas en ratones C57BL/6, las células B16-F1 forman metástasis ósea pero no inducen osteolisis. Por estas características, B16-F1 es una línea celular cancerosa óptima para conocer el efecto de la PTHrP de la metástasis ósea en los osteocitos.



**Figura 2. Ciclo vicioso de la metástasis ósea y el papel de los osteocitos.** Factores pro-osteoclásticos como PTHrP son liberados por las células cancerosas e incrementan la expresión de RANKL y la resorción ósea. La PTHrP también puede activar a los osteocitos, aumentando la expresión de RANKL y la remodelación de su red perilacunar. Ambos procesos aumentan la liberación de Ca<sup>2+</sup> y de factores de crecimiento como TGFβ e IGF, favoreciendo el crecimiento de células cancerosas en el hueso (modificado de Mundy, 2002).

## **4. HIPÓTESIS**

La expresión de la PTHrP en células cancerosas en la metástasis ósea induce a la resorción ósea mediada por osteocitos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Establecer una línea celular B16-F1 con expresión de la PTHrP, para estudiar el efecto de esta proteína en la resorción por osteocitos.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 1.** Desarrollar un vector lentiviral bicistrónico para expresión de PTHrP o eGFP con la proteína fluorescente DsRed2.
- 2.** Modificar células B16-F1 por transducción lentiviral para que produzcan PTHrP o eGFP.
- 3.** Caracterizar la expresión de PTHrP en las células B16-F1.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Desarrollo de vector lentiviral bicistrónico

#### 6.1.1 Subclonación de IRES-DsRed2 en el vector de expresión lentiviral pLJM1

Para obtener una población de células B16-F1 que expresen la PTHrP y conocer el porcentaje de células PTHrP+, utilizamos un vector lentiviral bicistrónico. Este vector se usará para transducir células B16-F1 que producirán un ARNm bicistrónico para la traducción y producción de nuestra proteína de interés (PTHrP o eGFP) y la proteína fluorescente DsRed2. Para generar el vector bicistrónico, se obtuvo la secuencia correspondiente del sitio de clonación múltiple (MCS), el sitio de unión interna para el ribosoma (IRES) y la secuencia codificante de DsRed2 proveniente del plásmido pIRES-DsRed2 (Clontech). Se hizo amplificación de las secuencias por medio de PCR usando la polimerasa de ADN de alta fidelidad Q5 (NEB), y oligonucleótidos para agregar en los extremos 5' y 3' del producto de PCR, secuencias idénticas a las extremidades del vector lentiviral pLJM1-eGFP (una donación del Dr. David Sabatini, plásmido Addgene No. 19319) (Sancak *et al.* 2008), linearizado con las enzimas de restricción NheI y EcoRI (NEB).

El producto de PCR se subclonó en pLJM1 usando el Gibson Assembly Cloning kit (NEB). La reacción de subclonación se preparó en un volumen final de 5  $\mu$ L, con una proporción de 1:10 partes del vector por inserto. Después se incubaron las muestras a 50°C por 15 minutos. Se procedió a hacer la transformación de células competentes de *E.coli* (NEB-5 $\alpha$ ), incluidas en el kit, con los productos de ligación, por medio de choque térmico. Se hizo cultivo en placa con medio LB-agar más carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) durante toda la noche a 37°C.

Se calculó la eficiencia de transformación usando bacterias transformadas con el plásmido pUC19. Para la transformación de bacterias con el producto de subclonación se seleccionaron colonias para realizar cultivos líquidos en 7 mL de medio LB con carbenicilina durante toda la noche con agitación constante de 250rpm a 37°C. Posteriormente se realizó una PCR de colonia (Tabla I) para verificar la presencia del nuevo plásmido pLJM1-IRES-DsRed2, en un volumen final de 10 µL. El producto de amplificación se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La purificación del plásmido fue por medio del kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron eluidas en 30 µL de buffer de elución y se cuantificó la concentración del plásmido por Nanodrop (Thermo Scientific).

#### 6.1.2 Subclonación de PTHrP o eGFP en el plásmido pLJM1-IRES-DsRed2

El plásmido pLJM1-IRES-DsRed2 fue linearizado con las enzimas de restricción EcoRI y NheI (NEB). Una vez linearizado el vector bicistrónico lentiviral pLJM1-IRES-DsRed2, se procedió a formar los plásmidos con la expresión de las proteínas de interés. La obtención de la secuencia codificante de la PTHrP de ratón fue a partir de un plásmido pLJM1-PTHrP. Mientras que la secuencia codificante de eGFP se extrajo del vector comercial pLJM1-eGFP. Ambas secuencias fueron amplificadas individualmente por medio de PCR utilizando la polimerasa de ADN de alta fidelidad y oligonucleótidos (Tabla I) para agregar secuencias idénticas a las extremidades del plásmido linearizado pLJM1-IRES-DsRed2. Posteriormente se hizo una subclonación con el Gibson Assembly Cloning kit y transformado, como se especificó anteriormente. Para verificar la presencia de las nuevas construcciones en las colonias bacterianas seleccionadas, se realizó un

PCR (Tabla I) y electroforesis en gel de agarosa. La purificación de los plásmidos y cuantificación de ADN fue como se describió antes.

|  | <b>Secuencia (5' → 3')</b>                                | <b>Nt</b> |
|--|---|-----------|
| <b>Subclonación de MCS-IRES-DsRed2</b>             |   |           |
| Oligonucleótido forward                            | TTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCG<br>GACTCA                | 38        |
| oligonucleotido reverse                            | CCATTTGTCTCGAGGTCGAGCTACAGGAACAG<br>GTGGTGGC              | 40        |
| <b>PCR de colonia para pLJM1-IRES-DsRed2</b>       |   |           |
| oligonucleótido forward                            | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG                                     | 21        |
| oligonucleótido reverse                            | GGGTGCTTCACGTACACCTT                                      | 20        |
| <b>Subclonación de PTHrP y eGFP</b>                |   |           |
| oligonucleótido forward                            | TTAGTGAACCGTCAGATCCG<br>TACCGTCGACTGCAGAATTCTATTTGTCTCGAG | 20        |
| oligonucleótido reverse                            | GTCGAGAATTC   | 44        |
| <b>PCR de colonia para pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2</b>  |   |           |
| oligonucleótido forward                            | CACATGAAGCAGCACGACTT                                      | 20        |
| oligonucleótido reverse                            | AGGAACTGCTTCCTTCACGA                                      | 20        |
| <b>PCR de colonia para pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2</b> |   |           |
| oligonucleótido forward                            | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG                                     | 21        |
| oligonucleótido reverse                            | CAGCCGAAATCAGAGCTACC                                      | 20        |

**Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para la formación del vector**

**lentiviral bicistrónico.** Secuencias y número de nucleótidos (Nt) de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de PCR.

## 6.2 Cultivo celular

Para el desarrollo del proyecto se utilizaron distintas líneas celulares, 293T (ATCC), provenientes de riñón embrionario humano. Esta línea celular es comúnmente utilizada para el empaquetamiento de sistemas lentivirales debido a que son fácilmente transfectadas. Se mantuvieron con medio DMEM (Corning) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Biowest) y 1% de antibiótico-antimicótico (Ab-Am) (Corning). La línea celular B16-F1 (parentales

y transducidas), aisladas a partir de melanoma de ratón C57BL/6. Fueron cultivadas con medio RPMI (Corning) suplementado con 5% de SFB y 1% de Ab-Am. Por último, células MC3T3-E1 (ATCC), fibroblastos originados de calvaria de ratón C57BL/6 recién nacido. Una de las características de esta línea celular es que son un buen modelo para estudiar la diferenciación osteoblástica *in vitro*. Las células se mantuvieron con medio  $\alpha$ -MEM (Cellgro) adicionado con 10% SFB y 1% Ab-Am. Todas las líneas celulares fueron incubadas en una atmósfera humedecida con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Al alcanzar la confluencia óptima (80-100%) se subcultivaron las células, lavando la capa celular con PBS 1x, después se agregó una solución de tripsina (0.05%)-EDTA (0.53mM) (Corning), se mantuvieron a 37°C hasta que las células se hayan desadherido, posteriormente se neutralizó la reacción con el medio de cultivo correspondiente, para distribuir en cajas de cultivo nuevas. Los pases celulares o cambios de medio se realizaron cada 2-3 días.

## 6.3 Validación de expresión de vectores bicistrónicos

### 6.3.1 Transfección

Para validar los vectores bicistrónicos obtenidos, pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2 y pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2, se realizó una transfección en células 293T. A partir de un cultivo celular de 293T en placa de 10 cm, se preparó una suspensión de células a la concentración de 50,000 células/mL, en medio DMEM, sembrando 500 $\mu$ L de solución por pozo en una placa de 24 pozos. Los plásmidos utilizados en la transfección fueron pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2, pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2 y pLJM1-eGFP y pLJM1-DsRed2 como controles, con concentración de 500 ng cada uno, utilizando el reactivo FuGENE HD (Promega), en una proporción 7:2 (7 $\mu$ L de FuGENE HD por 1 $\mu$ g de ADN) de acuerdo al protocolo del proveedor. Después se incubaron las mezclas durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colocaron en el pozo correspondiente. Las células

permanecieron 48 horas en incubación. Posteriormente fueron analizadas mediante el Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystem), detectando aquellas que tuvieran fluorescencia.

### 6.3.2 Transducción con partículas lentivirales

El proceso de transducción de las células B16-F1 se llevó a cabo mediante un sistema de transducción lentiviral de tercera generación, es decir, son necesarios cuatro plásmidos distintos para la producción de partículas lentivirales defectivas en replicación. Entre los cuatro plásmidos, tenemos un vector de transferencia con el inserto de interés, en este caso se utilizaron pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2, pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2, pLJM1-eGFP o pLJM1-DsRed2; dos vectores de empaquetamiento y un vector de cubierta.

En el día 1 se sembraron en placas de 24 pozos, 90,000 células 293T en 500  $\mu$ L de DMEM por pozo, se incubaron por 24 horas. Al día siguiente las células fueron transfectadas con 750 ng de ADN de pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2, pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2, pLJM1-eGFP o pLJM1-DsRed2, los dos vectores de empaquetamiento, pLP1 y pLP2 y el vector de cubierta, pMDG2; con el reactivo de transfección FuGENE HD (Promega) en proporción 7:2. Se consideró como control negativo a células 293T sin transfección. En el día 3, se sembraron 12,000 células B16-F1 en 500  $\mu$ L de medio RPMI por pozo en una placa de 12 pozos. Al día 4, cuarenta y ocho horas después de la transfección, se realizó la colecta del sobrenadante lentiviral de cada reacción, que se mantuvo a 4° C. Veinticuatro horas después se realizó una segunda colecta de sobrenadante lentiviral, se mezcló con la primera colecta y posteriormente se agregó polybrene a una concentración de 8  $\mu$ g/mL. Después fue removido el medio de cultivo de las células B16-F1 para sustituirlo con la mezcla de partículas lentivirales con polybrene. Al día 8, se evaluó la

fluorescencia de las células por citometría de flujo. Posteriormente se tripsinizaron las células transducidas y se colocaron en una placa de 6 pozos. En el día 10, se inició el tratamiento con puromicina (2 µg/ml) para la selección de células resistentes al antibiótico. Después de 7 días de selección, se analizó nuevamente la expresión de proteínas fluorescentes, por citometría de flujo. Las células fueron cultivadas hasta conseguir el número deseado de viales para continuar con los siguientes experimentos de caracterización. El proceso de transducción se realizó dos veces independientes, generando células B16-PTHrP #1, #2 y #3, B16-eGFP-IRES-DsRed2, B16-eGFP y B16-DsRed2.

#### 6.4 Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

Para determinar la expresión del ARN mensajero de *PTHrP*, *Rpl32*, *Rankl* y *Opg*, se realizaron extracciones de ARN de las células con el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma) o con TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo de los proveedores. Las extracciones de ARN con el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep fueron eluidos con 30 µL de solución de elución, mientras que las muestras con TRIzol se eluyeron con 20 µL de agua libre de ARNasas. Posteriormente se evaluó la concentración de ARN por Nanodrop (Thermo Scientific), y la integridad por medio de electroforesis. Después, se obtuvo el ADNc con el kit de transcripción inversa SuperScript III (Thermo Scientific) o SuperScript II (Thermo Scientific), usando 50-250ng de ARN total y un oligo(dT) anclado [(dT)<sub>20</sub>VN]. Finalmente, la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un volumen total de reacción de 10 µL utilizando el mix de PCR QuantiTECT SYBR GREEN 2x (Qiagen) y oligonucleotidos a una concentración de 400nM (Tabla II). Las muestras fueron sometidas a 40 ciclos de amplificación (Tabla III) en el termociclador en tiempo real 7500

(Applied Biosystems). Los niveles de expresión de los genes de interés fueron normalizados con el gen constitutivo *Rpl32*. Cada muestra se estudió por triplicado.

| Gen          | Sentido                  | Antisentido               |
|--------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Rpl32</i> | CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG | CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC |
| <i>Pthrp</i> | CAGCCGAAATCAGAGCTACC     | CAGCCGAAATCAGAGCTACC      |
| <i>Rankl</i> | AGCCGAGACTACGGCAAGTA     | GCGCTCGAAAGTACAGGAAC      |
| <i>Opg</i>   | CCAAGCATGCTGAGTGAGAA     | CAGCTGTGAGGAGAGGAAGG      |

**Tabla II. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de RT-qPCR.

| Temperatura | Tiempo (seg) |             |
|-------------|--------------|-------------|
| 95°C        | 2:00         |             |
| 95°C        | 0:15         | } 40 ciclos |
| 58°C        | 0:30         |             |
| 72°C        | 0:30         |             |
| 95°C        | 1:00         |             |
| 55°C        | 1:00         | 80 ciclos   |
| 55°C        | 0:10         |             |
| 12°C        | ∞            |             |

**Tabla III.** Programa de RT-qPCR

## 6.5 Estabilidad de expresión de la PTHrP

La estabilidad de expresión de la PTHrP en las células B16-PTHrP se estudió cultivando las células en presencia o ausencia de puromicina durante 15 días, tiempo estimado de sobrevivencia de los ratones C57BL/6 post-inoculación intracardiaca de células cancerosas. Después de 15 días, preparamos ARN total de las células para comparar los niveles de expresión de PTHrP por medio de RT-qPCR como se describió antes.

## 6.6 Ensayo de proliferación celular

Para comparar la proliferación entre las distintas células, se realizó un ensayo colorimétrico de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a un compuesto púrpura (formazán). La duración del experimento fue de 7 días. En el día 0, las células se sembraron en 4 placas de 96 pozos utilizando 500 o 1000 células en 150  $\mu$ L de medio por pozo, por cuadruplicado. Para evaluar la cantidad de células vivas, se agregó en cada pozo 20  $\mu$ L del compuesto MTT (5 mg/mL). Tras 4 horas de incubación, se adicionó 100  $\mu$ L de solución de lisis. Posteriormente se incubaron nuevamente las células por 16-20 horas a 37°C y se leyó la absorbancia a 570 nm con el espectrofotómetro de placa Epoch (Biotek).

## 6.7 Preparación de medios condicionados

Los medios condicionados se prepararon a partir de las células B16-PTHrP #2, y #3, B16-eGFP y B16-F1 parentales, con confluencia de 80-90%, se retiró el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con PBS (1x). El medio de cultivo se sustituyó por medio RPMI libre de suero fetal bovino, suplementado con 0.1% de albumina de suero bovino (BSA) y 1% de Ab-Am. Después de

48 horas de incubación, se colectaron los medios en tubos y se mantuvieron en hielo. Los medios condicionados fueron centrifugados a 1000g por 5 minutos a 4°C, para quitar células muertas y los debris celulares. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se evaluó el volumen final de medio condicionado antes de adicionar HEPES (1/50) (Invitrogen) y Ab-Am (1%). Se realizaron alícuotas que fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

### **6.8 Detección de la expresión de PTHrP a nivel proteico por HPLC**

Para detectar la presencia de la PTHrP en las muestras de medio condicionado, se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el cromatógrafo de líquidos (Agilent Technologies). Para conseguir muestras con mayor concentración de proteínas, los medios condicionados fueron liofilizados. Posteriormente fueron rehidratadas con 600 µL de TFA (0.1%) y se inyectaron 200 µL en la columna de HPLC (Vydac C18), que fue equilibrada con 0.1% TFA/acetonitrilo. La columna fue eluída con un gradiente de acetonitrilo en 0.1% TFA: 5 min 0-12% (v/v), 10 min 12-27% (v/v), 30 min 27-39% (v/v), 35 min 39-60% (v/v), que fueron detectados con una longitud de onda de 210 nm.

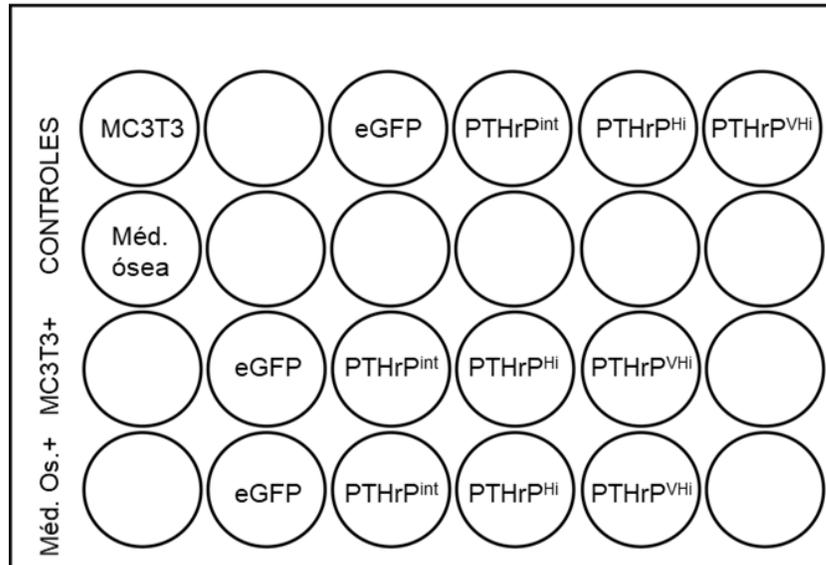
### **6.9 Selección de clones de células B16-F1 con expresión de PTHrP**

Para comprobar el nivel de expresión de PTHrP en las células B16-F1 modificadas, se realizó una selección de clonas de la siguiente manera: se hizo una dilución de 13.332 células/mL de B16-PTHrP #2 y B16-PTHrP #3, y se sembraron 24 pozos con 100 o 150 µL en una placa de 96 pozos. Después de 5 días, se identificaron y siguieron cultivando hasta confluencia aquellos pozos que tenían presencia de solo una colonia de células. Se hizo extracción de ARN con TRIzol de 19 clones para PTHrP #2 y 16 clones para PTHrP #3. La expresión de PTHrP se cuantificó por SYBR

green RT-qPCR, utilizando a RPL32 como gen *housekeeping* y se comparó con células 4T1, B16-F1 y el cultivo sin selección de PTHrP #2 o #3. A partir del nivel de expresión de PTHrP, se clasificaron los clones en grupos con nivel de expresión de PTHrP intermedio (PTHrP<sup>int</sup>), alto (PTHrP<sup>hi</sup>) o muy alto (PTHrP<sup>vhi</sup>).

### 6.10 Efecto de las células B16-PTHrP en la expresión de genes en células tipo osteoblastos

A partir de la cuantificación de ARNm de las clonas evaluadas, se seleccionaron aquellas que tuvieran una expresión intermedia, alta y muy alta de PTHrP #2 en comparación a las células 4T1. Fueron cultivados hasta confluencia, al igual que las células B16-eGFP, MC3T3-E1 y células extraídas de médula ósea de ratón C57BL/6. Se hizo una dilución de 400,000 células/mL de cada tipo celular y se sembraron 500  $\mu$ L en el pozo correspondiente, en una placa de 24 pozos. Las células fueron sembradas de tal manera que se cultivaron las células MC3T3-E1 o las células de médula ósea en ausencia o presencia de células B16-eGFP, B16-PTHrP<sup>int</sup>, B16-PTHrP<sup>hi</sup> o B16-PTHrP<sup>vhi</sup> (Fig.3). Después de 24 horas de incubación en una atmósfera humedecida con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C se retiró el medio de cultivo de los pozos y se realizó una extracción de ARN mediante el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep. Se evaluó la integridad y calidad del ARN extraído y posteriormente se hizo una retrotranscripción con el kit SuperScrip II. Se cuantificó la expresión de RANKL y OPG mediante RT-qPCR, usando el gen de referencia RPL32 y se determinó la relación RANKL/OPG para reconocer algún efecto de PTHrP en el hueso.



**Figura 3. Distribución de co-cultivos de células cancerosas con células tipo osteoblasto y de médula ósea.**

## 6.11 Experimentación animal

### 6.11.1 Manejo y cuidado de ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 obtenidos a partir de las cruces puestas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica. Fueron mantenidos en jaulas con alimento y agua *ad libitum* con ciclos de luz/oscuridad controlados (12 horas luz, 12 horas oscuridad). El manejo de los ratones se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999

### 6.11.2 Disección de calvarias

Las calvarias fueron disectadas de una camada de 10 ratones C57BL/6 de 4-5 días de edad, bajo condiciones de esterilidad, siguiendo el protocolo de Mohammad y colaboradores (2008) con algunas modificaciones.

Los ratones se sumergieron en etanol al 95% durante 2 segundos con la ayuda de pinzas de disección, posteriormente fueron decapitados con tijeras. Se colocó la cabeza en una caja Petri con PBS 1X, para eliminar restos de sangre. Después se depositó la cabeza en otra caja Petri para extraer las calvarias. Se retiró el cuero cabelludo con la ayuda de microtijeras, asegurando de remover el máximo del cuero cabelludo. Se identificaron las suturas craneales y se hizo un primer corte penetrando en un extremo de la sutura lambdoide con microtijeras hacia al otro extremo. Después a partir de un cada uno de los extremos de la sutura lambdoide se realizaron cortes rectos hacia la sutura coronal, cerca del nivel de los ojos. A partir de estos cortes, hacer otros cortes rectos, en un ángulo de 45°, hacia el centro de la fontanela anterior. Se extrajo la calvaria con pinzas de punta fina curva y se realizó un corte recto con bisturí, atravesando la sutura sagital desde la fontanela posterior hasta la fontanela anterior. Las hemicalvarias se mantuvieron en una caja Petri con PBS 1X hasta su cultivo.

### 6.11.3 Cultivo de calvarias

Para observar el efecto de la PTHrP producido por células cancerosas en el hueso, las hemicalvarias fueron cultivadas en presencia de medio condicionado.

Las hemicalvarias se transfirieron a pozos de una placa de 24 con 1 mL de medio RPMI con 5% de SFB y fueron preincubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>. Al fin del tiempo de preincubación el medio fue sustituido por el medio condicionado correspondiente. Se utilizaron 4 hemicalvarias por condición: medio basal, B16-eGFP, B16-PTHrP #2 y #3. La incubación de las hemicalvarias en presencia del medio condicionado se realizó durante 10 días, haciendo cambio de medio cada 2-3 días.

### 6.11.3.1 Caracterización histológica

El área ósea de las hemicalvarias se determinó mediante una tinción con hematoxilina y eosina de secciones de tejidos desmineralizados. Los huesos se colocaron en casetes histológicos sobre una cama de gasa. Fueron fijadas en formalina 10% durante 24 horas y posteriormente colocados en PBS 1X durante 24 horas. Las hemicalvarias fijadas fueron descalcificadas en una solución de EDTA 0.34 M (pH 7.2) en un cuarto frío por 48 horas.

Las muestras fueron deshidratadas en un procesador automático histoquinette LEICA TP **1040**, en una serie de soluciones de etanol, xileno y parafina fundida (Tabla IV). Al terminar, las hemicalvarias se incluyeron en parafina fundida en un molde de aluminio utilizando un incluidor LEICA WG 1160. Se realizaron cortes de 6 mm con el micrótopo LEICA RM2245, a distintos niveles del tejido y se colocaron en baño de temperatura a 40°C, para después montarlas en portaobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se incubaron a 60°C durante la noche, para mejorar la adhesión de los cortes.

| REACTIVO    | TEMPERATURA | TIEMPO  |
|-------------|-------------|---------|
| Etanol 80%  | Ambiente    | 1 hora  |
| Etanol 95%  | Ambiente    | 2 horas |
| Etanol 95%  | Ambiente    | 2 horas |
| Etanol 100% | Ambiente    | 2 horas |
| Etanol 100% | Ambiente    | 2 horas |
| Etanol 100% | Ambiente    | 1 hora  |
| Xileno      | Ambiente    | 1 hora  |
| Xileno      | Ambiente    | 2 horas |

|          |       |         |
|----------|-------|---------|
| Parafina | 58 °C | 2 horas |
| Parafina | 58 °C | 2 horas |
| Parafina | 58 °C | 2 horas |

**Tabla IV.** Protocolo de procesamiento de hemicalvarias.

Posteriormente los cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados siguiendo el protocolo de la tabla V. Luego se tiñeron con hematoxilina y eosina (0.6% eosina Y + 2% orange G + 1% floxina) (Tabla VI) y por último, fueron cubiertas en resina sintética y cubreobjetos. Fueron observadas las muestras en un microscopio (**nombre**) y se tomaron fotografías que fueron analizadas por medio del software ImageJ (NIH).

| REACTIVO    | TIEMPO    |
|-------------|-----------|
| Xileno I    | 2 minutos |
| Xileno II   | 2 minutos |
| Etanol 100% | 1 minuto  |
| Etanol 100% | 1 minuto  |
| Etanol 95%  | 1 minuto  |
| Etanol 95%  | 1 minuto  |
| Etanol 80%  | 1 minuto  |
| Agua        | 5 minutos |

**Tabla V.** Protocolo de desparafinación y rehidratación de cortes histológicos de calvarias.

| REACTIVO                 | TIEMPO/ INDICACIÓN                          |
|--------------------------|---|
| Hematoxilina             | 30 segundos                                 |
| Agua                     | Dejar correr hasta que desaparezca el color |
| Etanol ácido 1%          | 10 sumergidas                               |
| Agua                     | Dejar correr, hacer 6 intercambios de agua  |
| Carbonato de Litio       | 2 minutos                                   |
| Agua                     | Dejar correr, hacer 5 intercambios de agua  |
| Etanol 96%               | 1 minuto                                    |
| Eosina/Orange G/ Floxina | Sumergir por 2 minutos                      |
| Etanol 96%               | 1 minuto                                    |
| Etanol 96%               | 1 minuto                                    |
| Etanol 100%              | 1 minuto                                    |
| Etanol 100%              | 1 minuto                                    |
| Xileno I                 | 5 minutos                                   |
| Xileno II                | 10 minutos                                  |

**Tabla VI.** Protocolo para tinción de cortes de hueso con hematoxilina y eosina.

#### 6.11.4 Inoculación intracardiaca

Para desarrollar un modelo de metástasis piloto se seleccionaron 10 ratones C57BL/6 hembra de ocho semanas de edad, de las cuales 5 fueron inoculadas con células B16-F1 y 5 con células B16-PTHrP-IRES-DsRed2 (B16-PTHrP #3) en el ventrículo izquierdo del corazón. La concentración de células que fueron inoculadas fue de  $10^5$  células/100  $\mu$ l PBS.

Las células fueron cultivadas previamente en cajas de 15 cm de diámetro con 25 mL de medio RPMI con 5% SFB e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue sustituido por medio fresco un día antes de la inoculación. En el día de la inoculación las células fueron preparadas de la siguiente manera: dos lavados con 10 mL de PBS 1X, tripsinización con 4 ml de solución, después la reacción se paró con 6 mL de medio y se transfirió la suspensión celular a un tubo de 50 mL frío, se completó el volumen a 50 mL con PBS 1X frío. Posteriormente se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 50 mL de PBS 1X frío y se volvió a centrifugar a 200 g por 10 min a 4°C, este paso se repitió dos veces. Se calculó el número de células en suspensión con un hematocitómetro.

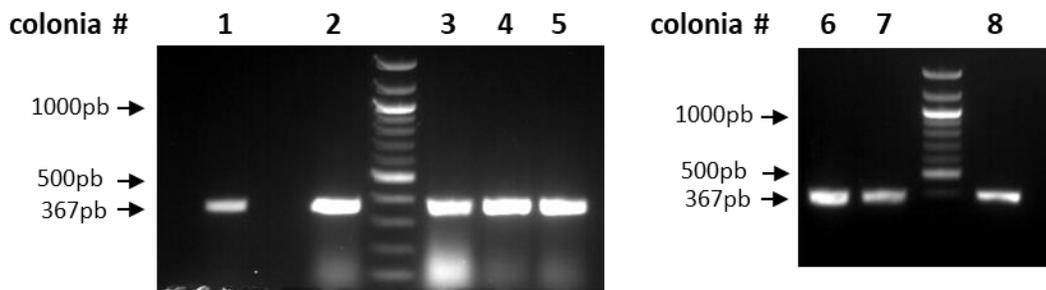
Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal y depilados del área torácica previamente a la inoculación. Se insertó la jeringa en el ventrículo izquierdo y se administraron 10<sup>5</sup> células/ 100 µl PBS, al retirar la jeringa se presionó suavemente el área torácica para prevenir y detener hemorragias. Después de la inoculación, los ratones se mantuvieron en un tapete de temperatura para evitar hipotermia, así como rehidratación ocular con ungüento oftálmico e inyección intraperitoneal de PBS 1X para disminuir el efecto de la anestesia. Una vez los ratones despertaran, se colocaron en sus jaulas de mantenimiento.

Los ratones fueron pesados un día antes y cada dos días después de la inoculación. Los huesos recolectados después de la eutanasia, fueron fijados en formalina al 10% o en etanol al 70% por 48 horas, y se almacenaron en etanol al 70% para su posterior análisis.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Preparación de un vector bicistrónico para expresión de PTHrP o eGFP con DsRed2

Para generar un vector bicistrónico con expresión de PTHrP en un sistema lentiviral, primero se realizó una subclonación de la secuencia MCS-IRES-DsRed2, del vector pIRES2-DsRed2, en el vector lentiviral pLJM1. Se seleccionaron 8 clones transformantes, a partir del cultivo en placa y se confirmó la presencia del inserto por PCR de colonia, que se demuestra en el gel de electroforesis (Fig. 4). El clon #4 fue seleccionado para purificación, obteniéndose una concentración de ADN de 516 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.87) del nuevo plásmido pLJM1-IRES-DsRed2.

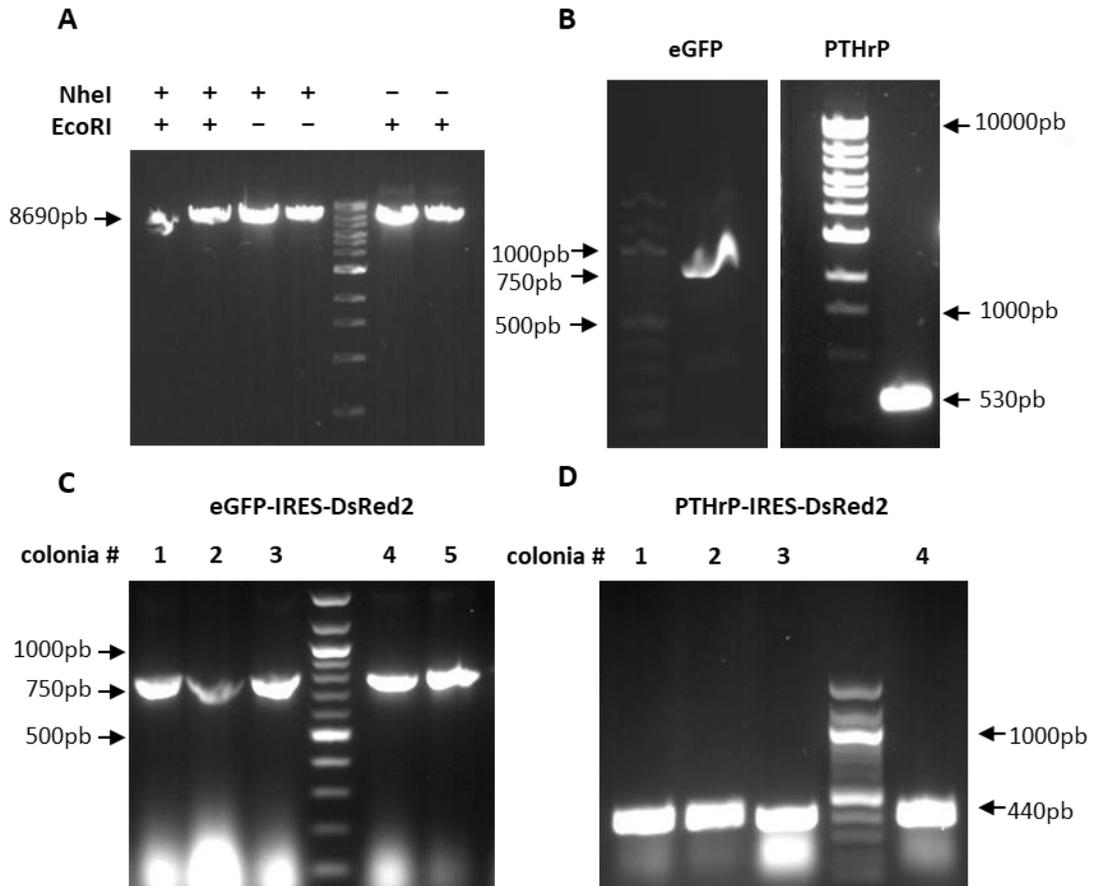


**Figura 4.** Subclonación del fragmento IRES-DsRed2 en el vector lentiviral pLJM1. Colonias transformadas con pLJM1-IRES-DsRed2.

La segunda parte fue insertar las secuencias de eGFP o PTHrP en el nuevo plásmido pLJM1-IRES-DsRed2. Se hizo una digestión enzimática del plásmido purificado, con las endonucleasas NheI y EcoRI. Para confirmar que las dos enzimas cortaron el plásmido, se hicieron también reacciones de digestión con solo NheI o solo EcoRI. Mediante electroforesis, se corroboró que en las 3 reacciones se detectó solamente una banda correspondiente al peso

molecular indicando que hubo linearización del plásmido y que las dos enzimas funcionaron bien (Fig. 5A). El plásmido linearizado con NheI y EcoRI fue purificado a partir de un gel de agarosa y se obtuvo una concentración de ADN de 373 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.85).

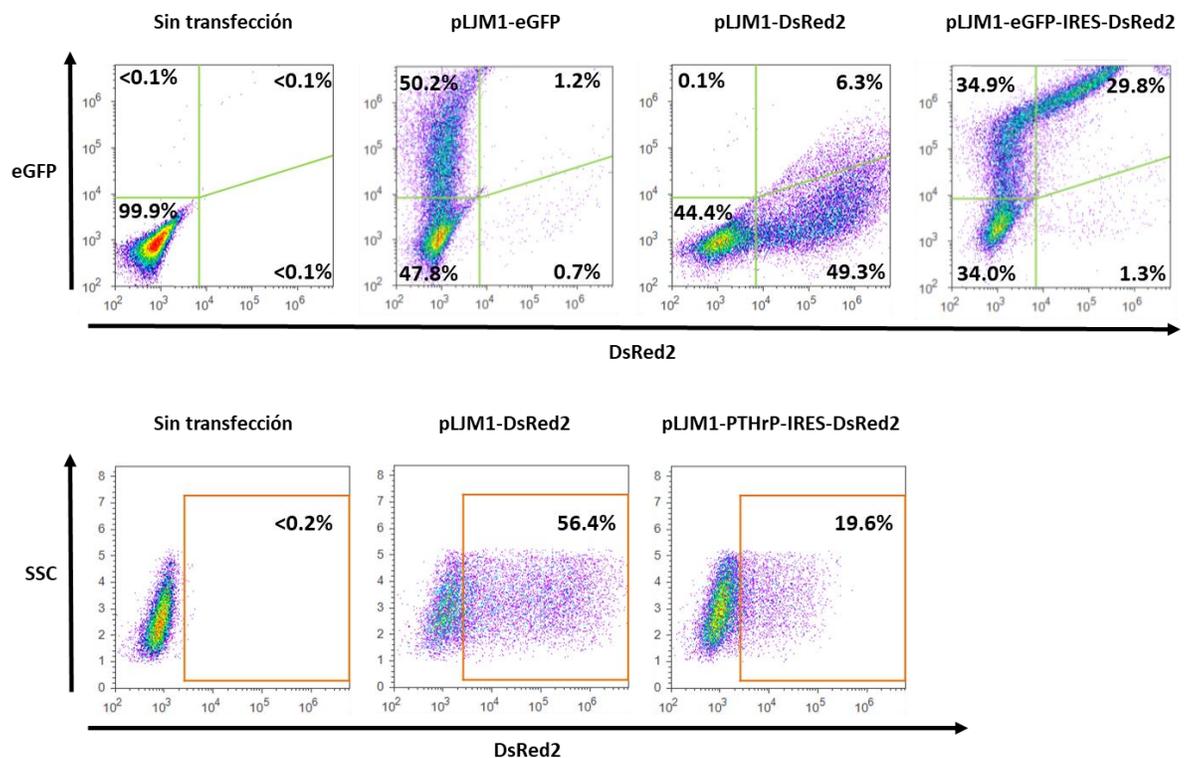
La secuencia codificante de eGFP se obtuvo por PCR a partir del plásmido pLJM1-eGFP, mientras que la secuencia de PTHrP de ratón a partir de un plásmido pLJM1-PTHrP. Se hizo un análisis de los productos de PCR por electroforesis y se detectaron bandas a los pesos moleculares esperados, indicando que se amplificaron correctamente las secuencias de eGFP y PTHrP (Fig. 5B). La concentración de ADN de eGFP fue de 429.0 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.88), mientras que para PTHrP de 611.6 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.84). Se prosiguió a realizar la subclonación de eGFP o PTHrP en el plásmido pLJM1-IRES-DsRed2, linearizado. Se confirmó por PCR de colonia la presencia de eGFP o PTHrP, en los clones seleccionados (Fig. 5C y D). Se purificó un clon de cada plásmido pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2 y pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2, y se obtuvo una concentración de ADN de 425 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.87) y 374 ng/  $\mu$ L (A260/A280: 1.87), respectivamente.



**Figura 5. Subclonación de las secuencias de GFP o PTHrP en el plásmido pLJM-IRES-DsRed2. (A)** Plásmido pLJM1-IRES-DsRed2 linearizado con las endonucleasas NheI y/o EcoRI. **(B)** Amplificación por PCR de los insertos eGFP (750 pb) y PTHrP (530 pb). Amplificación de colonias transformadas con los vectores: **(C)** eGFP-IRES-DsRed2 (750 pb) y **(D)** PTHrP-IRES-DsRed2 (440 pb).

Para confirmar que los vectores bicistronicos eran capaces de producir la proteína fluorescente DsRed2 y la proteína de interés se transfectaron las células 293T, primero, con el plásmido pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2 o con los plásmidos pLJM1-eGFP o pLJM1-DsRed2, como controles. Se analizó por citometría de flujo la fluorescencia de la proteína verde y roja en las

células transfectadas con pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2. Obteniendo 64.7% de células eGFP<sup>+</sup>, 31.1% de células DsRed2<sup>+</sup> y 29.8% de células doble-positivas (eGFP<sup>+</sup>DsRed2<sup>+</sup>) (Fig. 6). Cuando transfectamos el plásmido pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2 en células 293T, detectamos 19.6% de células DsRed2<sup>+</sup> (Fig. 6). Por lo anterior, podemos concluir que el sistema bicistrónico funciona parcialmente. Aunque hay células GFP<sup>+</sup> que son DsRed2<sup>-</sup>, todas las células DsRed2<sup>+</sup> son GFP<sup>+</sup> y por lo tanto podría suceder lo mismo con las células transfectadas con pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2, es decir, las células DsRed2<sup>+</sup> deberán tener expresión de PTHrP.



**Figura 6. Expresión de eGFP y DsRed2 en células 293T transfectadas.** Citometrías de flujo de células transfectadas con los plásmidos pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2 (Panel superior) y pLJM1-PTHrP-IRES-DsRed2 (Panel inferior). SSC: side scatter, morfología celular.

## 7.2 Preparación de células B16-F1 con expresión de GFP o PTHrP

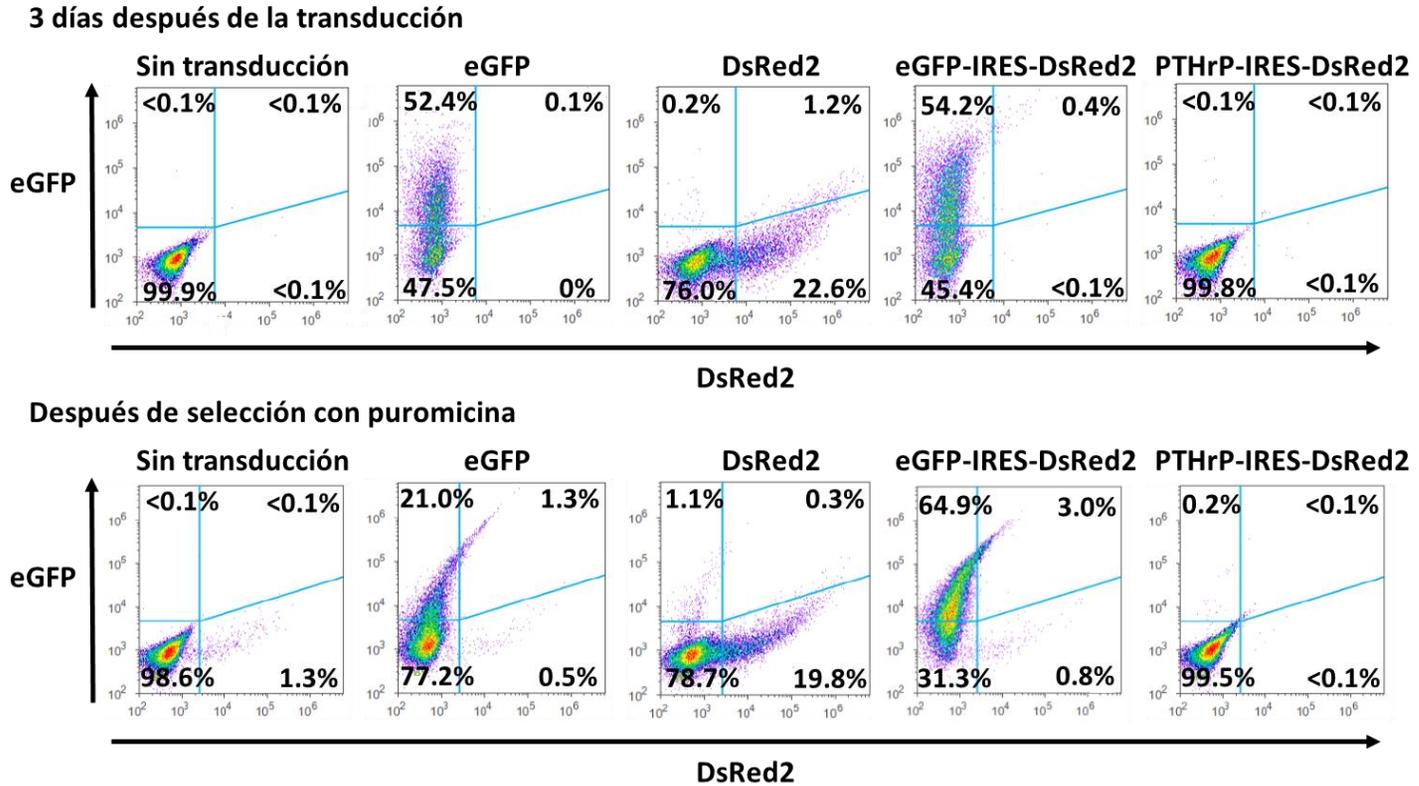
### 7.2.1 Transducción lentiviral para expresión de PTHrP o GFP en células B16-F1

Para obtener células B16-F1 con expresión constitutiva y estable de PTHrP, usamos un sistema de transducción lentiviral. Se obtuvieron partículas lentivirales a partir de células 293T transfectadas con plásmidos de un sistema lentiviral para la expresión de PTHrP o de eGFP, como proteína control, en tándem con la DsRed2. Tres días después de la transducción se analizaron las células por citometría de flujo. Las células que recibieron las partículas lentivirales con eGFP-IRES-DsRed2 tuvieron expresión de eGFP (54.6% eGFP<sup>+</sup>) y expresión baja de DsRed2 (<0.6%% de DsRed2) (Fig. 7). No se detectó la expresión de DsRed2 con las células que recibieron las partículas lentivirales con PTHrP-IRES-DsRed2 (<0.1% DsRed2<sup>+</sup>). Este resultado sugiere que hubo baja eficiencia de transducción con las células B16-F1 o baja expresión de las proteínas fluorescentes o de interés. Por lo que cultivamos las células B16-F1, con o sin transducción, en presencia de puomicina para seleccionar aquellas que recibieron las partículas lentivirales. Después de 7 días de cultivo, todas las células sin transducción murieron y parte de las células con transducción sobrevivieron.

Se realizó una segunda citometría de flujo en la cual se mostró que para las células B16-eGFP-IRES-DsRed2, el porcentaje de expresión de eGFP fue de 67.9% y para DsRed2 fue de 3.8%, mientras que para las células B16-PTHrP-IRES-DsRed2 fue de <0.1% para DsRed2. Se realizaron 2 experimentos de transducción adicionales y se obtuvieron resultados similares. Aunque pudimos detectar la expresión de GFP, no se detectó la expresión de DsRed2 o se detectó en un porcentaje muy bajo de la población. Después de la selección con puomicina, todos los cultivos mostraron un aumento del porcentaje de células con expresión GFP, para el caso de la transducción con eGFP-IRES-DsRed2 (Fig. 7).

Considerando que no se detectó la expresión de DsRed2 con los sistemas eGFP-IRES-DsRed2 y PTHrP-IRES-DsRed2, se sugiere que no funcionó el sistema de expresión bicistónica en el contexto de los experimentos de transducción lentiviral. Sin embargo, la detección de células GFP<sup>+</sup> después de la transducción con el sistema pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2 o el sistema pLJM1-eGFP y la detección de células DsRed2<sup>+</sup> después de la transducción con el sistema pLJM1-DsRed2 nos indica que el proceso de transducción lentiviral fue exitoso. Dicho lo anterior, se hizo la hipótesis de que las células transducidas con PTHrP-IRES-DsRed2, probablemente si expresan la PTHrP, por lo que se decidió hacer una RT-qPCR para detectar la presencia a nivel de ARNm de PTHrP.

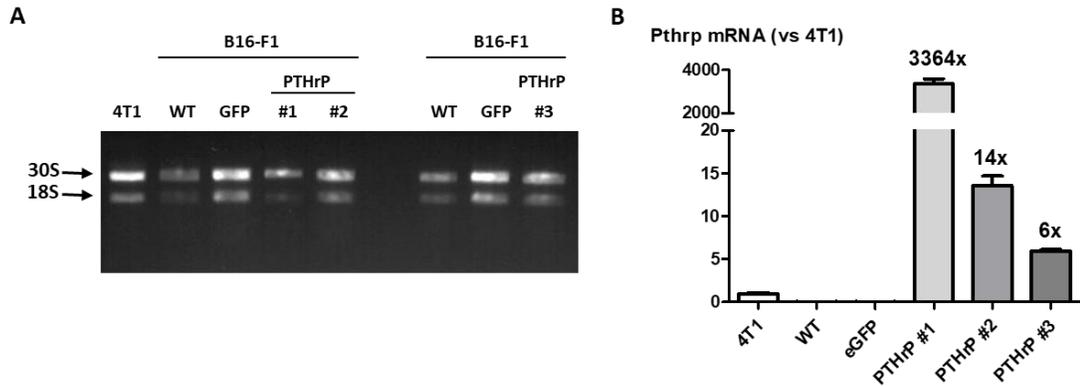
Figura 7. Expresión de GFP y DsRed2 en células B16-F1 transducidas, antes y después del proceso de selección con puromicina.



Citometrías de flujo de células transducidas con eGFP, DsRed2 (controles), eGFP-IRES-DsRed2 o PTHrP-IRES-DsRed2 antes (panel superior) y después de ser seleccionadas con puromicina (panel inferior). Las citometrías de flujo de las células transducidas con PTHrP-IRES-DsRed2 son representativas para los tres experimentos independientes con este sistema.

### 7.2.2 Cuantificación de la expresión de ARNm de la PTHrP por RT-qPCR

Para confirmar la expresión de la PTHrP en las células transducidas con PTHrP-IRES-DsRed2, se cuantificó el ARNm mediante RT-qPCR en las 3 poblaciones de células B16-F1 transducidas con PTHrP-IRES-DsRed, denominadas B16-PTHrP #1, #2 y #3. En este experimento fueron incluidas las 3 poblaciones de células B16-F1 transducidas con PTHrP-IRES-DsRed (B16-PTHrP #1, #2 y #3), así como las células transducidas con eGFP (B16-eGFP), y las células B16-F1 parentales (WT) como controles negativos. Usamos células 4T1, como control positivo de expresión de la PTHrP. Primero se hizo extracción de todos los ARN de todas las muestras y se cuantificó con Nanodrop, las concentraciones de ARN fue de los 112 a 560 ng/  $\mu$ L. La integridad del ARN total extraído pareció ser de buena calidad, ya que no mostró ningún barrido entre las bandas de las subunidades ribosomales (Fig. 8A). Después de la retrotranscripción, se evaluó la expresión de la PTHrP y de Rpl32, el gen de *housekeeping*, por PCR en tiempo real con SYBR Green. Aquellas células que fueron modificadas para expresión de la PTHrP mostraron ciertamente un nivel de expresión superior al del control positivo (4T1) (Fig. 8B). Por otro lado, las células controles negativos (WT y B16-eGFP) no mostraron ninguna expresión de la PTHrP, tal como se esperaba (Fig. 8B). Extrañamente la expresión relativa del ARNm de PTHrP en la muestra B16-PTHrP #1, fue mucho más alta en comparación al resto de las muestras (3364 veces más que en las células 4T1).



**Figura 8. Cuantificación de la expresión de la PTHrP por RT-qPCR. (A)** Gel de agarosa con muestras de ARN de células B16-F1 (WT), B16-F1 modificadas y 4T1 (control positivo). **(B)** Expresión relativa de PTHrP en relación a RPL32 en comparación a las células 4T1. Promedios  $\pm$  DS.

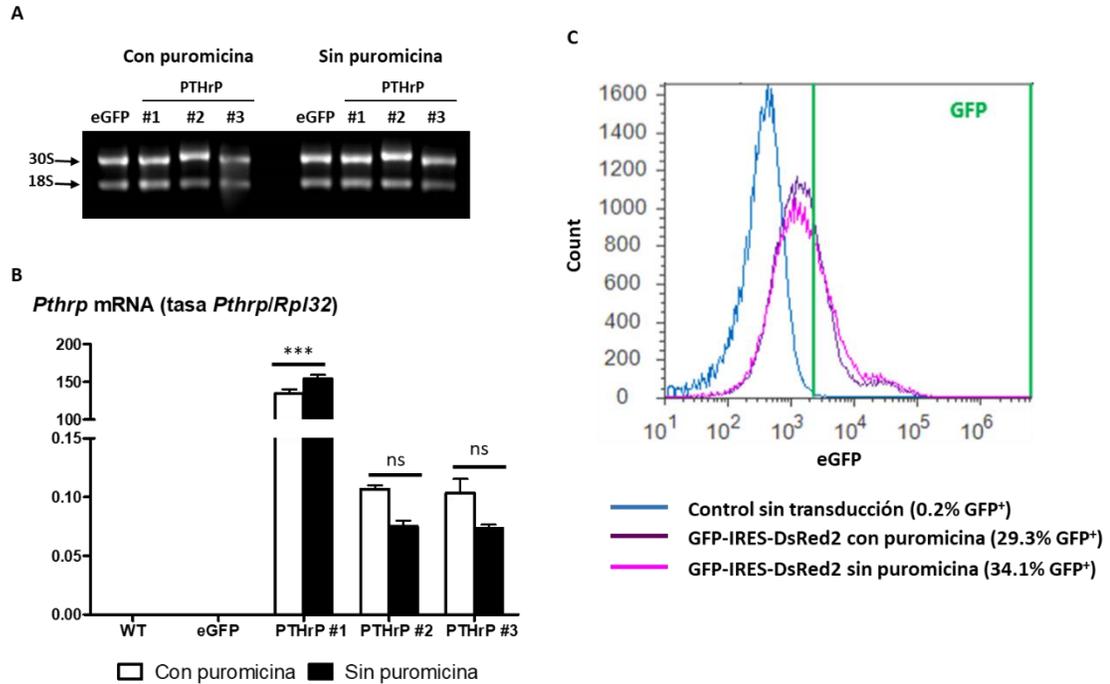
### 7.2.3 Estabilidad de la expresión de PTHrP en células B16-F1

Para comprobar que las células B16-PTHrP #1, #2 y #3 mantendrían el nivel de expresión de la PTHrP una vez que dejaran de ser cultivadas con puromicina, se realizaron dos grupos de cultivo: células en medio con o sin puromicina, durante 15 días. Transcurrido el tiempo de cultivo, se extrajo el ARN de todas las muestras y se cuantificó, todas se mantuvieron entre los 440 y 720 ng/  $\mu$ L. La integridad del ARN total extraído fue de buena calidad, ya que no mostró ningún barrido entre las bandas de las subunidades ribosomales (Fig. 9A). Se obtuvo el ADNc y se evaluó la expresión de la PTHrP por RT-qPCR con SYBR Green con el gen de *housekeeping*, Rpl32. Al calcular la expresión relativa de PTHrP en las células B16-PTHrP sin puromicina se observa que no es significativamente menor en comparación a las de las células con puromicina (Fig. 9B). Por lo anterior se infiere que la expresión de PTHrP en las células B16-F1 es estable y que una vez sean inoculadas a ratones, estas no perderán la expresión de la proteína.

Por otro lado, se observa que la expresión de PTHrP en las células B16-PTHrP #1 es mucho más alta que en las células B16-PTHrP #2 y #3 o 4T1, llegando a niveles supra-fisiológicos (Fig. 8B y 9B). Si comparamos los niveles de expresión no normalizados de PTHrP y Rpl32, se observa que las células B16-PTHrP #1 tienen niveles altos de PTHrP, en conjunto con niveles bajos de Rpl32 (Anexo 1A). Sin embargo, no hay diferencias de los niveles de expresión no normalizados de Rpl32 entre las células B16-eGFP, B16-PTHrP #2 y #3 o de PTHrP entre las células B16-PTHrP #2 y #3 (Anexo 1B). Por lo que concluimos que el nivel muy alto de expresión normalizada de PTHrP en las células B16-PTHrP #1 se debe a la conjunción de niveles altos de PTHrP y bajos de Rpl32. Debido a esto se decidió eliminar las células B16-PTHrP #1 y usar las células B16-PTHrP #2 y #3 para el resto de los experimentos.

#### 7.2.4 Estabilidad de la expresión de eGFP en células B16-F1

Para comprobar que las células transducidas con eGFP-IRES-DsRed2 mantendrían el nivel de expresión de la GFP, se repitió el mismo experimento para la estabilidad de PTHrP, obteniendo dos grupos de cultivo: con y sin puromicina. En este caso, la estabilidad de expresión de GFP se cuantificó por citometría de flujo. Al comparar los niveles de expresión de eGFP en los cultivos con o sin puromicina, se observó que son muy similares, ya que muy pocas células perdieron la expresión de eGFP después de cultivarlas sin puromicina (Fig. 9C). Las células con eGFP-IRES-DsRed2 mantienen un nivel de expresión de la proteína de interés después de 15 días de cultivo con o sin puromicina, por lo que también se podrían inocular en ratones.

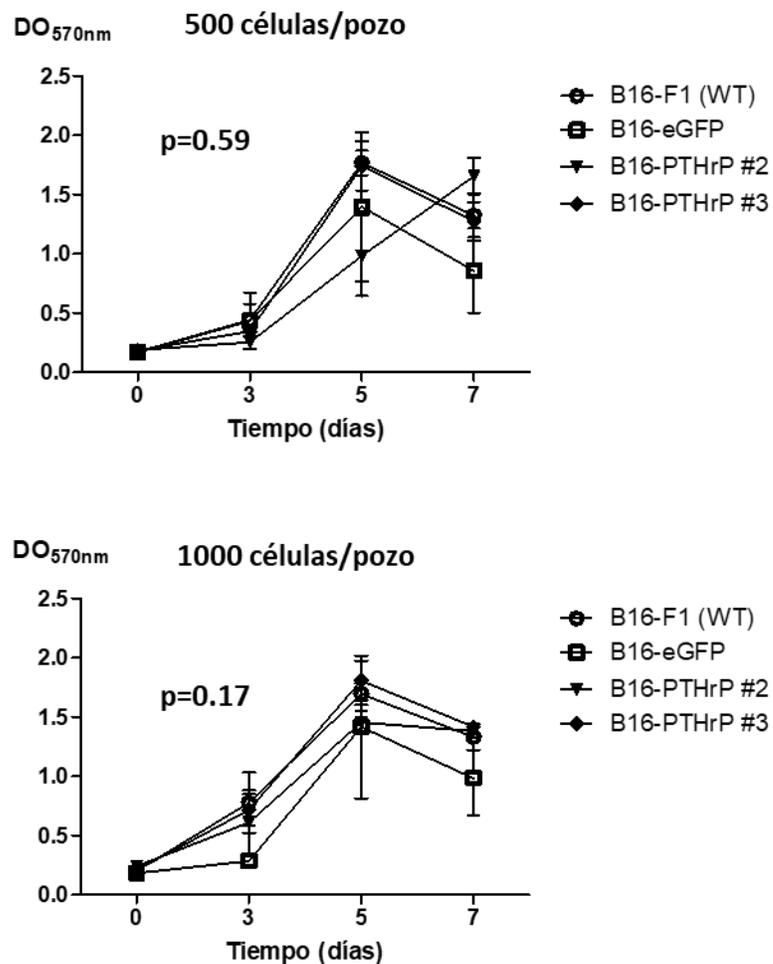


**Figura 9. Estabilidad de expresión de la PTHrP o GFP en células B16-F1. (A)** Gel de agarosa con muestras de ARN de células B16-F1 modificadas, cultivadas con presencia o ausencia de puromicina. **(B)** Expresión relativa de PTHrP en relación a RPL32. Promedios  $\pm$ DS; \*\*\* $p < 0.001$  usando ANOVA de dos-vías con el posttest de Bonferroni. **(C)** Citometría de flujo para detección de la expresión de GFP en células B16-F1, transducidas con eGFP-IRES-DsRed2, en medio de cultivo con o sin puromicina.

### 7.3 La expresión de PTHrP en células B16-F1 no interfiere en la proliferación

Para evaluar si la transducción o la producción de eGFP o PTHrP afecta a la proliferación de las células B16-F1 se utilizó el ensayo de viabilidad MTT. Se sembraron 500 o 1,000 células por pozo en placa de 96 pozos y se analizó la cantidad de células vivas con MTT durante 7 días de cultivo. Las células con expresión de PTHrP (B16-PTHrP #2 y #3) se comportan similarmente, en cuanto a su crecimiento, en comparación a las B16-F1 y B16-eGFP (control de transducción), para ambas

condiciones (500 y 1000 cél/pozo) (Fig. 10). Por lo tanto, se determinó que la proliferación de las células B16-F1 no se ve afectada por la expresión de eGFP o PTHrP, o por la transducción. Lo anterior indica que en un mismo ambiente, *in vitro*, las células deberían proliferar de la misma manera y que la expresión de la PTHrP no es impedimento para ello.



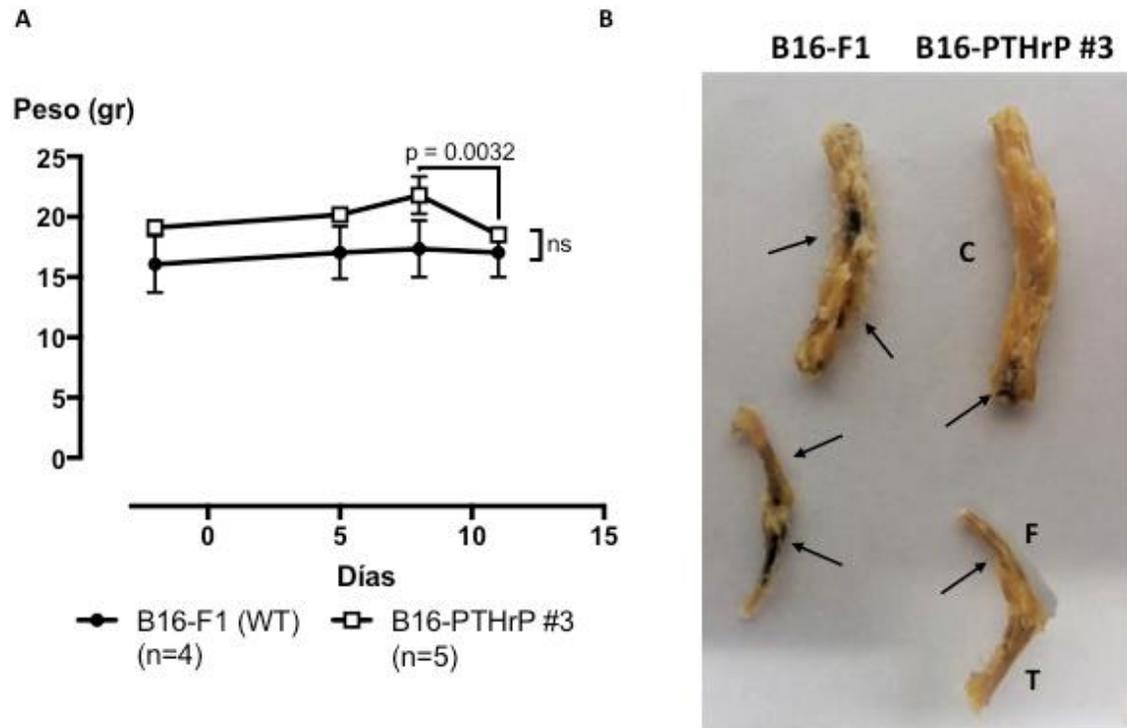
**Figura 10. Proliferación celular de células B16-F1.** Se comparó la proliferación de las células B16-F1 (WT), B16-eGFP, B16-PTHrP #2 y #3 (sembrando 500 o 1000 células por pozo), durante 7 días, en 3 experimentos independientes. La grafica representa los promedios  $\pm$  EE de densidad óptica

de los 3 experimentos. Se hizo un análisis estadístico usando un ANOVA de dos-vías con el posttest de Bonferroni.

#### 7.4 Experimento piloto de metástasis ósea por inoculación intracardiaca de células cancerosas con expresión de PTHrP en ratones C57BL/6

Para desarrollar un modelo de metástasis piloto se seleccionaron 10 ratones hembras C57BL/6 para ser inoculadas de manera intracardiaca con las células B16-F1 modificadas para expresión de PTHrP y probar su capacidad de causar metástasis. Sin embargo, una de las hembras falleció al momento de la inoculación con células B16-F1 (WT), quedando al final 5 ratones para el grupo B16-PTHrP #3 y 4 ratones para B16-F1 (WT) (n=4). Se midió el peso de los ratones dos días antes y cada dos días después de la inoculación (Fig. 11A). Para el caso de los ratones inoculados con B16-F1, el peso se mantuvo similar al de antes de la inoculación hasta la eutanasia. Para los ratones del grupo B16-PTHrP #3, no hubo variación significativa del peso durante los primeros 8 días del experimento. Sin embargo, estos ratones perdieron 15% de su peso entre el día 8 y el día 11,  $21.8 \pm 1.5\text{gr}$  vs  $18.5 \pm 0.4\text{gr}$  ( $p = 0.0032$ ), respectivamente. Al día 14, post-inoculación, los ratones presentaron dificultad para respirar y parálisis de patas traseras por lo que se procedió a sacrificarlos. Se colectaron las extremidades posteriores y la columna vertebral de los ratones y se evaluó la presencia de tumores o metástasis que fueron fácilmente identificados por la presencia de puntos negros debido a la producción de melanina en las células B16-F1. Se observó la presencia de metástasis en la columna vertebral y las patas de todos los ratones inoculados con células WT o B16-PTHrP #3 (Tabla VII y Fig 11B). Se detectó también metástasis en tejidos blandos en algunos ratones (Tabla VII). Por lo tanto, se determinó que la

inoculación intracardiaca en ratones C57BL/6, de células B16-F1 parentales y con expresión de PTHrP, induce metástasis a huesos.



**Figura 11. Experimento piloto de metástasis por inoculación de células B16-F1 modificadas en ratones C57BL/6.** Ratones C57BL/6 hembras de ocho semanas de edad fueron inoculadas con células B16-F1 (WT) (n=4) o B16-PTHrP #3 (n=5) en el ventrículo cardiaco izquierdo para inducir metástasis ósea. **(A)** Seguimiento del peso de los ratones antes y después de la inoculación. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$ EE. Se utilizó el análisis estadístico ANOVA de dos vías con el posttest de Bonferroni. **(B)** Huesos representativos con metástasis. Las flechas indican metástasis; C, Columna vertebral; F, fémur; T, tibia.

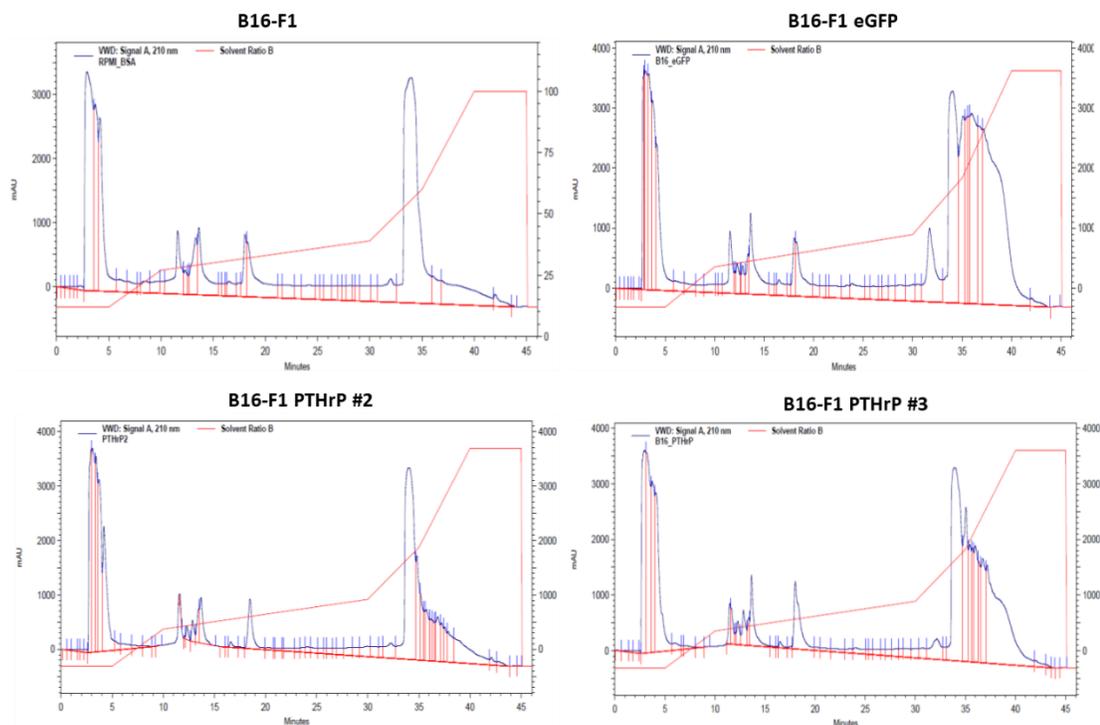
| <b>Metástasis</b>    | <b>B16-F1 (WT)</b> | <b>B16-PTHrP #3</b> |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| Columna vertebral    | 4/4 (100%)         | 5/5 (100%)          |
| Patas                | 4/4 (100%)         | 5/5 (100%)          |
| Costillas            | 0/4 (0%)           | 1/5 (20%)           |
| Pulmón               | 1/4 (25%)          | 0/5 (0%)            |
| Glándula suprarrenal | 0/4 (0%)           | 3/5 (60%)           |
| Ovarios              | 2/4 (50%)          | 4/5 (80%)           |
| Tórax                | 2/4 (50%)          | 2/5 (40%)           |
| Intestino grueso     | 1/4 (25%)          | 0/5 (0%)            |

**Tabla VII. Relación del número de ratones que presentaron metástasis en distintos tejidos.**

### 7.5 Detección por HPLC de la secreción de la PTHrP en células B16-F1 transducidas

Para detectar la producción y secreción de la proteína PTHrP en las células modificadas con PTHrP-IRES-DsRed2, se utilizó la técnica de HPLC, debido a que no existen anticuerpos disponibles para realizar un ensayo ELISA o Western Blot. Se produjo medio condicionado a partir de las células B16-PTHrP #2 y #3 y B16-eGFP y B16-F1 parentales como controles. Se realizó una primera medición por HPLC de los medios condicionados y no se detectó ninguna diferencia entre las muestras (Anexo 2). Debido a esto, se decidió liofilizar los medios condicionados con la finalidad de concentrar las muestras. Se evaluaron nuevamente las muestras por HPLC y al comparar los cuatro cromatogramas podemos observar que lucen prácticamente similares y no

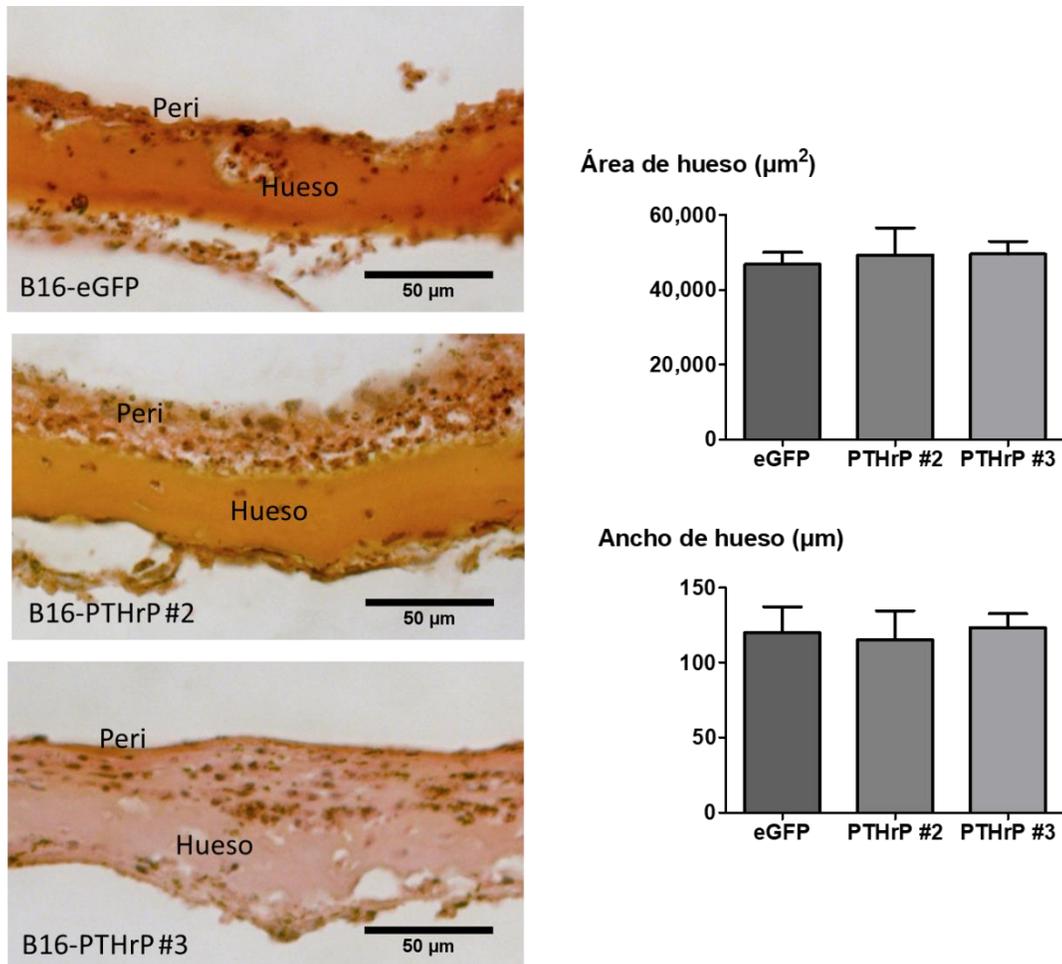
hay ningún pico distintivo entre los controles y las muestras con PTHrP, que sugiera la detección de la proteína de interés (Fig. 12). Lo que nos indica que la concentración de la muestra no fue suficiente para detectar PTHrP, según lo reportado por Soifer *et coll.* (1992). Por lo anterior, no se pudo identificar por HPLC la producción y secreción de la PTHrP en las células B16-F1 modificadas.



**Figura 12. Cromatogramas de medios condicionados a partir de cuatro líneas celulares por HPLC.** Para detectar la presencia de la proteína PTHrP en las muestras de medio condicionado liofilizado, se realizó una cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los resultados se muestran como gráficas representativas del medio control y del condicionado con GFP o PTHrP.

## 7.6 Efecto de medios condicionados en un modelo de cultivo *ex vivo* de calvaria de ratón

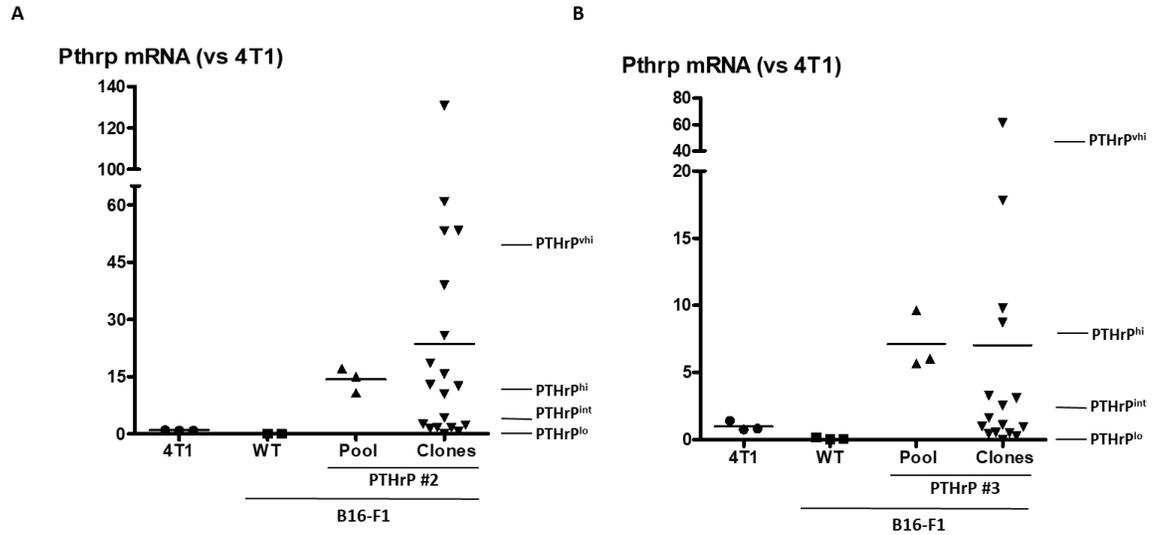
Para comprobar que la secreción de PTHrP por las células B16-PTHrP se realizó un ensayo con hemicalvarias extraídas de ratones C57BL/6, ya que un tratamiento continuo con PTHrP debería inducir la resorción ósea. Las hemicalvarias se cultivaron por 10 días en un medio condicionado de células B16-F1 con expresión de la PTHrP o de la eGFP. Transcurrido el tiempo del tratamiento los huesos fueron procesados histológicamente y teñidos con H&E. Se realizó un análisis histomorfométrico, para medir el ancho y área de hueso de las calvarias. Se obtuvo que no hay diferencia significativa de área o ancho de hueso con los tratamientos (Fig. 13). Por lo anterior, se concluye que no hay efecto de los medios condicionados con células que expresan PTHrP, en comparación con el control, en un ensayo de cultivo de calvaria.



**Figura 13. Análisis del efecto de los medios condicionados con células B16-eGFP o B16-PTHrP en hueso de ratón.** Secciones de hemicalvarias de ratones C57BL/6 teñidas con H&E. *Peri*, periostio. Aumento 40x (panel izquierdo). Promedios de área o ancho de hueso de hemicalvarias de ratones C57BL/6, tratadas con medios condicionados con B16-eGFP o B16-PTHrP (#2 o #3) (panel derecho). Se demuestra que no hay diferencias significativas usando ANOVA de una-vía con el posttest de Bonferroni.

## 7.7 Selección de clones con expresión de PTHrP derivados de células B16-F1 modificadas

Debido a que no se detectó la PTHrP por HPLC o por su función biológica en calvaria y que no funcionó el sistema bicistrónico, se decidió evaluar el porcentaje de células PTHrP<sup>+</sup>. Sabemos que las células B16-PTHrP #2 y #3 son poblaciones heterogéneas en las cuales puede haber niveles de expresión de PTHrP muy diferente entre los clones. Por lo que decidimos evaluar la expresión de ARNm de PTHrP en clones seleccionados a partir de las células B16-PTHrP #2 y #3. Se sembró una célula por pozo en placas de 96 pozos y se confirmó por microscopía la presencia de los clones derivados de una célula. Se cultivaron hasta confluencia 19 clones para PTHrP #2 y 16 para PTHrP #3 y se extrajo el ARN total. Se determinó la expresión de ARNm de PTHrP por PCR en tiempo real. Se observó que más de 93% de los clones, para ambas poblaciones, son PTHrP<sup>+</sup> y que tienen niveles de expresión de PTHrP muy variable desde x0.27 hasta x130.7 en comparación con las células 4T1 (Fig. 14 y Tabla VIII). En base a esto se identificaron y clasificaron los clones PTHrP<sup>+</sup> de acuerdo a su expresión, como: baja (PTHrP<sup>lo</sup>), intermedia (PTHrP<sup>int</sup>), alta (PTHrP<sup>hi</sup>) y muy alta (PTHrP<sup>vhi</sup>) (Tabla VIII). Con lo anterior se puede asegurar que las células cultivadas y utilizadas en los siguientes experimentos, tienen en su totalidad expresión de PTHrP.



**Figura 14. Nivel de expresión de PTHrP en clones derivados de células B16-F1 modificadas. (A)** Expresión relativa de PTHrP en relación a RPL32 en comparación a las células 4T1 para los 19 clones seleccionados de PTHrP #2. **(B)** Relación comparativa de los 16 clones de PTHrP #3 y las células 4T1.

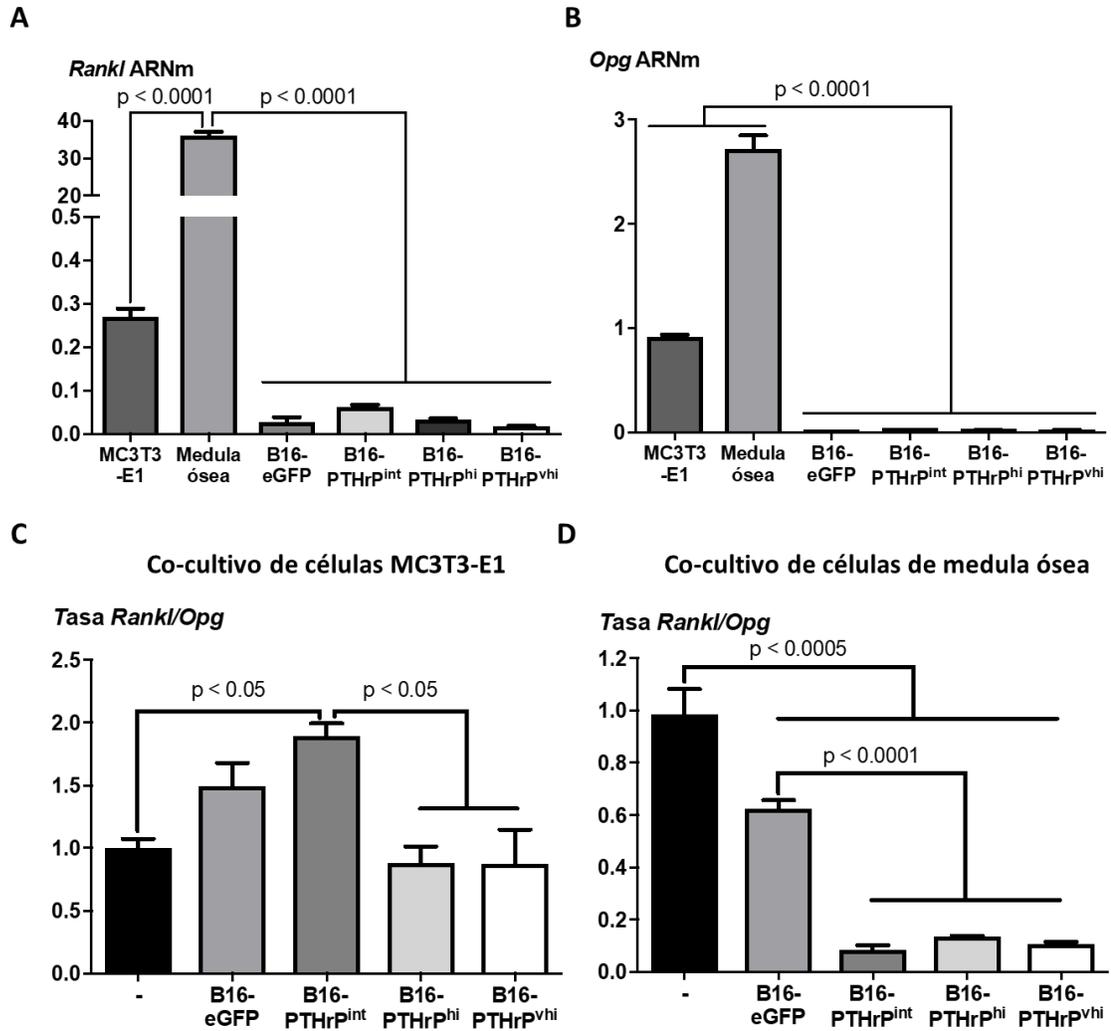
|                      | <b>B16-F1 PTHrP #2</b> | <b>B16-F1 PTHrP #3</b> |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| PTHrP <sup>-</sup>   | 5.2%                   | 6.3%                   |
| PTHrP <sup>+</sup>   | 94.8%                  | 93.8%                  |
| PTHrP <sup>lo</sup>  | 21.1%                  | 50.0%                  |
| PTHrP <sup>int</sup> | 15.8%                  | 18.8%                  |
| PTHrP <sup>hi</sup>  | 36.8%                  | 18.8%                  |
| PTHrP <sup>vhi</sup> | 21.1%                  | 6.3%                   |

**Tabla VIII. Relación porcentual de expresión de PTHrP en clones derivados de B16-PTHrP #2 y B16-PTHrP #3.** Para el caso de PTHrP #2 se utilizaron 19 clones y para PTHrP #3 16 clones. PTHrP<sup>-</sup>, expresión negativa de PTHrP; PTHrP<sup>+</sup>, expresión positiva de PTHrP; PTHrP<sup>lo</sup>, expresión baja de PTHrP; PTHrP<sup>int</sup>, expresión intermedia de PTHrP; PTHrP<sup>hi</sup>, expresión alta de PTHrP; PTHrP<sup>vhi</sup>, expresión muy alta de PTHrP.

### 7.7.1 Efecto directo de la PTHrP producida por células cancerosas en la expresión de genes en células tipo osteoblastos

Para comprobar la producción de PTHrP funcional por las células B16-PTHrP<sup>int</sup>, -PTHrP<sup>hi</sup> y PTHrP<sup>vhi</sup>, decidimos cultivar células de tipo osteoblastos, MC3T3-E1 (fibroblastos de calvaria de ratón) o células de médula ósea de ratón durante 24 horas en presencia o ausencia de células B16-F1 transducidas para tener expresión de eGFP o PTHrP. Se extrajeron los ARNm para medir la expresión de los genes *Rankl* y *Opg* que regulan la resorción ósea. Se observó que las células MC3T3-E1 y las células de médula ósea producen los ARNm de *Rankl* y *Opg* (Fig. 15A y 15B). Las células de médula ósea tienen una expresión más alta de *Rankl* y *Opg* que las células MC3T3-E1. Las células B16-eGFP y B16-PTHrP presentan niveles muy bajos de nuestros genes de interés (Fig. 15A y 15B). Por lo que podemos suponer que solamente las células de tipo osteoblastos produjeron *Rankl* y *Opg*, durante los ensayos de co-cultivo. Cuando las células MC3T3-E1 fueron co-cultivadas con células B16-PTHrP<sup>int</sup> durante 24 horas, hubo un aumento significativo de la tasa *Rankl/Opg* (+49%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 15C). No hubo diferencia significativa de la tasa *Rankl/Opg* en co-cultivos con células B16-eGFP, B16-PTHrP<sup>hi</sup> o B16-PTHrP<sup>vhi</sup>. Sin embargo, la tasa *Rankl/Opg* disminuyó significativamente durante los co-cultivos con células B16-PTHrP<sup>hi</sup> o B16-PTHrP<sup>vhi</sup>, comparando con las células B16-PTHrP<sup>int</sup>, -53% y -54% ( $p < 0.05$ ), respectivamente (Fig. 15C).

Como las células MC3T3-E1 son una línea de fibroblastos de calvaria de ratón, no son osteoblastos, per se. Por lo que co-cultivamos las células B16-F1 con células extraídas de la médula ósea de ratón que tienen expresión más alta de *Rankl* y *Opg*. El co-cultivo de células de médula ósea con células B16-eGFP indujo una disminución significativa de la tasa Rankl/Opg (-37%,  $p < 0.0005$ ). Sin embargo, el co-cultivo con las células B16-PTHrP<sup>int</sup>, -PTHrP<sup>hi</sup> y -PTHrP<sup>vhi</sup> disminuyó aún más la tasa Rankl/Opg, -92%, -86% y -89% ( $p < 0.0001$ ), respectivamente (Fig. 15D). Aunque esperábamos un aumento de la tasa Rankl/Opg por la presencia de PTHrP, se detectó una disminución, lo que podría ser debido a los efectos anabólicos o catabólicos de la PTHrP. Al menos, este resultados demuestra que las células con PTHrP (B16-PTHrP<sup>int</sup>, -PTHrP<sup>hi</sup> y -PTHrP<sup>vhi</sup>) tienen un efecto en la tasa Rankl/Opg comparado con las células B16-eGFP, lo que nos indica que si producen PTHrP.



**Figura 15. Efecto de la PTHrP producida por células cancerosas en la expresión de genes en células tipo osteoblastos. (A)** Expresión relativa de *Rankl* en relación a *RPL32* (B) Expresión relativa de *Opg* en relación a *RPL32*. (C) Expresión relativa de la tasa *Rankl/Opg* en relación a *RPL32* de las células MC3TE-E1 en co-cultivo. (D) Expresión relativa de la tasa *Rankl/Opg* en relación a *RPL32* de las células de médula ósea en co-cultivo. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$ EE. Se utilizó el análisis estadístico de ANOVA de una-vía con el posttest de Tukey.

## 8. DISCUSIÓN

Los cánceres de mama y de próstata son los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia y mortalidad (Ferlay *et al.* 2013), y >80% de los pacientes en etapas avanzadas desarrollará metástasis a huesos. La llegada de las células de cáncer al hueso desencadena un ciclo vicioso donde las células tumorales liberan factores que favorecen la activación de los osteoclastos, los cuales resorberán la matriz ósea y liberaran factores que favorecen la progresión del cáncer (Guise, 2002; Mundy, 2002). Aunque los osteocitos (>90% de las células del hueso) son los principales coordinadores de la remodelación ósea, su papel en la metástasis ósea ha sido poco estudiado. Entre los factores liberados por las células cancerosas en los huesos es la PTHrP. Esta proteína regula la actividad de los osteocitos, por lo que las células cancerosas podrían afectar los osteocitos y la remodelación ósea. Por lo anterior, la finalidad de este proyecto fue modificar células cancerosas B16-F1 para producir PTHrP y estudiar su efecto en los osteocitos.

Para la producción de PTHrP en de las células B16-F1, usamos el método de transducción con partículas lentivirales. Para detectar la producción de la PTHrP, principalmente se utilizan métodos que necesitan radiactividad, como el radioinmunoensayo. Por lo que se decidió en este estudio utilizar un vector bicistrónico (IRES), el cual nos permitiría tener expresión simultánea de dos proteínas a partir de un ARNm. De un lado del vector IRES se utilizó un gen de expresión fluorescente (DsRed2), que nos pudiera indicar indirectamente la presencia de las proteínas de interés, en este casos fueron PTHrP y eGFP. Por lo tanto, se generaron dos plásmidos: pLJM-PTHrP-IRES-DsRed2 y pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2. Para validar la

expresión de las proteínas de interés, se realizó una transfección en células 293T, que son altamente transfectables. Al momento de medir los niveles de expresión de las proteínas fluorescentes, eGFP y DsRed2, se detectó, en las células transfectadas con el plásmido control (pLJM-eGFP-IRES-DsRed2), la presencia de células DsRed2<sup>+</sup>. En las cuales se observa que todas son eGFP<sup>+</sup> y que además tienen alta expresión de eGFP. Sin embargo, también se detectó una población de células con niveles bajos de eGFP que son DsRed2<sup>-</sup>. Lo anterior se puede explicar debido a que se ha demostrado que el nivel de expresión del segundo gen dependiente de IRES, es menor que el primero, al ser transfectado el vector bicistrónico (Mizuguchi, *et al.* 2000). Además de que el nivel de brillantez de la DsRed2 es menor al de la eGFP (Day, *et al.* 2009), por lo tanto se necesitarían niveles más altos de DsRed2 para lograr detectar el mismo porcentaje que el de la eGFP. Los dos factores anteriores, nos indican que en la transfección, aunque detectemos niveles bajos de la DsRed2, nuestras células presentan mayor detección de nuestra proteína de interés.

Conociendo que el vector bicistrónico funciona, se realizó la transducción lentiviral, con la finalidad de obtener células B16-F1 con expresión constitutiva de nuestras proteínas de interés. En nuestros resultados se puede observar que los porcentajes del nivel de expresión de las proteínas fluorescentes son muy bajos o no detectables, especialmente el de la DsRed2, para todos los grupos de células transducidas. Sin embargo, al comparar con la transfección del sistema eGFP-IRES-DsRed2, se observa que el nivel de eGFP se detectó más bajo, con la transducción. Como ya se había mencionado, las células DsRed2<sup>+</sup> tienen alta expresión de eGFP, al disminuir el nivel de detección de eGFP, la DsRed2 disminuye de igual manera, en la transducción. Por otro lado, en la transducción con las construcciones, pLJM1-DsRed2, pLJM1-

eGFP, además del pLJM1-eGFP-IRES-DsRed2, demuestran detección de células DsRed2<sup>+</sup> o eGFP<sup>+</sup>, respectivamente. Indicando que el proceso de transducción lentiviral funcionó aunque el sistema bicistrónico no. Hipótesis que se confirmó al detectar que si hay expresión del ARNm de la PTHrP, por RT-qPCR, en los tres experimentos independientes de transducción con el sistema PTHrP-IRES-DsRed2, a pesar de no haber podido detectar la presencia de DsRed2 por citometría de flujo. Para asegurarnos de que la integración de la secuencias de interés en el genoma eran estables, se midió el nivel de expresión del ARNm de la PTHrP en las células B16-F1 transducidas, en cultivo con presencia o ausencia de puromicina. Al comparar los resultados observamos que no hay diferencias significativas en el nivel de expresión de la PTHrP entre las células. Lo que nos indica que la expresión de la PTHrP es estable en las células B16-F1, y que no pierden expresión durante los 15 días del ensayo, tiempo estimado para causar metástasis *in vivo*.

Como parte de la caracterización de las células transducidas, se evaluó la tasa de proliferación, comparando células B16-F1 sin transducir con B16-eGFP y B16-PTHrP #2 y #3. Los resultados demostraron que la expresión de la PTHrP no altera la proliferación de las células B16-PTHrP en comparación a las células parentales o con expresión de eGFP. Por lo tanto, consideramos que el procedimiento de transducción ni la expresión de PTHrP en las células B16-F1 afectan el crecimiento de las células. Estos resultados fueron los esperados, ya que de manera autócrina, la probabilidad de interferir en la proliferación es baja, debido a que el receptor de la PTHrP (PTH1R) no está presente en células de piel o melanoma, más bien PTH1R se localiza principalmente en células de riñón y hueso (Tian, *et al.* 1993). Al conocer que las células B16-F1 parental y las B16-PTHrP #2 y #3 proliferan similarmente, se decidió probar en un experimento piloto con ratones C57BL/6 la capacidad de causar metástasis. Se midió el peso de los ratones y

se detectó que se mantuvo estable en los ratones inoculados con células parentales, mientras que para los ratones inoculados con células B16-PTHrP #3 el peso se mantuvo durante una semana y después perdieron un 15% de su peso hasta 3 días antes de la eutanasia. Por otro lado, se detectó la presencia de metástasis en huesos y en algunos tejidos blandos como ovarios o glándula suprarrenal, en todos los ratones inoculados. Estos resultados son consistentes a lo reportado por Hibbert, *et al.* (2013), ya que es común que las células B16-F1 metastaticen a fémur y vísceras principalmente. Por lo tanto, el modelo de metástasis por inoculación intracardiaca de células B16-F1 con expresión de PTHrP funcionó, sin embargo, la expresión de la PTHrP produce cambios mayores en peso y metástasis a más sitios (ovarios y glándula suprarrenal), lo que la convierte probablemente en un tipo celular más agresivo que las células B16-F1 parentales.

Hasta el momento se pudo detectar la presencia del ARNm de la PTHrP de manera estable y que las células causan metástasis, sin embargo, fue necesario comprobar que se estaba produciendo la proteína, para la finalidad de este proyecto. Como se mencionó anteriormente, no hay anticuerpos disponibles para realizar los métodos convencionales como Western Blot o ELISA, y los únicos anticuerpos disponibles hasta el momento requieren de radiación, requisito que no se puede cumplir en las instalaciones del laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica (CICESE). Por lo anterior, se decidió evaluar por HPLC la secreción de la PTHrP en medios condicionados con las células B16-F1 transducidas. No se detectó la presencia de algún pico distintivo, al comparar los medios condicionados controles o con las células B16-PTHrP #2 o #3, en el cual se pudiera sugerir la presencia de la proteína de PTHrP. Estos resultados podrían deberse a que las concentraciones de PTHrP no fueron suficientes para detectar la proteína de

interés, ya que según lo reportado por Soifer *et coll.* (1992), se necesitó más de un litro. Debido a que no pudimos detectar la proteína de PTHrP por este método, decidimos probar el efecto de la secreción de esta proteína. Esperando que se causara un efecto catabólico, es decir, resorción ósea. Se evaluó mediante el cultivo de medios condicionados de células B16-eGFP, B16-PTHrP #2 y #3, con hemicalvarias de ratones C57BL/6. No pudimos detectar algún efecto en las hemicalvarias con medios condicionados. Creemos que no pudimos detectar la PTHrP en los medios condicionados, debido a que existen proteasas que pudieron inhibir a la proteína (Wu, *et al.* 1991). Por lo tanto, a pesar de que no pudimos detectar la proteína de la PTHrP por estos métodos, consideramos dos opciones: suplementar los medios condicionados con inhibidores de proteasas o cultivar las células transducidas con PTHrP en contacto directo con células de hueso y medir el efecto causado. Debido a que los inhibidores de proteasas podrían interferir en algunas funciones de las células o causar toxicidad, decidimos continuar con la segunda opción de co-cultivo.

Para asegurarnos de que las células B16-PTHrP presentes en el co-cultivo, eran PTHrP<sup>+</sup>, se hizo una selección de clones derivados a partir de una sola célula, y se evaluó el porcentaje de células PTHrP<sup>+</sup> presentes en las muestras heterogéneas de B16-PTHrP #2 y #3. Se midió el nivel de expresión del ARNm de la PTHrP en los clones. Obtuvimos niveles de expresión muy distintos entre los clones, sin embargo, más del 93% fueron PTHrP<sup>+</sup> en ambas poblaciones. Conociendo los niveles de expresión de PTHrP en las células, se clasificaron en baja (PTHrP<sup>lo</sup>), intermedia (PTHrP<sup>int</sup>), alta (PTHrP<sup>hi</sup>) y muy alta (PTHrP<sup>vhi</sup>). De esta manera, realizamos el siguiente ensayo funcional, co-cultivo de células con distintos niveles de expresión de PTHrP con células tipo osteoblastos (MC3T3-E1 y células de médula ósea), en el cual se midió la tasa de *Rankl/Opg*, para

conocer si la PTHrP causaba algún efecto en los genes que regulan la resorción ósea. Al medir los niveles de *Rankl* u *Opg* en las células sin co-cultivo (MC3T3-E1, médula ósea, B16-eGFP y B16-PTHrP), se detectó que solo en las células tipo osteoblastos, MC3T3-E1 y médula ósea, hay expresión de *Rankl* y *Opg*, aunque las células de médula ósea presentan niveles mayores de ARNm de ambos genes. Por lo anterior, determinamos que en los co-cultivos las células tipo osteoblastos son las que produjeron *Rankl* y *Opg*. En los co-cultivos con las células MC3T3-E1, observamos que hay una disminución de la tasa de *Rankl/Opg* con las células B16-PTHrP<sup>hi</sup> y -PTHrP<sup>vhi</sup>, mientras que al ser co-cultivadas con las B16-PTHrP<sup>int</sup> hay un aumento significativo. Por otro lado, al co-cultivar las células extraídas de médula ósea de ratón con las B16-PTHrP<sup>int</sup>, -PTHrP<sup>hi</sup> y -PTHrP<sup>vhi</sup>, se detectó una tasa de *Rankl/Opg* mucho menor que al control sin co-cultivar y al co-cultivo con B16-eGFP. Por lo que podemos concluir que las células con PTHrP tienen un efecto en la tasa *Rankl/Opg*, al comparar con los controles, lo que nos indica que si se está produciendo la proteína de PTHrP. Aunque en un principio esperábamos un aumento en la tasa *Rankl/Opg*, correspondiente a un efecto catábólico, sabemos que la PTHrP tiene la dualidad de actuar de manera anabólica o catabólica, según el tiempo de exposición de la proteína. Es decir, que la PTHrP en tratamiento corto produce efectos de formación ósea, anabólicos. Mientras que de forma continua el tratamiento produce resorción ósea, efecto catábólico (Frolik, *et al.* 2003; Horwits, *et al.* 2003; Ma, *et al.* 2001; Greenfield, 2012). Ya que nuestro co-cultivo se llevó a cabo durante de 24 horas, podemos inferir que los resultados obtenidos, se deben principalmente a la acción anabólica de la proteína de la PTHrP. Por lo tanto, si buscamos un efecto de destrucción de hueso, podríamos aumentar el tiempo del tratamiento y observar si hay un aumento en la tasa de *Rankl/Opg*.

Al finalizar los experimentos destinados a este proyecto, se continuó con la inoculación intracardiaca de las células B16-PTHrP en ratones C57BL/6 para probar su efecto en los huesos. La duración del tratamiento fue de 15 días. Al obtener las radiografías de los huesos, se observó osteólisis en las patas de los ratones (Drescher & Fournier, comentario personal) (Anexo 3). Lo que nos indica que la expresión de la PTHrP en las células de melanoma B16-F1, funciona de acuerdo a lo que esperamos.

## 9. CONCLUSIONES

Logramos generar células de melanoma (B16-F1) que expresan establemente el ARNm de PTHrP o eGFP (proteína control). La expresión de la PTHrP en las células B16-F1 no tuvo efecto en la proliferación celular pero si se pudo detectar la presencia de metástasis con la inoculación de las células generadas en ratones C57BL/6.

Aunque no pudimos detectar la secreción de la proteína por HPLC ni por función biológica en hemicalvarias de ratón. El contacto directo de los clones de B16-PTHrP con expresión intermedia, alta o muy alta con células de tipo osteoblasto genera una disminución en la tasa *Rankl/Opg*, debida al efecto anabólico de la PTHrP, por exposición en un tiempo corto. Sin embargo, al inocular los mismos tipos de células en ratones C57BL/6, se produce destrucción ósea. Lo que nos comprueba que si hay expresión de la proteína de la PTHrP y que en periodo continuo y prolongado produce efectos catabólicos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Bellido, T., 2014. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int.*, 94(1), 25–34.
- Bonewald, L. F. 2011. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238.
- Bozal, C. 2013. Los osteocitos como mecanosensores del hueso. *Actual. Osteol.*, 9(2), 176–193.
- Brandt, D. W., Wachsman, W., y Deftos, L. J. 1994. Parathyroid Hormone-like Protein: Alternative Messenger RNA Splicing Pathways. *Cancer Research*, 54, 850–853.
- Day, R. y Davidson, M. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.*, 38(10), 2887–2921.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. y Bray, F. 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and mayor patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359–E386.
- Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M., y Guise, T. A. 2006. New insights into the role of T cells in the vicious cycle of bone metastases. *Curr Opin Rheumatol*, 18, 396–404.
- Frolik, C., Black, E., Cain, R., Satterwhite, J., Brown-Augsburger, P., Sato, M. y Hock, J. 2003. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone*. 33 (3), 372-379.
- Gensure, R. C., Gardella, T. J., y Ju, H. 2005. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *BBRC*, 328, 666–678.

Greenfield, E. 2012. Anabolic Effects of Intermittent PTH on Osteoblasts. *Current Molecular Pharmacology*, 5(2), 127–134.

Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F. y Mundy, G. R. 1996. Evidence for a Causal Role of Parathyroid Hormone – related Protein in the Pathogenesis of Human Breast Cancer – mediated Osteolysis. *J. Clin. Invest.* 2(8), 1544-1549.

Guise, T. A. 2002. The vicious cycle of bone metastases. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2(6), 570-572.

Hanahan, D y Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell press*, 100 (1), 57-70.

Hibberd, C., Cossigny, D. & Quan, G. 2013. Animal cancer models of skeletal metastasis. *Cancer Growth and Metastasis*, 6, 23–34.

Horwitz, M., Tedesco, M., Gundberg, C., Garcia-ocana, A., y Stewart, A. F. 2003. Protein as a Skeletal Anabolic Agent for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 88(2), 569–575.

Kingsley, L., Fournier, P., Chirgwin, J. y Guise, T. 2007. Molecular Biology of Bone Metastasis. *Mol Cancer Ther*, 6 (10), 2609–2618.

Ma, Y., Cain, R., Halladay, D., Yang, X., Zeng, Q., Miles, R., Chandrasekhar, S., Martin, T. y Onyia, J. 2001. Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1-38) *in Vivo* Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. *Endocrinology*, 142(9), 4047–4054.

Manolagas, S. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21(2), 115–137.

Martin, T. J. 2005. Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. *J. Clin. Invest*, 115, 2322–2324.

Miao, D., Li, J., Xue, Y., Su, H., Karaplis, A. C., Goltzman, D., y Davis, Lady. 2004. Parathyroid Hormone-Related Peptide Is Required for Increased Trabecular Bone Volume in Parathyroid Hormone-Null Mice. *Endocrinology*, 145(8), 3554–3562.

Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., y Hayakawa, T. 2000. IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-Dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector. *Molecular Therapy*, 1(4), 376–382.

Mundy, G. R. 2002. Metastasis to Bone: Causes, Consequences and Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2, 584–593.

Mundy, G. R., y Edwards, J. R. 2008. PTH-Related Peptide (PTHrP) in Hypercalcemia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19, 672–675.

National Institute of Health [NIH], 2015. What Is Cancer? Recuperado el 02 de mayo del 2017 de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#types-of-cancer>

National Institute of Health [NIH], 2017. Metastatic Cancer. Recuperado el 02 de mayo del 2017 de: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>

O'Brien, C., Plotkin, L., Galli, C., Goellner, J., Gortazar, A., Allen, M., Robling, A., Bouxsein, M., Schipani, E., Turner, C., Jilka, R., Weinstein, R., Manolagas, S. y Bellido, T. 2008. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS ONE*, 3(8):e2942.

Philbrick, W., Wysolmerski, J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J., Yang, K., Vasavada, R., Weir, E., Broadus, A. y Stewart, A. 1996. Defining the roles of PTHrP in normal physiology. *Physiol. Rev.* 76:127–173.

Qing, H., Ardeshirpour, L., Pajevic, P., Dusevich, V., Ja, K., Kato, S., Wysolmerski, J. y Bonewald, L. 2012. Demonstration of Osteocytic Perilacunar/Canalicular. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(5), 1018–1029.

Sancak, Y., Petereson, T., Shaul, Y., Lindquist, R., Thoreen, C., Bar-Peled, L. y Sabatini, D. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320 (5882), 1496-1501.

Seyfried, T. y Huysentruyt, L. On the Origin of Cancer Metastasis. 2013. *Crit Rev Oncog*, 18(1-2): 43-73.

Soifer, N., Dee, K., Insogna, K., Burtis, W., Matovcik, L., Wu, T., Milstone, L., Broadus, A., Philbrick, W. y Stewart, A. 1992. Parathyroid Hormone-related Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 18236–18243.

Taube, T., Elomaa, I., Blomqvist, C., Beneton, M. y Kanis, J. Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. 1994. *Bone*, 15(2), 161–166.

Thomas, R., Guise, T., Yin, J., Elliott, J., Horwood, N., Martin, T. y Gillespie, M. 1999. Breast Cancer Cells Interact with Osteoblasts to Support Osteoclast Formation. *Endocrinology*, 140(10), 4451–4458.

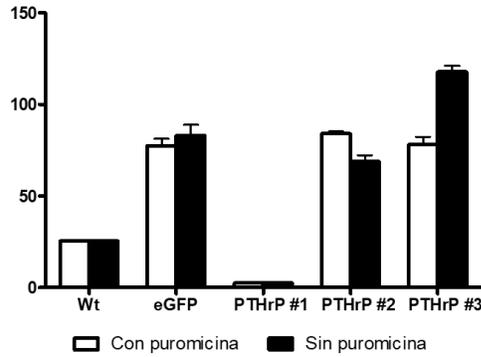
Tian, J., Smogorzewski, M., Kedes, L., & Massry, S. 1993. Parathyroid hormone-related protein receptor messenger RNA is present in many tissues besides the kidney. *American Journal of Nephrology*, 13(3), 210–213.

Wu, T., Soifer, N., Burtis, W., Milstone, L. y Stewart, A. 1991. Glycosylation of Parathyroid Hormone-Related Peptide Secreted by Human Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 73(5), 1002–1007.

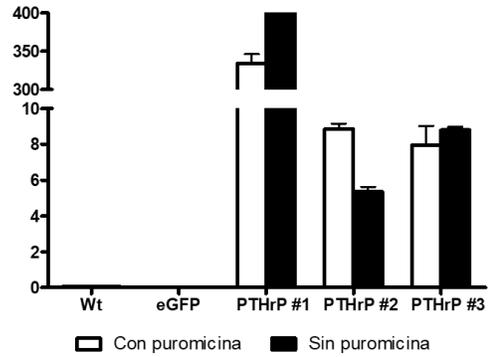
## 11. ANEXOS

A

*Rpl32* mRNA (*Rpl32* no normalizada)

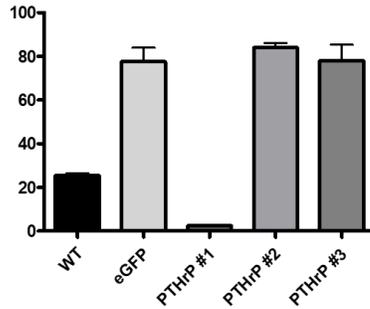


*Pthrp* mRNA (*Pthrp* no normalizada)

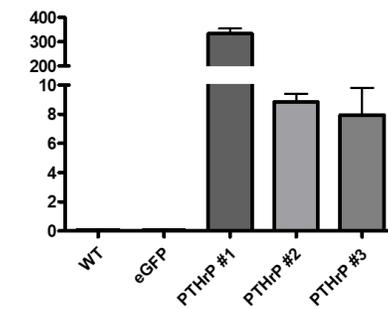


B

*Rpl32* mRNA (células con puromicina)



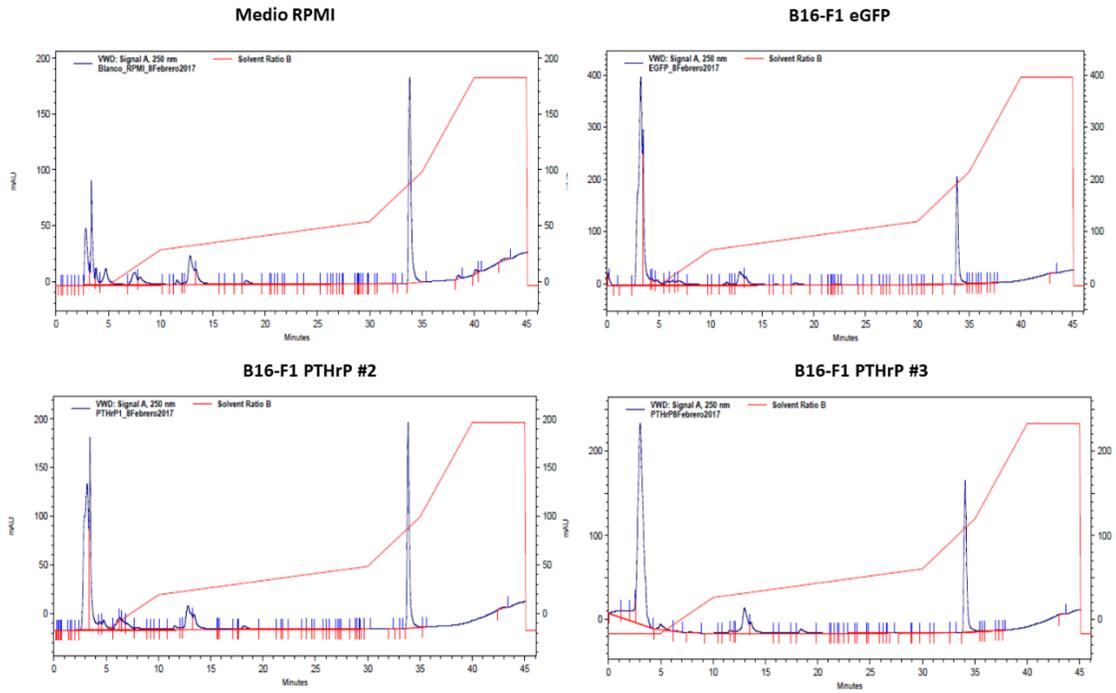
*Pthrp* mRNA (células con puromicina)



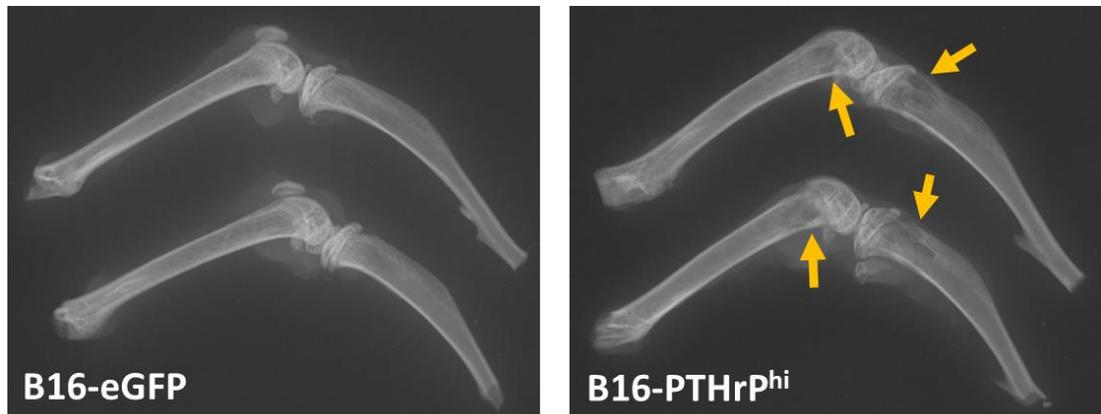
### Anexo 1. Ensayo de estabilidad de expresión de PTHrP en células B16-F1 transducidas. (A)

Expresión del gen housekeeping *Rpl32* y de *PTHrP* sin normalizar en células B16-F1 (WT), B16-eGFP, B16-PTHrP #1, #2 o #3, cultivadas en presencia o ausencia de puromicina por 15 días. (B)

Expresión de *Rpl32* o *PTHrP* en las células control o con expresión de PTHrP cultivadas con puromicina. Promedios  $\pm$ DS.



**Anexo 2. Cromatogramas de HPLC de medio base y condicionados con células B16-F1 transducidas.** Resultados representativos de los cromatogramas de HPLC del medio base (RPMI), y de los medios condicionados con B16-eGFP, B16-PTHrP #2 o #3 sin liofilizar.



**Anexo 3. Análisis radiográfico de huesos de ratón C57BL/6 inoculados con células B16-eGFP (izquierda) o B16-PTHrP<sup>hi</sup> (derecha).** Radiografías representativas de las extremidades posteriores de ratones inoculados con células B16-eGFP (control) o B16-PTHrP<sup>hi</sup>. Las flechas indican zonas con osteólisis.