



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII
CIENCIAS MÉDICAS

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÍMICO.

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ERÉNDIRA GEORGINA ESTRADA VILLASEÑOR

TUTOR: Dr. Carlos Landa Solís
Instituto Nacional de Rehabilitación LGII

Comité Tutorial:
Dr. Abelardo Meneses García.
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Anell Olivos Meza.
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Cd. Mx mayo 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TUTOR



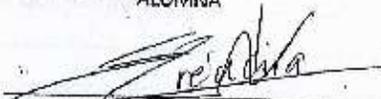
Va. Bo. DR. CARLOS LANDA SOLÍS

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS UNAM



Va. Bo. DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO

ALUMNA



ERENDIRA GEORGINA ESTRADA VILLASEÑOR

AGRADECIMIENTOS:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA

- Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa
- Servicio de Tumores Óseos
- Laboratorio de Microscopía Electrónica
- Servicio de Anatomía Patológica
- Laboratorio de Genética

SINODALES EXAMEN CANDIDATURA

- **Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis.**
Facultad de Odontología UNAM
- **Dra. Anell Olivos Meza.**
Instituto Nacional de Rehabilitación LGII
- **Dr Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma**
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

MIEMBROS DEL JURADO EXAMEN DE GRADO

- **Dra. María Cristina Piña Barba**
Instituto de Investigación en Materiales. UNAM
- **Dr. Rogelio Hernández Pando**
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán
Laboratorio de Patología Experimental
- **Dr Carlos Landa Solís**
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra
- **Dra. Margarita Valdés Flores**
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra
- **Dr. Hugo Ricardo Domínguez Malagón**
Instituto Nacional de Cancerología. Servicio de Anatomía Patológica

INDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES DE HUESO (TCG)	2
DEFINICIÓN.....	2
HISTORIA	2
EPIDEMIOLOGIA	4
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	5
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.....	6
Gradificación histológica del TCG.....	7
COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO.....	7
TRATAMIENTO del TCG	8
FLAVONOIDES Y QUERCETINA	8
FLAVONOIDES.....	8
Estructura y clasificación de los flavonoides.....	9
ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA QUERCETINA	10
Fuentes dietéticas de la Quercetina.....	10
Usos terapéuticos de la quercetina.....	11
Efecto antineoplásico de la quercetina.....	11
EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA QUERCETINA.....	14
MECANISMOS DE MUERTE CELULAR: NECROSIS , NECROPTOSIS Y APOPTOSIS	15
NECROSIS:.....	15
EFECTO NECRÓTICO DE LA QUERCETINA.....	16
NECROPTOSIS.....	16
APOPTOSIS	17
Vía intrínseca de la apoptosis:.....	18
Vía extrínseca de la apoptosis:.....	19
Quercetina y apoptosis	19
MODELOS TRIDIMENSIONALES PARA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER Y PRUEBAS FARMACOLÓGICAS	20
EMPLEO DE ANDAMIOS 3D PARA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22

JUSTIFICACIÓN	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
HIPÓTESIS	24
HIPÓTESIS NULA:.....	24
HIPÓTESIS ALTERNA:	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS	25
1.- Tipo de estudio.....	25
2.- Descripción del universo de trabajo	26
3.-Definición del grupo control	26
4.- Criterios de inclusión.....	26
A) Para la obtención de tejido tumoral	26
B) Para cultivos 2D de células y constructos	26
C) Para el estudio de los constructos implantados en los ratones	26
5.- Criterios de eliminación	26
A) Para la obtención de tejido tumoral	26
B) Para los cultivos 2D de células y constructos.....	26
C) Para los ratones.....	26
6.-Criterios de exclusión.....	26
7.- Tamaño de muestra	27
8.- Descripción de las variables de estudio	27
VARIABLE INDEPENDIENTE.....	27
VARIABLES DEPENDIENTES:	28
9.- Análisis estadístico propuesto	28
10.- Registro de datos	28
11.- Unidades de observación.....	28
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	28
Etapa 1.....	28
Etapa 2.....	29
Etapa 3.....	30
Etapa 4.....	30
DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS	31
ETAPA 1	31

1.1 Obtener tejido en fresco de pacientes con diagnóstico previo de tumor de células gigantes de hueso	31
1.2 Cultivo primario de tumor de células gigantes:	32
1.3 Determinación de la dosis letal 50 (DL50) de la quercetina mediante el método MTT	35
1.4 Determinación de viabilidad celular en cultivos 2D expuestos 24 hrs a la DL50 de la Quercetina.....	37
ETAPA 2	37
2.1 Exposición de cultivos de células de TCG a 120µM de Quercetina por 24 hrs y su valoración por PCR y Microscopía Electrónica de Transmisión	37
2.2 Exposición de cultivos de células de TCG a 240µM de Quercetina por 24 hrs y determinación de PCNA, RIP1K , Caspasa 3 y Caspasa 8 por RT-PCR	38
2.3 Exposición de cultivos de células de TCG a 120µM de Quercetina a diferentes tiempos: 0 hrs, 4 hrs, 8hrs, 12 hrs y 24 hrs. Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión....	39
ETAPA 3	40
3.1 Elaboración de constructos, realización de pruebas de viabilidad y adherencia a los 7 y 14 días en ellos, así como también cortes histológicos.	40
3.2 Exposición por 24 hrs a quercetina (120µM y 240µM) y denosumab de constructos y determinación por RT-PCR de PCNA, RIP1K , Caspasa 3 y Caspasa 8.	40
ETAPA 4	41
4.1 Implante del constructo en modelo animal (ratones atímicos) y administración de tratamiento	41
4.2 Administración del tratamiento	43
4.3 RT-PCR	43
RESULTADOS	43
Etapa 1.....	43
Etapa 2.....	46
Etapa 3.....	52
Etapa 4.....	55
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	79
TRABAJO A FUTURO:	79
REFERENCIAS	81
Anexo 1	89
Anexo 2	90
Anexo 3	91
Anexo 4	92

Anexo 5. Artículo 1.....	95
Anexo 6. Artículo 2	108
Anexo 7. Artículo 3	113

RESUMEN

El Tumor de Células Gigantes de hueso (TCG) es un tumor primario de hueso que afecta a adultos en edad productiva y causa discapacidad al afectar la movilización de la extremidad afectada. Por el tipo de población que es atendida es el tumor más frecuente en el Instituto Nacional de Rehabilitación. El tratamiento del TCGC es principalmente quirúrgico, con limitaciones en caso de localizaciones inaccesibles y con algunas desventajas. Para los TCG inoperables existen pocas alternativas complementarias y farmacológicas para su tratamiento: denosumab y bifosfonatos, ambos con riesgo de efectos secundarios. Encontrar otras moléculas o compuestos que puedan ser potenciales agentes coadyuvantes para el tratamiento de este tumor es deseable con el fin de contar con otras alternativas terapéuticas que sean efectivas y que de igual forma ofrezcan menos efectos colaterales. La quercetina podría ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento coadyuvante del TCG ya que dentro de sus propiedades anticancerígenas descritas de la quercetina se encuentran sus efectos antiproliferativos y proapoptóticos.

El OBJETIVO GENERAL de este trabajo fue evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la Quercetina en un modelo tridimensional de TCG implantado en ratones atímicos. METODOLOGÍA: Se realizó un estudio experimental y comparativo.. Se realizó cultivo primario de cada tumor y se obtuvo la dosis letal 50 de la quercetina. Posteriormente se utilizaron modelos 2D y 3D in vitro para determinar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina en estos. El modelo 3D consistió en un andamio de policaprolactona de 5 mms de eje mayor, en el cual se sembraron células de TCG (constructo). Finalmente se utilizó un modelo animal, en el que se implantó el constructo en ratones atímicos. Para determinar el efecto antiproliferativo de la quercetina se determinó la expresión por PCR en tiempo real de PCNA, el efecto necrótico se determinó con la expresión de RIP1K y el efecto apoptótico se determinó la expresión de Caspasa 3 y Caspasa 8. Se compararon los resultados obtenidos en los diferentes modelos empleados: 2D, 3D in vitro y 3D in vivo. Se realizaron estudios con microscopía de luz de los constructos y se evaluó la ultraestructura de las células expuestas a quercetina con microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS: 1) La quercetina tiene un efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico en las células derivadas de TCG. La magnitud observada de estos 3 efectos varía de acuerdo al modelo empleado para su estudio. En el modelo 2D predominó el efecto necrótico, observándose mayor expresión de RIP1K. Este efecto fue corroborado por medio de microscopía electrónica de transmisión al predominar en las células observadas datos de necroptosis sobre los de apoptosis. En el modelo 3D in vitro no se encontró efecto necrótico y únicamente se observó efecto antiproliferativo y apoptótico. El modelo animal utilizando ratones atímicos fue el que mostró las expresiones más bajas de Caspasa 3 y 8, así como también las más altas de PCNA

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÍMICO.

MARCO TEÓRICO

TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES DE HUESO (TCG)

DEFINICIÓN

El Tumor de Células Gigantes es un tumor primario de hueso, benigno aunque de comportamiento agresivo que se caracteriza radiológicamente por ser una lesión epifisio-metafisaria excéntrica, bien delimitada y sin reacción perióstica (1).

HISTORIA

Desde su descripción inicial por Sir Asley Cooper en 1818 (2) el TCG ha sido una entidad generadora de controversia considerando su origen, comportamiento biológico, tratamiento, nombre e incluso, su frecuencia.

En 1854 Paget fue el primero en realizar una descripción macroscópica y microscópica detallada de estos tumores, mostrando las primeras ilustraciones de las poblaciones celulares observadas al microscopio en este tumor. Dado que el aspecto denso y rojo suave de estos tumores era como la médula normal, los llamó tumores "mieloides" (Fig. 1).

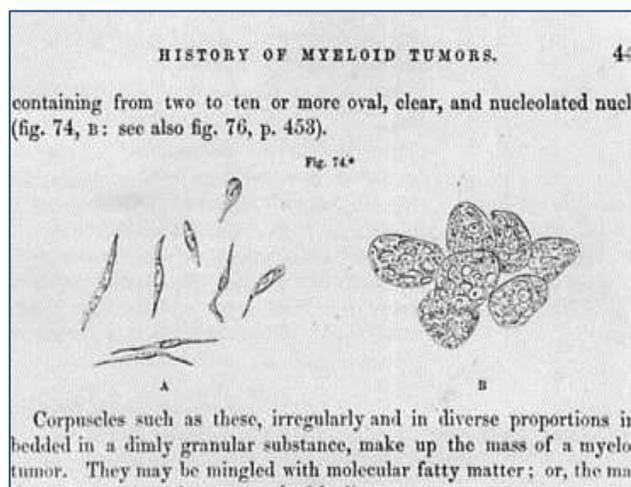


Fig. 1 Primer dibujo de las células que componen al Tumor de Células Gigantes de hueso. de las *Lectures on Surgical Pathology*, 1854, de Paget. (Instituto Johns Hopkins de Historia de la Medicina).

La controversia con respecto a la naturaleza del TCG ha existido desde esos tiempos, ya que mientras algunos investigadores como Nelaton (Fig. 2) consideraban que este tumor era benigno, otros investigadores influenciados por Virchow consideraban que este tumor al igual que todas las lesiones que contenían células gigantes eran sarcomas. Para Virchow los sarcomas eran tumores compuestos de forma imperfecta por mesénquima. Y para el caso de los TCG, Virchow consideraba que los tumores de células gigantes eran malignos, tenían un mal pronóstico y pertenecían al grupo de



Fig. 2 Dibujo de la Monografía de Nelaton *Tumeurs á Myeloplaxes*, Paris, 1860, que muestra el aspect macroscópico de un tumor de células gigantes de hueso, localizado en fémur distal.(National Library of Medicine)

"Riesenzellensarkome" (sarcomas de células gigantes), que era una de sus clasificaciones microscópicas para los sarcomas.

Posteriormente en 1919 el histopatólogo norteamericano James Stephen Ewing (1866-1943), hizo referencia en su publicación *Neoplastic Diseases*, sobre las variaciones histológicas que presentan los tumores de células gigantes, así como también sobre el espectro en el comportamiento clínico de estas lesiones.

En 1940 Jaffe junto con Lichtenstein y Portis separan del TCG a otras lesiones que también contienen células gigantes y establecieron nuevas entidades, como el tumor pardo de hiperparatiroidismo, el granuloma reparativo de células gigantes, el condroblastoma, el fibroma no osificante y el osteoblastoma.

Jaffe reconoció que no era simplemente la presencia de abundantes células gigantes, sino el patrón histológico de toda la lesión lo que definía el tumor. Para llamar a una

lesión un tumor de células gigantes, debería tener el entorno clínico adecuado, la apariencia radiológica y el patrón histológico. Jaffe estableció el concepto de que el tumor de células gigantes debe definirse como una entidad clínica-radiológica-patológica (3).

Posteriormente se publicaron grandes series de casos de TCG. Es gracias a estas grandes series, como las de Goldenberg y Dahlin, que sabemos ahora que los TCGs pueden recurrir y dar metástasis pulmonares, aunque no presenten un aspecto histológico franco de malignidad (4,5).

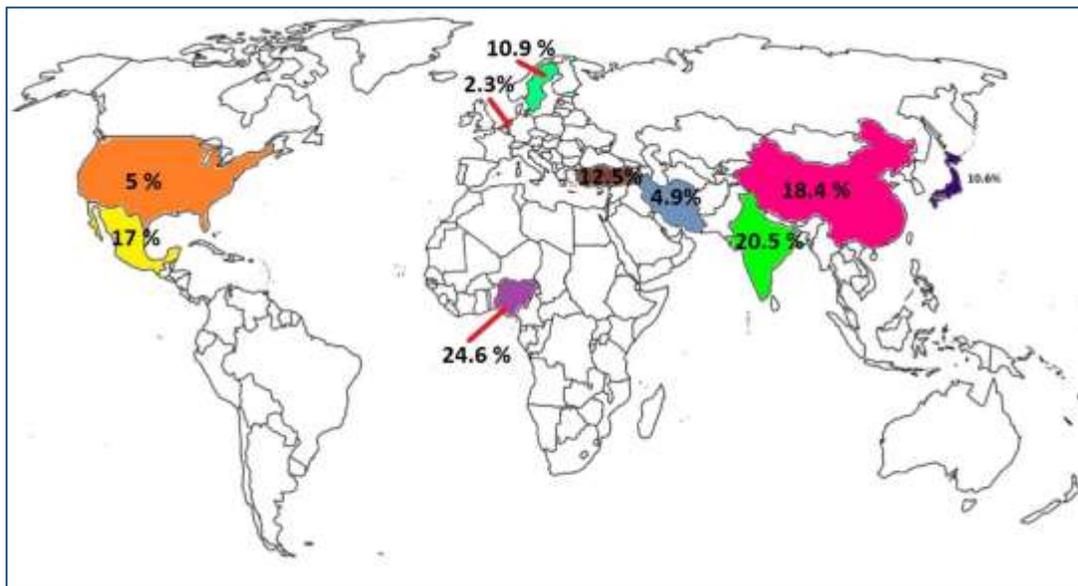


Fig 3 Frecuencia del Tumor de células Gigantes de Hueso en diferentes países. Tomado de Estrada-Villaseñor et al., Prevalencia y características clínico-patológicas del tumor de células gigantes. Acta ortopedica mexicana. 2015;29(6):295-298.

EPIDEMIOLOGIA

La frecuencia del tumor de células gigantes reportada en la literatura es muy variable. Las series de países anglosajones se refieren al tumor de células gigantes de hueso como un tumor «poco frecuente», con una frecuencia de 5% dentro del grupo de los tumores óseos (5). Por otro lado, existen otras series de países asiáticos como la India en las que el TCG presenta una frecuencia del 20% dentro del grupo de tumores óseos (6).

En México, en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en el grupo de tumores óseos el TCG tiene una proporción del 17% (7) (Fig. 3)

Diversos factores podrían intervenir en la diferente frecuencia observada, entre los cuales, por mencionar sólo algunos, están: los diferentes sistemas de registro para las neoplasias que tiene cada país, las diferentes fuentes de datos a partir de las cuales se realizaron las publicaciones, la diferente proporción de adultos jóvenes y maduros que hay entre estos países (8,9,10,11,12, 13,14) etc.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El TCG afecta a personas esqueléticamente maduras, presentándose con mayor frecuencia en la tercera década de la vida. 80% de los casos ocurren entre los 20 y 50 años, es decir en población económicamente activa. Los casos de TCG que se presentan antes de los 14 años sólo ocupan el 3% y los casos que se presentan en pacientes mayores de los 50 años

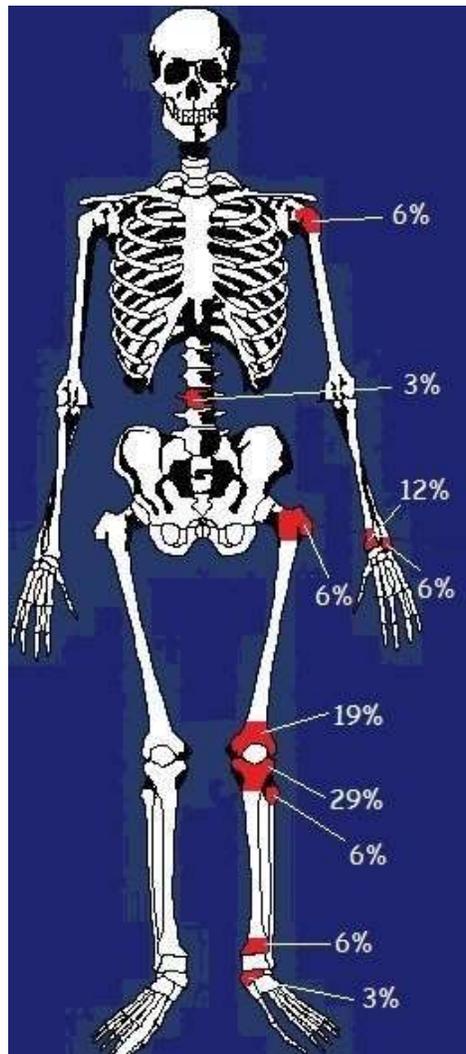


Fig 4 Localizaciones más frecuentes del TCG. Tomado de Estrada-Villaseñor et al., Prevalencia y características clínico-patológicas del tumor de células gigantes. Acta ortopedica mexicana. 2015;29(6):295-298.

sólo ocupan el 13% de los tumores de células gigantes.

El síntoma predominante del TCG suele ser el dolor, de intensidad variable, seguido de aumento de volumen y pérdida de la función de la extremidad afectada. En algunas ocasiones se puede encontrar asociado a fracturas (15).

Gran parte de las lesiones se encuentran en la epífisis de los huesos largos (75-90%), con la mayoría de los casos (50-65%) localizados alrededor de la rodilla. Las localizaciones más

frecuentes son fémur distal, tibia proximal y radio distal^{9,10}. El TCG también puede afectar huesos planos como pelvis, sacro, columna y costillas. Los huesos de las manos y pies pueden verse afectados, aunque con mucha menor frecuencia (Fig 4).

De acuerdo con algunas series, afecta con mayor frecuencia a mujeres, con una relación mujer-hombre que varía de 1: 1.1 a 1: 1.5 (7).

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

El TCG se encuentra compuesto por tres tipos de células: 1) células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto, 2) células estromales mononucleadas y 3) células semejantes a monocitos. Se pueden encontrar también otros componentes como los macrófagos espumosos y depósito de hemosiderina (Fig 5). Las células gigantes multinucleadas, de igual manera que los osteoclastos, son capaces de llevar a cabo la reabsorción ósea y osteólisis. Las células estromales secretan citocinas y factores de diferenciación, incluyendo la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), el factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

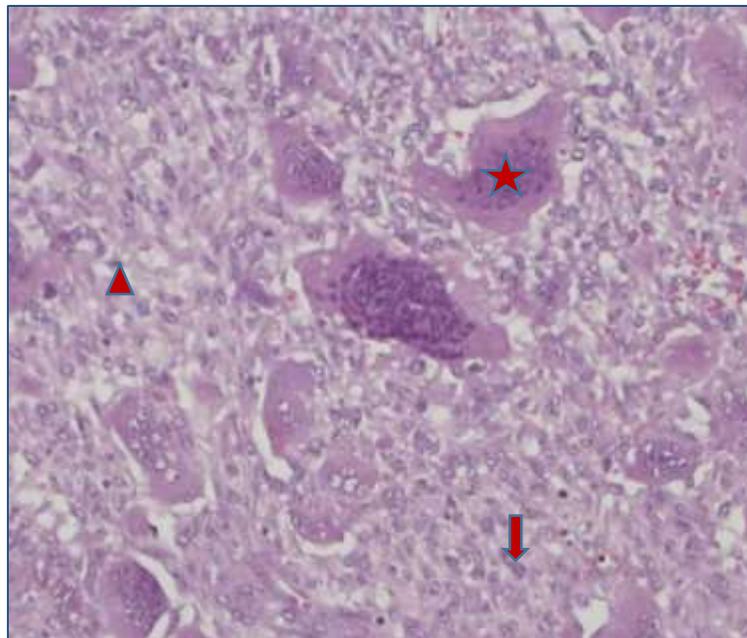


Fig 5 Fotomicrografía que muestra los componentes histológicos de un Tumor de Células Gigantes de Hueso. ★ célula gigante multinucleada, ↓ célula estromal ▲ monocito

Estas moléculas por quimiotaxis atraen a los monocitos, además de ser indispensables para la diferenciación de los osteoclastos (15). Con los datos que se cuenta hasta el momento en la literatura, se sugiere que las células estromales estimulan la migración de los monocitos de la sangre hacia el tejido tumoral promoviendo su fusión para formar células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto. Las células estromales son consideradas el componente neoplásico y las células gigantes multinucleadas junto con los monocitos, son consideradas el componente reactivo (16).

El TCG se puede encontrar asociado a quiste óseo aneurismático (QOA), enfermedad de Paget y puede ser componente de otros tumores como el condrosarcoma desdiferenciado. Cuando el TCG se asocia a QOA (15-35% de los casos de TCG) sus características clínicas y de imagen difieren a las del TCG convencional. De igual forma, cuando el TCG se asocia a enfermedad de Paget, presenta localizaciones poco frecuentes como huesos faciales, pelvis, columna y cráneo (17,18,19,20).

Gradificación histológica del TCG.

Basándose en el aspecto histológico de las células estromales, la cantidad de células gigantes multinucleadas y las mitosis, Jaffe propuso una gradificación histológica en los TCG.

De acuerdo a esta clasificación los TCG grado 1 consisten en células estromales cuyos núcleos no presentan atipias y son semejantes a los núcleos de las células gigantes multinucleadas. En estos tumores las células gigantes multinucleadas son abundantes. Los TCG grado 2 son aquellos en los cuales las células estromales presentan abundantes figuras de mitosis sin presentar atipias nucleares. En estos tumores las células gigantes multinucleadas se presentan en menor cantidad en comparación con los TCG grado 1. Los TCG grado 3 son aquellos en los cuales las células gigantes multinucleadas se encuentran alternando con células que presentan características francas de sarcoma, es decir atipia nuclear, así como también abundantes figuras de mitosis.

Jaffe relacionó el grado histológico de los TCG con su comportamiento clínico, de tal manera que los TCG grado 1 consistían en lesiones benignas, limitadas al hueso, no recidivantes. Los TCG grado 2 consistían en lesiones benignas agresivas, con extensión a tejidos blandos y alta probabilidad de recurrencia. Los TCG grado 3 consistían en tumores malignos, con comportamiento clínico de sarcoma (21).

Sin embargo, trabajos que surgieron posteriormente informaron que el aspecto histológico de los TCGs no muestra relación alguna con su agresividad local, así como tampoco con su capacidad metastásica o de degeneración maligna (22,23).

Debido a que al parecer el aspecto histológico de los TCG no muestra relación con su comportamiento biológico, estos tumores se han estudiado también desde el punto de vista molecular, para determinar si es posible identificar proteínas indicadoras de pronóstico y así poder brindar mejores opciones terapéuticas (24).

COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO

El TCG es considerado como una neoplasia benigna de agresividad “variable” por algunos, y por otros como una neoplasia de bajo potencial maligno debido a que, aunque puede tener una localización exclusivamente intramedular, también puede extenderse y afectar a los tejidos blandos adyacentes. El TCG puede presentar recurrencias hasta en un 50% de los casos (25), puede presentarse acompañado de implantes pulmonares en un 5-10% de los casos (26,27) y también puede presentar transformación maligna en un 1-3% de los casos

dando lugar a un tumor de células gigantes maligno con componentes histológicos de histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma u osteosarcoma. La transformación maligna de los TCGs en general es secundaria a radioterapia (1% de los casos con radioterapia) o como resultado de la desdiferenciación de un TCG primario con una o múltiples recurrencias (28). En el caso de los implantes pulmonares estos pueden ser únicos o múltiples y aunque histológicamente no presentan características de malignidad, algunos estudios han encontrado mayor expresión de p53 en comparación con el tumor óseo primario (29).

Con respecto al riesgo de recurrencia, se conoce que éste se encuentra asociado al grado Campanacci que presenten este tipo de tumores (30,31), así como también al tipo de tratamiento utilizado (32). Ahora se sabe que a mayor número de recurrencias, mayor riesgo de presentar implantes pulmonares y mayor riesgo de degeneración maligna. Por lo tanto, aunque también hay otros factores a considerar, en cierta medida el pronóstico de este tipo de tumores está relacionado con el tratamiento que se proporcione inicialmente a los pacientes. De ahí la importancia del tratamiento del TCG.

TRATAMIENTO del TCG

Para considerar el tipo de tratamiento que se utilizará en el TCG, previamente hay que tomar en consideración la región anatómica afectada, el acceso quirúrgico que se tenga a esta región, el estadio de la lesión y la posibilidad de reconstrucción funcional, la presencia de fractura y la extensión a tejidos blandos, entre otros factores.

Cada uno de los tratamientos disponibles presenta beneficios e inconvenientes. **Anexo 5**

FLAVONOIDES Y QUERCETINA

FLAVONOIDES

La palabra flavonoide deriva del latín *flavus* que significa amarillo (el color más común de los flavonoides) En la naturaleza, los flavonoides son pigmentos vegetales no nitrogenados que se encuentran en varias partes de las plantas. Los flavonoides constituyen un grupo heterogéneo de compuestos, que tienen múltiples funciones en las plantas. Pertenecen a una clase de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Constituyen una de las clases de compuestos más características de las plantas. Muchos flavonoides son pigmentos florales. Sin embargo, su presencia no se limita a las flores sino que se encuentran en todas las partes de las plantas: hojas, tallos, etc. (33). Los flavonoides desempeñan una variedad de actividades biológicas en plantas, animales y bacterias. En las plantas, se sabe que los flavonoides se sintetizan en sitios particulares, siendo responsables del color y aroma de las flores, para atraer a los polinizadores y, en consecuencia, para ayudar a la germinación de semillas y esporas (34). Los flavonoides protegen a las plantas de diferentes estreses bióticos y abióticos y, en algunos casos proporcionan a las plantas un sabor desagradable, con lo cual son rechazadas para su consumo por animales herbívoros. También actúan como filtros, protegiendo a las

plantas de los nocivos efectos de la radiación ultravioleta(35). Funcionan como moléculas de señal, agentes desintoxicantes y compuestos defensivos antimicrobianos. Los flavonoides tienen funciones contra la resistencia a las heladas, la resistencia a la sequía y pueden desempeñar un papel funcional en la aclimatación al calor de las plantas y la tolerancia a la congelación (36).

Estructura y clasificación de los flavonoides

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Los flavonoides se pueden subdividir en diferentes subgrupos según el carbono del anillo C al que está unido el anillo B y el grado de saturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides en los que el anillo B está enlazado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 4 del pirano se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas y chalconas (**Fig. 6**).

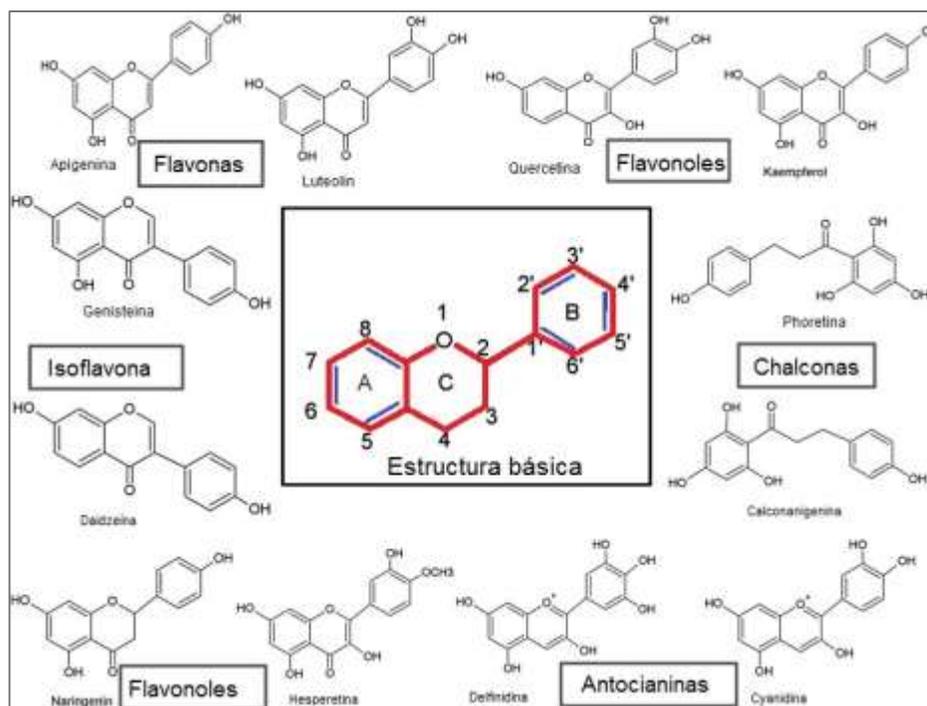


Fig 6 Estructura química de los flavonoides. Tomado y modificado de Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids :an overview. J Nutr Sci. 2016 Dec 29; 5 e47

Los flavonoides presentan una amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a múltiples polímeros biológicos tales como enzimas, transportadores de hormonas y DNA, pueden quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , así como también catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Cada subgrupo de flavonoides tiene fuentes principales únicas. Por ejemplo, las cebollas y el té son las principales fuentes dietéticas de los flavonoles y flavonas (37,38).

Aquellos flavonoides que se encuentran abundantemente en alimentos y bebidas de origen vegetal, como frutas, verduras, té, cacao y vino se denominan flavonoides dietéticos.

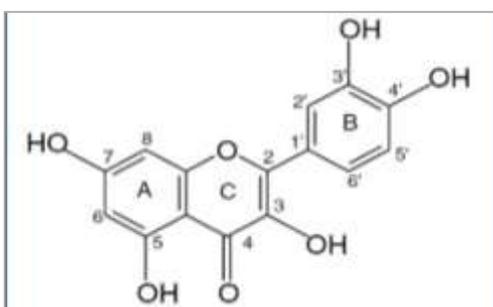


Fig 7 Estructura química de la quercetina

ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA QUERCETINA

El nombre Quercetina deriva de la palabra *Quercetum* (bosque de robles) y se ha utilizado desde 1857 para describir un compuesto químico que pertenece al grupo de los flavonoides, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. La quercetina es un compuesto de color amarillo brillante y es insoluble

al agua, aunque soluble en alcohol y lípidos. La Quercetina es un compuesto lipofílico, por lo que puede cruzar la membrana celular en interactuar con varias moléculas de localización intracelular presentando así múltiples efectos. La Quercetina es una aglicona, es decir que carece de un azúcar adjunto. Cuando un glucósido (un azúcar como la glucosa, ramnosa o rutinosa) se une y sustituye a un grupo OH (comúnmente en la posición 3) se forma un glucósido de quercetina. Este grupo glucosilo puede cambiar la solubilidad, absorción y efectos in vivo de la Quercetina. La presencia de un grupo glucosilo (quercetina glucósido) da como resultado una mayor solubilidad al agua en comparación con la quercetina aglicona (Fig. 7).

Fuentes dietéticas de la Quercetina

La quercetina es el flavonoide más frecuentemente encontrado en los alimentos, encontrándose principalmente en forma de glucósido de quercetina. Está presente en una gran variedad de alimentos como manzanas, bayas, uvas, cebollas, brócoli, clavo, orégano, chayotes, tomates, así como semillas (nueces). La Quercetina también se encuentra en varios medicamentos botánicos como por ejemplo el Ginkgo Biloba. La forma aglicona de la quercetina se encuentra en menor cantidad en la dieta, siendo las dos fuentes principales de ésta las cebollas y los chalotes. Sin embargo, dependiendo de qué parte de estos alimentos se consuma, será el tipo de quercetina ingerida. Por ejemplo, la pulpa de las cebollas contiene principalmente glucósidos de quercetina, con sólo trazas de quercetina aglicona, mientras que las capas más externas de la cebolla contienen una mayor cantidad de quercetina aglicona (39).

Usos terapéuticos de la quercetina

La Quercetina tiene múltiples blancos intracelulares entre los cuales se encuentran proteínas involucradas en la apoptosis, ciclo celular, detoxificación, replicación, antioxidantes y angiogénesis. De ahí sus múltiples efectos como antioxidante, antihipertensivo, gastroprotector, y sus propiedades antivirales, antibacteriana, antiinflamatoria, antitrombótica y antineoplásica (40).

La quercetina se considera un potente antioxidante debido a su capacidad para eliminar los radicales libres y unirse a iones metálicos. Sus capacidades antioxidantes se atribuyen principalmente a la presencia del grupo catecol en el anillo B y el grupo OH en la posición 3 del anillo A. Además, la quercetina no solo detiene la peroxidación de lípidos, sino que también aumenta los niveles de glutatión, contribuyendo así a prevenir la formación de radicales libres (41).

Efecto antineoplásico de la quercetina

La actividad antineoplásica atribuida a la quercetina, se relaciona principalmente con su efecto antiproliferativo y pro-apoptótico observado y estudiado en células neoplásicas de diferentes estirpes celulares como próstata, pulmón, cervicouterino, mama y colon entre otros (42) **Tabla I**. La quercetina además no ejerce actividad necrótica en cultivos de células no tumorales. Esta característica resulta importante ya que los efectos colaterales relacionados a la actividad necrótica en células no neoplásicas serían menores en comparación con fármacos tradicionales utilizados en la quimioterapia como el cisplatino. Como explicación para este efecto selectivo de la quercetina sobre las células neoplásicas se describe el hecho que las células neoplásicas presentan cantidades reducidas de enzimas antioxidantes (43) por lo que son más sensibles de lo normal a las especies reactivas de oxígeno inducidas por quercetina. Otra característica que presenta la quercetina, a diferencia de los agentes utilizados en la quimioterapia, es que su uso no está acompañado de efectos secundarios. De hecho, existen estudios en los cuales la quercetina previene del efecto nefrotóxico de agentes utilizados en la quimioterapia como el cisplatino sin afectar la actividad antitumoral de éste (44). Por otro lado, al utilizar quercetina junto con otros agentes quimioterapéuticos se presenta un efecto sinérgico observándose un incremento en las células neoplásicas con apoptosis (45).

TABLA I. Mecanismos de acción de la Quercetina en diferentes tipos de Cáncer

Tipo de Cáncer	Mecanismos	Referencias
Cáncer de mama	Incrementa apoptosis e inhibe la progresión en el ciclo celular	Nguyen et al. (2017)

	Reduce la expresión de vimentin, Snail, N-cadherin, Twist, Slug, metaloproteína-2 (MMP-2), MMP-9 y VEGFR-2. Mejora la expresión de E-cadherina	Balakrishnan et al. (2016) and Quagliariello et al. (2016)
Colon	Inhibe la viabilidad de las células de cáncer de colon CT26 y MC38 Induce apoptosis a través de la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs)	Kee et al. (2016)
	Causes G2 phase arrest Induces autophagic cell death through ERK activation	Y. Zhao, Fan, et al. (2017) and J. Zhao, Liu, et al. (2017)
Páncreas	Reduces the tumor growth and drug resistance	Cao et al. (2015)
Hígado	Induce apoptosis	Guan, Gao, Xu, et al. (2016)
Pulmón	Desencadena la apoptosis mediada por BCL2/BAX, así como también la catástrofe mitótica y la necrosis. Inhibe el potencial migratorio de las células A549 cells	Klimaszewska-Wiśniewska et al. (2017)
	Mejora la expresión de nm23-H1 y de inhibidores de la metaloproteína-2 Inhibe la expresión de MMP-2. GW9662, a PPAR-γ antagonista	Chuang et al. (2016) and Warnakulasuriya, Ziaullah, and Rupasinghe (2016)
	Inhibe la actividad de aurora B Reduce la fosforilación de la histona 3	Xingyu et al. (2016)
Vejiga	Inhibe la proliferación celular y la formación de colonias en células de cáncer de vejiga al inducir daño en el DNA	Oršolić et al. (2016)
Gástrico	Inhibe la expresión de proteínas virales EBV, incluyendo las proteínas EBNA-1 y LMP-2 Induce la expresión de p53, Bax y Puma Escinde a las caspasas 3 - 9 y Parp	J. Lee, Lee, Kim, et al. (2016) and H. H. Lee, Lee, Shin, et al. (2016)
Hueso	Disminuye la expresión de ciclina D1 en células SKOV3 y U2OSPt cells	Catanzaro, Ragazzi, Vianello, Caparrotta, and Montopoli (2015)
	Inhibe la proliferación de células 143B proliferation y regula a la alza la expresión de miR-217	X. Zhang, Guo, et al. (2015), J. Y. Zhang, Lin, et al.

		(2015), and X. A. Zhang, Zhang, et al. (2015)
Cerebro	Suprime la expresión de COX-2 al inhibir a Hsp27 y actúa como inhibidor de COX-2 y Hsp27 Reduce la expresión de MMP-2	Q. C. Li, Liang, Hu, and Tian (2016) and J. Li, Tang, Li, Li, and Fan (2016)
	Induce muerte celular por necrosis y regula a la baja la expresión de Bcl-2 mRNAs. Favorece la expresión de mRNAs mitocondriales Modula la vía mitocondrial y la señalización de JAK2/STAT3	Wang et al. (2013)
Cabeza y cuello	Retarda el crecimiento de colonias en células HSC-3 Suprime a MMP-2 y MMP-9	Chan, Lien, Lee, and Huang (2016)
	Causa arresto en la fase G1 phase Induce apoptosis, suprime la expresión de Bax y activa la expresión de Caspase-3 y Bcl-2	Z. Yuan et al. (2015)
Cervicouterino	Inhibe la expresión antiapoptótica de AKT and Bcl-2 Incrementa los niveles mitocondriales de citocromo-c Causa arresto del ciclo celular en G2/M	Bishayee et al. (2013)
	Induce apoptosis a través de la vía PI3k/Akt	Xiang, Fang, and Wang (2014)
Piel	Bloquea la expresión de COX-2 inducida por radiación UVB y la activación de NF-kB en células de la línea Hacat	Caddeo et al. (2016)
	Reduce el tamaño del tumor y el número de papilomas.	Ali and Dixit (2015)
Tiroides	Disminuye la proliferación celular e incrementa la apoptosis mediante la activación de caspasas Regula a la baja los niveles de Hsp90 Disminuye la actividad del proteasoma quimiotripsina-like	Mutlu Altundağ et al. (2016) and Quagliariello et al. (2016)
Ovario	Suprime a ROS-inducido por daño e incrementa la expresión de enzimas endógenas antioxidantes	W. Li, Liu, et al. (2014), N. Li, Sun, et al. (2014), X. Li, Wang, et al. (2014), and W. Li, Zhao, et al. (2014)
	Induce apoptosis en las células A2780S y activa a caspasa-3 y caspasa-9. Regula a la baja a MCL-1 y Bcl-2. Regula a la alta a Bax y cambia el potencial transmembrana mitocondrial	Gao et al. (2012)
Riñón	Protege contra la nefrotoxicidad inducida por Doxorubicina y disminuye la expresión renal de TNF- α , IL-1B, iNOS y caspasa-3	Heeba and Mahmoud (2016)

Mesotelioma	Modula la expresion of ciclinas and cinasas dependientes de ciclinas Favorece las vías JNK, p38 y MAPK/ERK y aumenta la fosforilación de ERK	Demiroglu-Zergeroglu, Ergene, Ayvali, Kuete, and Sivas (2016)
--------------------	---	---

Modificado y Tomado de Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, Mubarak MS. Anticancer potential of quercetin: Acomprehensive review. *Phytother Res.* 2018 Nov;32(11):2109-2130

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA QUERCETINA

El mecanismo por el cual la quercetina muestra efecto antiproliferativo en las células neoplásicas es mediante arresto del ciclo celular en ciertos puntos control de éste (**Fig 8**).

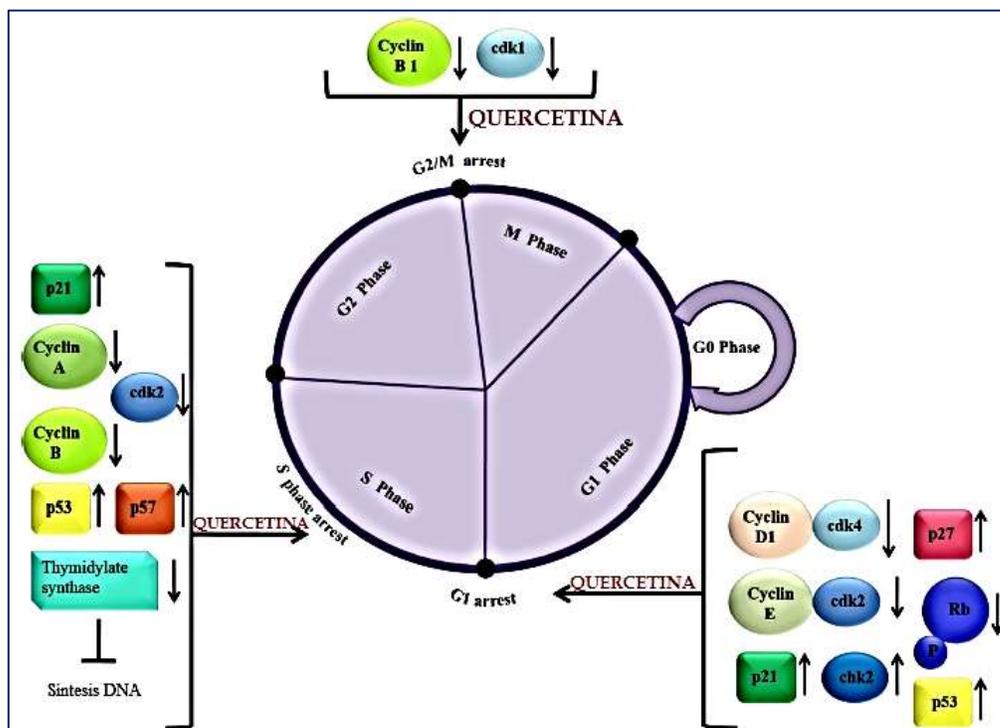


Fig 8 Sitios de acción en el Ciclo Celular de la Quercetina. Tomado de Kashyap D. Molecular mechanisms of action of quercetin in cáncer: recent advances. *Tumor Biol* 37(10), 12927-12939

La Quercetina causa arresto en G1, en G2/M, en G0/G1 y en la fase S. El arresto en G1 lo realiza mediante la disminución en la expresión de ciclina D1/Cdk4 y E/Cdk2, así como también provocando aumento en la expresión de p21 (46). El arresto en G2/M o en G0/G1 lo realiza al ocasionar aumento en la expresión del gen de retinoblastoma (Rb), habiendo sido observado que tanto el arresto sobre G2/M como la inhibición de síntesis de DNA (fase S) son concentración dependientes (47). El arresto en la fase S es el resultado de una disminución en la expresión de Cdk2 y de las ciclinas A y B, mientras que el arresto en el ciclo celular en la fase G2/M del ciclo pueden tener como causa un incremento en el nivel de ciclina B y disminución en los niveles de ciclina D, ciclina E, E2F1 y E2F2.

Cuando los cultivos 2D de células neoplásicas dejan de ser expuestos a la quercetina, éstas ingresan de nuevo al ciclo celular, con el consecuente incremento en la expresión de ciclina D y EB e incremento en la expresión de ciclina D y ciclina E.

Otros estudios describen el arresto en el ciclo celular por parte de la quercetina en la fase G0/G1, mediante el mecanismo de la hipofosforilación de pRb, lo que lleva a la inducción de p21 que es un inhibidor de CDK. Otros mecanismos que se han descrito por parte de la quercetina son: 1) la inhibición de la transcripción de la ciclina B1 y 2) daño al DNA con la activación de la Chk2 quinasa, la cual tiene un papel importante en la inducción de p21. Los mecanismos propuestos mediante los cuales la quercetina daña al DNA son dos. El primero consiste en inducir daño del ADN por inhibición de la actividad de la topoisomerasa II y el segundo es por su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno al actuar como un donante eficaz de electrones para eliminar los radicales peroxilo reactivos (48).

Al ser la apoptosis uno de los mecanismos descritos mediante los cuales la quercetina produce su efecto antineoplásico, se revisan a continuación los diferentes mecanismos de **muerte celular**.

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR: NECROSIS , NECROPTOSIS Y APOPTOSIS

Históricamente, por criterios morfológicos y bioquímicos, se han definido dos clases de muerte celular: la necrosis y la apoptosis.

NECROSIS:

Se ha entendido la necrosis como una muerte celular no programada que consiste en una serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular, lo que desencadena una reacción inflamatoria.

La necrosis consiste en una sucesión de cambios morfológicos como consecuencia de la muerte celular de un tejido. Estos cambios se asocian a algún tipo de lesión exógena irreversible, como por ejemplo exposición a radiación, infecciones o isquemia. En la necrosis hay inicialmente ganancia de volumen celular (oncosis). El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica. Por microscopía electrónica se observan soluciones de continuidad en las membranas plasmática y los organelos, así como marcada dilatación mitocondrial con apariencia de grandes densidades amorfas. Histológicamente se observan células eosinófilas en forma generalizada y homogénea. Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inespecífica del ADN: entre ellos picnosis nuclear o pérdida de volumen y ligera condensación del ADN. El fenómeno que inicialmente se consideró iniciador fue el agotamiento del ATP en un ambiente hipóxico por isquemia prolongada, con la consecuente alteración en el flujo de iones, liberación y activación de enzimas (49).

Diferentes estudios replantean a la necrosis como un fenómeno regulado por vías que no son tan entendibles como las de la apoptosis.

EFECTO NECRÓTICO DE LA QUERCETINA

Para la progresión y crecimiento de las neoplasias, la formación de nuevos vasos a partir de los pre-existentes (angiogénesis) es un evento indispensable. Se conoce que la quercetina tiene la capacidad de inhibir la neovascularización en el microambiente tumoral de manera dosis dependiente, inhibiendo la expresión de VEGF. La inhibición de la angiogénesis podría ser uno de los factores que participan en la necrosis tumoral observada en células neoplásicas después de su exposición a la quercetina. La disminución en la expresión de VEGF posterior a la exposición a quercetina se ha observado in vitro en células endoteliales (50).

NECROPTOSIS

En el 2005 se identificó una nueva forma de muerte celular similar a la necrosis, pero estrictamente regulada: la necroptosis (51,52). La necroptosis es un importante mecanismo de muerte celular involucrado en muchas patologías humanas, desde infecciones virales hasta enfermedades neurodegenerativas.

Si bien la necroptosis se caracteriza por ser caspasas-independiente, tiene similitud y comparte una parte de la vía molecular de la apoptosis, en particular la vía apoptótica extrínseca; sin embargo, la necroptosis difiere notablemente de la apoptosis en las características morfológicas e inmunológicas. La necroptosis exhibe características morfológicas similares a la necrosis, incluida la ruptura de la membrana celular, el citoplasma progresivamente translúcido y la hinchazón de los orgánulos. Por el contrario, las características morfológicas de la apoptosis se caracterizan por la formación de ampollas en la membrana, la contracción celular, la fragmentación del núcleo y la condensación de la cromatina. La ruptura de la membrana plasmática en las células necroptóticas conduce a la liberación del contenido celular, que a su vez puede desencadenar respuestas inflamatorias secundarias. De esta forma, similar a la necrosis no regulada, la necroptosis representa un modo inflamatorio de muerte celular (53).

La vía de la necroptosis está regulada por distintas proteínas, a saber RIPK1, RIPK3 y MLKL.

El tipo de muerte celular: apoptosis versus necroptosis, está influenciada principalmente por la disponibilidad de caspasa-8 y los inhibidores celulares de las proteínas de la apoptosis (cIAP1, cIAP2, XIAP) Los cIAP rigen la ubiquitinilación y degradación RIPK1, mientras que la caspasa-8 media la escisión proteolítica de RIPK1 y RIPK3. La deficiencia de caspasa-8 o cIAP favorece la necroptosis al eliminar, respectivamente, la escisión proteolítica de RIPK1 / RIPK3 o la ubiquitinilación de RIPK1. Por lo cual, aunque el proceso de necroptosis se lleva a cabo en un entorno deficiente para la apoptosis, la vía más de activación de la necroptosis está mediada por receptores de muerte celular, al igual que la vía extrínseca de la apoptosis (54).

En la vía final de la necroptosis se forma el necrosoma que es un complejo de interacción de las proteínas RIPK1-RIPK3 dispuestas en una estructura amiloide de orden superior (55).

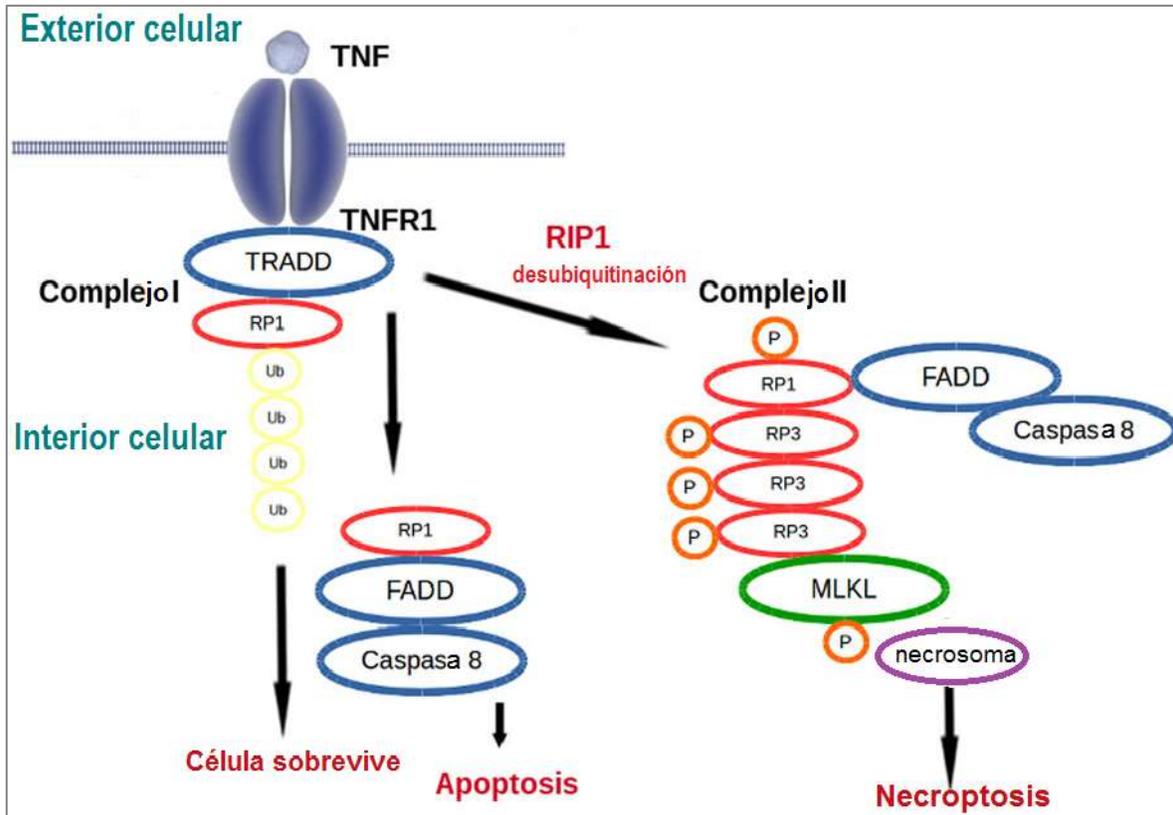


Fig 9 Esquema de los pasos que se llevan a cabo en la Necroptosis. Tomado y Modificado de Mark S D'Arcy Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International ISSN 1065-6995 doi: 10.1002/cbin.11137

La fosforilación de MLKL mediada por RIPK3 es un evento clave en la ejecución de la necroptosis que promueve la oligomerización de MLKL y su posterior asimilación en la membrana plasmática, donde promueve la permeabilización de la membrana y la salida de calcio (56). La fosforilación del dominio pseudoquinasa MLKL descubre o expone un dominio latente del paquete de 4 hélices N-terminal (4HB) necesario para la actividad lítica celular (57). El oligómero MLKL se une a los fosfatos de fosfatidilinositol de la membrana plasmática y se desencadena la apertura de los poros de la membrana (58), esto aunado a la asimilación de MLKL en la membrana plasmática ocasiona el reclutamiento de canales iónicos, lo que conduce al flujo de iones como Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (**Fig 9**).

APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso en el cual la célula deja de crecer y de dividirse para ingresar en una serie de eventos que tienen como resultado la muerte controlada de la célula sin la salida de su contenido alrededor del ambiente circundante. La apoptosis es un proceso activo en el que se consume ATP, mediado primordialmente por caspasas. Las caspasas se activan después de la permeabilización de la membrana mitocondrial, la activación de receptores con dominios de muerte capaces de reclutar procaspasas y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. Existen dos categorías de caspasas, las caspasas iniciadoras y las caspasas ejecutantes. Una vez que se detecta el daño celular, las

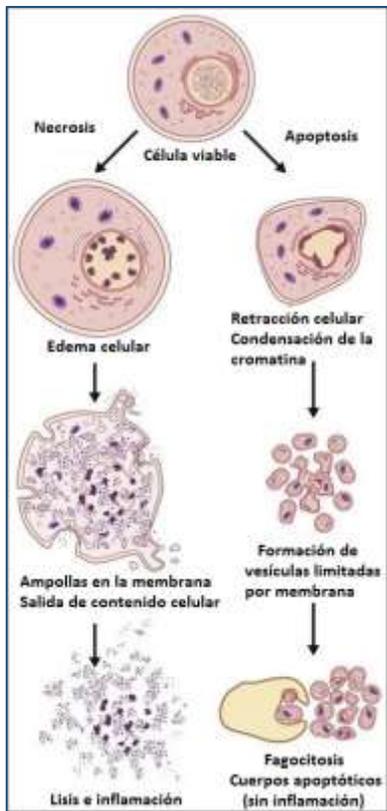


Fig 10. Características morfológicas de la Necrosis y la Apoptosis. Tomado de Robins y Cotran. Patología Estructural y funcional. 8ava ed

caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) se activan y actúan sobre las caspasas ejecutantes (caspasas 3,6 y 7). La activación de las caspasas ejecutantes inicia una serie de eventos que resultan en la fragmentación del DNA a partir de la activación de las endonucleasas, destrucción de las proteínas nucleares y del citoesqueleto, expresión de ligandos para células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos. La apoptosis puede iniciarse por la propia célula cuando ésta detecta daño a través de una serie de sensores intracelulares, mecanismo conocido como vía intrínseca. Alternativamente, puede resultar de la interacción entre una célula del sistema inmune y una célula dañada, vía conocida como extrínseca. Morfológicamente la apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y del ADN, dando origen a los cuerpos apoptóticos. A diferencia de la necrosis, en la mayoría de los casos la apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria. Las diferencias morfológicas entre la necrosis y la apoptosis se encuentran en la **Fig 10**. Las dos ramas de la apoptosis son la vía intrínseca y la vía extrínseca, en las que las señales que inician la muerte celular se originan dentro o fuera de la célula respectivamente (59).

Vía intrínseca de la apoptosis:

La vía intrínseca de la apoptosis, también conocida como vía mitocondrial, implica una variedad de estímulos que actúan sobre múltiples moléculas blanco intracelulares. Esta forma de apoptosis depende de factores liberados de las mitocondrias y se inicia por señales negativas o positivas. Las señales negativas surgen de la ausencia de citosinas, hormonas o factores de crecimiento en el ambiente inmediato de la célula. Sin esas señales, las moléculas pro-apoptóticas intracelulares, como PUMA, NOXA y BAX, que normalmente se encuentran inhibidas, se activan e inician la apoptosis. Otros factores que pueden iniciar la apoptosis, de forma positiva, son la exposición a hipoxia, toxinas, radiación, especies reactivas de oxígeno, virus y agentes tóxicos.

La caspasa iniciadora que controla la vía intrínseca de la apoptosis es la Caspasa 9. Cuando la apoptosis es inducida por estímulos positivos o negativos, se desencadenan cambios en la membrana mitocondrial, siendo el resultado la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Una vez que este poro se abre, las proteínas pro-apoptóticas (como citocromo C, Smac/Diablo y HtrA2/Omi) son capaces de filtrarse de la mitocondria hacia el citoplasma y activar la apoptosis (59).

Vía extrínseca de la apoptosis:

La vía extrínseca de la apoptosis, también conocida como la vía del receptor de muerte, se inicia por las células natural killer o por los macrófagos al producir ligandos de muerte, los cuales al unirse a los receptores de muerte (DR) localizados en la membrana de la célula blanco inducen la vía extrínseca de la apoptosis a través de la activación de la procaspasa 8 a Caspasa 8. Los receptores para muerte localizados en la membrana celular son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) e incluyen varios miembros.⁶⁹ Cada receptor de muerte tiene su ligando correspondiente. La caspasa 8 puede inducir la apoptosis por dos vías secundarias distintas. La vía secundaria que se induce depende de si las células corresponden al tipo I o al tipo II. En las células tipo I, la caspasa 8 se une directamente a las caspasas ejecutantes iniciando así la apoptosis. En las células tipo II, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) inhiben la activación directa de las caspasas ejecutantes por parte de la caspasa 8, a no ser que las IAPs sean inhibidas por proteínas que se liberan de la mitocondria (59).

Quercetina y apoptosis.

Las evidencias en la literatura existente sugieren que la quercetina puede iniciar la apoptosis a través de la vía intrínseca. Uno de los mecanismos iniciales propuestos para el

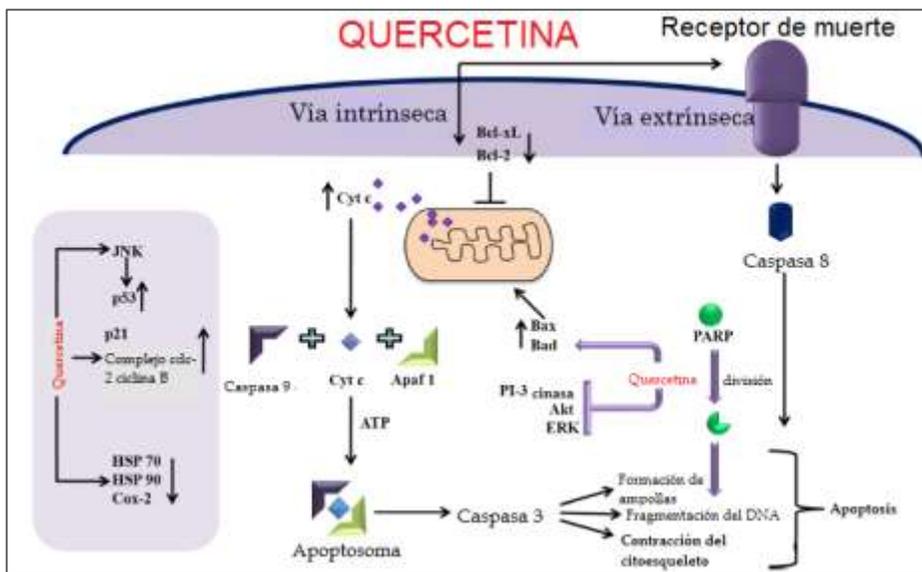


Fig 11 Quercetina y Apoptosis. Modificado de Kashyap D et al. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-016-5184-x

efecto proapoptótico de la Quercetina es la despolarización de la membrana mitocondrial, con la consecuente pérdida en el potencial de membrana mitocondrial que lleva a la activación de una serie de vías y factores que favorecen la apoptosis entre los cuales está la activación de la cascada de las caspasas (caspasas 3 y 9), seguido de la liberación de citocromo c. La inducción de la apoptosis a través de esta vía por parte de la quercetina está reportada en varias líneas celulares humanas, entre las que se encuentran líneas de carcinoma mamario, carcinoma nasofaríngeo, leucemia y carcinoma epidermoide entre otros. Las células derivadas de carcinoma mamario y carcinoma epidermoide, al ser expuestas in vitro a Quercetina, muestran incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax y Cyt c, observándose también en estas, liberación de factores inductores de apoptosis de la

mitocondria al núcleo, como resultado de la disminución del potencial de membrana mitocondrial (**Fig 11**). Estos eventos celulares llevan finalmente a la formación de ampollas celulares, pérdida de adherencia celular, contracción citoplasmática y finalmente fragmentación del DNA (60).

MODELOS TRIDIMENSIONALES PARA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER Y PRUEBAS FARMACOLÓGICAS

Los modelos de cultivo celular bidimensionales, han producido información importante sobre el funcionamiento celular. Sin embargo, para el estudio de los tumores y las células neoplásicas que los componen, los modelos 2D presentan varias limitaciones.

En un modelo 2D las células crecen sobre una superficie plana de plástico (**Fig 12**), encontrándose así todas las células expuestas de manera uniforme a cantidades suficientes de nutrientes y oxígeno, a diferencia de las condiciones en las que se encuentran las células en los tumores sólidos, en donde hay gradientes de oxígeno, nutrientes y de señales biológicas, mismos que pueden estimular o inhibir la progresión del tumor. De igual forma en caso de exposición a fármacos, en los cultivos 2D hay una exposición homogénea al fármaco y sin barreras, mientras que la difusión de un fármaco in vivo es modificada por el estroma o tejido conectivo que acompaña a las células neoplásicas, así como también por la organización de estas células.

Por otro lado, la disposición en monocapa presente en los cultivos 2D difiere de la compleja disposición celular y composición de la matriz extracelular presente en el microambiente tumoral. Las interacciones célula-célula presentes en un cultivo en monocapa, se limitan a interacciones con células a los lados, sin existir células subyacentes o suprayacentes.

Al no reproducir los cultivos en monocapa la complejidad del microambiente nativo de un tumor, es decir las interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular que se llevan a cabo en los tejidos neoplásicos reales, hacen preferible el utilizar modelos 3D en el estudio de los tumores.

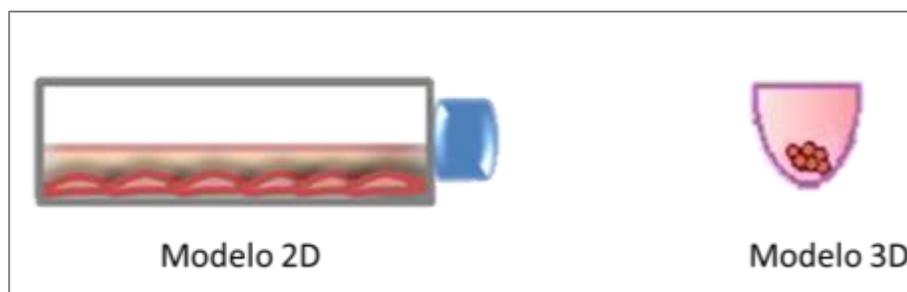


Fig 12 Representación gráfica de las características de un modelo bidimensional (2D) y un modelo tridimensional (3D)

A diferencia de los modelos 2D, los modelos 3D permiten una disposición y agrupación celular tridimensional, semejante a la real, con mayor interacción célula-célula, así como la presencia de interacción célula-matriz extracelular. Adicionalmente, en los modelos 3D se expresan proteínas y genes que en los modelos 2D no se encuentran presentes como por ejemplo proteínas que favorecen la migración y/o diseminación de un tumor. Otras de las características observadas en los modelos 3D es la proliferación menor de las células neoplásicas en comparación con los modelos 2D, así como también una menor sensibilidad a agentes quimioterapéuticos (61).

EMPLEO DE ANDAMIOS 3D PARA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

Un componente indispensable en la arquitectura de los tumores es el estroma. Este componente rodea directamente a las células neoplásicas proporcionándoles soporte y es un elemento esencial para la supervivencia de éstas. El estroma tumoral está compuesto por tejido conectivo en el que se encuentran fibroblastos, fibras de colágena, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y células inflamatorias. El estroma tumoral tiene un papel importante en la progresión de las neoplasias (62,63) y por consiguiente es importante para un estudio más real de éstas, considerar reproducir este componente en los modelos 3D de tumores. Por lo tanto, con la finalidad de reproducir las características de la matriz extracelular presente en los tumores nativos, se pueden emplear andamios fabricados con biomateriales mediante ingeniería de tejidos. De esta manera se puede fabricar un nicho de crecimiento para las células neoplásicas, controlando y definiendo las características físicas y biológicas de la matriz extracelular en la que estarán inmersas las células tumorales (64). Una vez fabricado el andamio, se introducen en éste las células, con lo cual se obtiene un modelo 3D útil para estudiar características de comportamiento de las células neoplásicas.

Los andamios se pueden clasificar en andamios biológicos y andamios de polímeros. Los andamios biológicos utilizan principalmente matriz extracelular de origen natural como Matrigel y colágena. Los andamios que utilizan polímeros utilizan hidrogeles sintéticos o polímeros biocompatibles para generar el soporte físico en los cultivos celulares. Tal es el caso de los andamios fabricados con ácido poliglicólico, ácido poliláctico y policaprolactona (PCL).

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático, que se forma por la polimerización de la ϵ -caprolactona cíclica (**Fig 13**).

Se caracteriza por ser biodegradable, biocompatible, no tóxica, con una tasa de degradación lenta, un punto de fusión de 60°C y una resistencia mecánica que permite la proliferación celular entre sus fibras. Al no tener isómeros, no hay variaciones en la temperatura de fusión ni en el tiempo de degradación biológica, con lo cual se pueden reproducir las condiciones experimentales (65). Este material ha sido utilizado en los andamios en el

estudio de varios tipos de tumores como Ca de mama (66), Sarcoma de Ewing (67) , osteosarcoma (68) y Cancer de colon (69) entre otros.

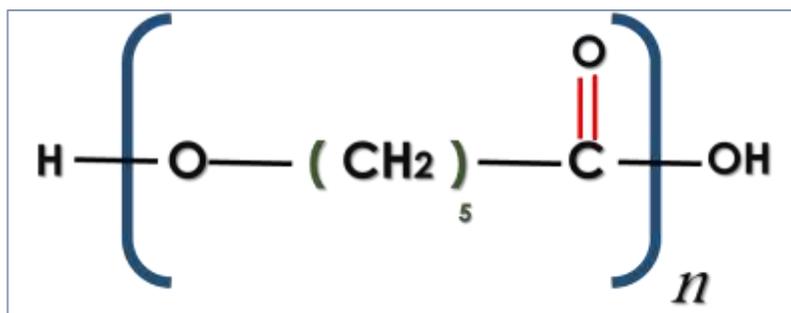


Fig 13 Fórmula estructural de la policaprolactona (PCL)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Tumor de Células Gigantes de hueso afecta a población esqueléticamente madura y económicamente activa. La mayor parte de los pacientes con este tumor presentan dolor, aumento de volumen en el sitio afectado y disminución de la capacidad para la movilización. En caso de recidiva posterior al tratamiento hay disminución importante en la calidad de vida de estos pacientes.

Hasta el momento no existe un tratamiento para el Tumor de Células Gigantes Óseo que no se encuentre acompañado de posibles complicaciones, desventajas y/o efectos secundarios para los pacientes (**Tabla 2**). Aunado a esto, existen pocas alternativas terapéuticas que no sean quirúrgicas y que puedan ser co-adyuvantes y/o complemento en el tratamiento del tumor de células gigantes. Por tal motivo es necesario continuar con la búsqueda de otras alternativas que sean a la vez efectivas en la erradicación del tumor e inocuas para los pacientes.

Tabla 2. Modalidades de tratamiento para el Tumor de Células Gigantes de Hueso.

Ventajas y Desventajas

PROCEDIMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
RESECABLES		
Resección en bloque	Márgenes libres de tumor	Aflojamiento protésico posterior
	Sin recurrencias locales	Limitación funcional
Resección en bloque asistida	Resección más precisa del tumor	Sin compromiso de la función
	Márgenes libres	

Curetaje	Poca alteración de la función	Riesgo mayor de recurrencias
Con adyuvantes	Menor riesgo de recurrencia	Daño a tejidos blandos. Fracturas patológicas. infecciones
IRRESECABLES		
Embolización arterial selectiva	Déficit neurológico menor que la cirugía	
Denosumab	Posibilidad de tratar tumores poco accesibles quirúrgicamente	Efecto de rebote. Fracturas. Hipercalcemia. Osteonecrosis mandibular Osteosarcoma
Radioterapia		Transformación sarcomatosa 11%
		Dermatitis, neuritis
Bifosfonatos (solo en irresecables?)	Utilizado como adyuvante menor riesgo de recurrencia	Menor tiempo necesario de administración Sin consenso sobre su uso

JUSTIFICACIÓN

- El Tumor de Células Gigantes de hueso es el tumor óseo primario más frecuente en el Instituto Nacional de Rehabilitación (7).
- La quercetina ha probado tener efecto antitumoral en varias líneas celulares y tiene como ventajas el no provocar efectos secundarios, así como también potenciar el efecto de medicamentos antineoplásicos y disminuir la toxicidad de los mismos.
- Sin embargo, no existen trabajos previos en la literatura en los que se haya estudiado el efecto que la quercetina puede tener sobre el tumor de células gigantes de hueso.
- El estudio sobre los efectos de la quercetina sobre el tumor de células gigantes, podría además de generar nuevo conocimiento, generar información que podría posteriormente ser aplicada en el tratamiento de los pacientes con este tipo de tumor, con la finalidad de mejorar el pronóstico así como también la calidad de vida de estos pacientes.
- Debido a que para el estudio de neoplasias, los modelos 3D que utilizan andamios: 1) reproducen de forma más realista la disposición celular y el microambiente tumoral y 2) la evaluación *in vitro* de la respuesta farmacológica de las neoplasias es

más real al utilizar modelos 3D, se utilizará un modelo tridimensional con andamios hechos de policaprolactona.

- Considerando que la eficacia observada en un modelo 3D *in vitro* puede diferir a la observada en un modelo animal, ya que en este último hay múltiples variables que pueden intervenir en la eficacia en el sitio blanco, entre las cuales se encuentran: biodisponibilidad, tasa de disolución, absorción, farmacocinética, metabolismo, etc. Se sumará al modelo 3D, el modelo animal, con este fin se implantó el constructo (andamio de PCL sembrado con células de tumor de células gigantes) en el ratón atómico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La quercetina tiene algún efecto antiproliferativo, necrótico y/o apoptótico en modelos tridimensionales con células de tumor de células gigantes, implantados en ratones atómicos?

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA: La quercetina no tiene efecto antiproliferativo, necrótico y/o apoptótico en modelos tridimensionales de tumor de células gigantes implantados en ratones atómicos.

HIPÓTESIS ALTERNA: La quercetina tiene efecto antiproliferativo, necrótico y/o apoptótico en modelos tridimensionales de tumor de células gigantes implantados en ratones atómicos

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene 2 objetivos generales:

1. Generar una línea de investigación básica en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en el área de tumores óseos, que incluya pruebas farmacológicas, utilizando de manera innovadora modelos tridimensionales *in vitro* e *in vivo*
2. Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la Quercetina en un modelo tridimensional de Tumor de Células Gigantes de hueso, implantado en ratones atómicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener tejido en fresco de pacientes con diagnóstico previo de tumor de células gigantes para su cultivo, criopreservación y posterior uso en siguientes experimentos.
2. Determinar la dosis letal media (DL50) de la quercetina en cultivos 2D de tumor de células gigantes, ya que no hay literatura al respecto.
3. Determinar en cultivos 2D el efecto antiproliferativo , necrótico y apoptótico de la Quercetina, utilizando PCR-RT
4. Observar por microscopía electrónica de transmisión los cambios ultraestructurales presentes en células de tumor de células gigantes de hueso expuestas durante 24 hrs a quercetina
5. Determinar en cultivos 2D de tumor de células gigantes de hueso el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del doble de concentración de DL50 de Quercetina, utilizando PCR-RT
6. Describir las características ultraestructurales a diferentes tiempos de exposición a la Quercetina (0 hrs, 4 hrs, 8 hrs, 12 hrs 24 hrs) en células de tumor de células gigantes
7. Elaboración del modelo tridimensional con células de tumor de células gigantes utilizando andamio de policaprolactona (PCL)
8. Determinar viabilidad de las células en el modelo tridimensional a los 7 y a los 14 días
9. Determinar en modelo 3D *in vitro* (constructo) el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina, por PCR-RT
10. Determinar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina en constructo implantado en ratones atómicos, por PCR-RT y determinar las características ultraestructurales de los constructos .

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Tipo de estudio Estudio experimental que se llevará a cabo en 3 modelos (modelo 2D, modelo 3D, modelo *in vivo*) con células aisladas provenientes de tumor de células gigantes.

2.- Descripción del universo de trabajo.

UNIVERSO DE TRABAJO: Muestras (resecciones en bloque) del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Rehabilitación

3.-Definición del grupo control

Para el modelo 2D, el grupo control será cultivos de células de TCG sin tratamiento

Para el modelo 3D, el grupo control será constructo de andamio con células sin tratamiento

Para el modelo in vivo el grupo control será el de ratones atímicos con implante 3D sin tratamiento

4.- Criterios de inclusión

A) Para la obtención de tejido tumoral

- 1) Pacientes con diagnóstico histológico de Tumor de Células Gigantes
- 2) Sin tratamiento previo
- 3) que acepten participar en este proyecto (firmando el Consentimiento informado)

B) Para cultivos 2D de células y constructos

- 1) Tejido fresco (no más de 30 min de extraído del paciente)
- 2) Cantidad de tejido = ó > a 5mm³

C) Para el estudio de los constructos implantados en los ratones

- 1) Ratones con edad = o > 9 semanas

5.- Criterios de eliminación

A) Para la obtención de tejido tumoral

- 1) Pacientes con diagnóstico histológico de Tumor de Células Gigantes que cumplan los criterios de inclusión, pero en los que no haya sido posible (por fallas en la logística obtener tejido en fresco.

B) Para los cultivos 2D de células y constructos

- 1) Cultivos contaminados
- 2) Cultivos en los que la impronta del tejido en fresco no muestre los componentes histológicos de TCG
- 3) Cultivos en los que el corte histológico de la imagen en espejo muestre únicamente zonas hemorrágicas o zonas de necrosis

C) Para los ratones

- 1) Ratones con pérdida del implante a través de herida quirúrgica abierta
- 2) Ratones fallecidos durante el proceso de cirugía (sobredosis de anestesia)
- 3) Ratones fallecidos en tiempo posterior a la cirugía en los que se observe baja temperatura y/o color pálido

6.-Criterios de exclusión (para la toma de tejido tumoral)

a) Pacientes con sospecha clínica de Tumor de Células Gigantes sin confirmación histológica del diagnóstico por parte del servicio de Anatomía Patológica

b) Pacientes con tratamiento previo para TCG (denosumab y/o curetaje) en los que se realice resección en bloque

c) Pacientes con diagnóstico de Tumor de Células Gigantes en los que el tratamiento quirúrgico de elección sea curetaje y no resección en bloque

7.- Tamaño de muestra

Debido a que no hay estudios previos con información sobre el tamaño del efecto de la quercetina en TCG, se abordará este proyecto como un estudio piloto, en el cual la cantidad de muestras empleada fue de 3, con la finalidad de poder determinar medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). De esta forma, el análisis por PCR-RT se realizó por triplicado. En el caso de los ratones atímicos se utilizaron 4 ratones para cada grupo, considerando un ratón extra en caso de pérdida.

Habrán 3 grupos de ratones: el grupo 1 será el grupo control, el grupo 2 recibirá denosumab y el grupo 3 recibirá quercetina. A su vez cada grupo tendrá 2 subgrupos: 1) evaluación del efecto a los 4 días, 2) evaluación del efecto a los 21 días. En total se analizarán 24 ratones. **Fig 14**

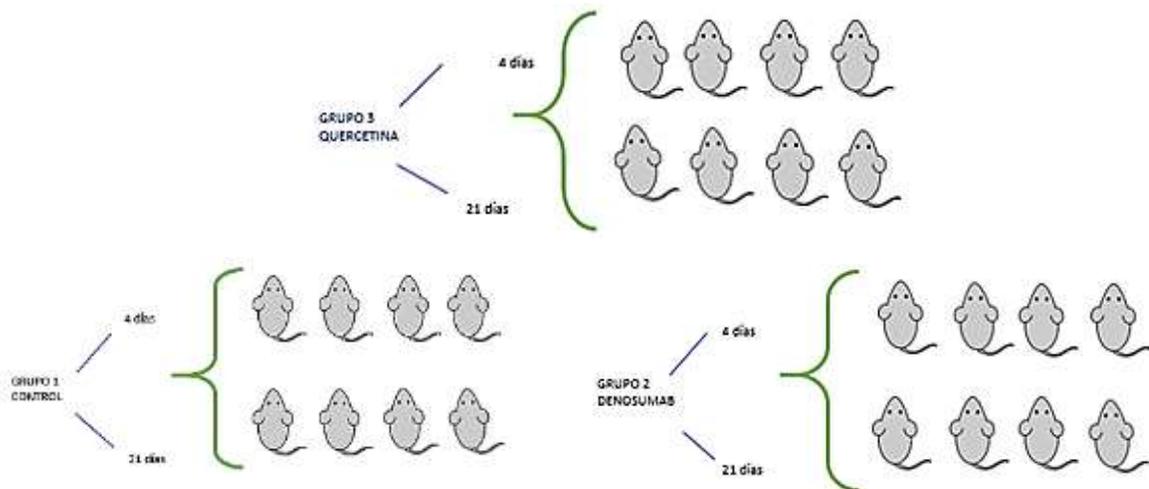


Fig 14 Descripción de los grupos de ratones atímicos y sus características con respecto al tratamiento

8.- Descripción de las variables de estudio

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Tipo de tratamiento: 1) Sin tratamiento, 2) Denosumab, 3) Quercetina

Tipo de Variable: CUALITATIVA nominal

VARIABLES DEPENDIENTES:

VARIABLES DEPENDIENTES DE ESTUDIO	Tipo de variable	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALAS DE MEDICIÓN	UNIDADES DE MEDIDA
Efecto antiproliferativo	Cuantitativa continua	RT-PCR en tiempo real	Expresión de PCNA	Unidades arbitrarias	Expresión relativa
Efecto apoptótico	Cuantitativa continua	RT-PCR en tiempo real	Expresión de Caspasa 3 Expresión de Caspasa 8	Unidades arbitrarias	Expresión relativa
Efecto necrótico	Cuantitativa continua	RT-PCR en tiempo real	Nivel de RIP1K	Unidades arbitrarias	Expresión relativa

9.- Análisis estadístico propuesto

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre 2 grupos a comparar, se utilizará la prueba no paramétrica U de Mann Whittney

Para determinar si existen diferencias entre los 3 grupos (grupo control, grupo denosumab y grupo quercetina) se utilizará la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todas las pruebas se evaluarán con un nivel de significancia del 95% ($p=0.05$) en el programa estadístico SPSS.

10.- Registro de datos Los datos serán registrados en base de datos SPSS

11.- Unidades de observación

1. Grupo de células cultivadas en cajas de 125 cm²
2. Andamio de PCL sembrado con células de TCG *in vitro*
3. Andamio de PCL sembrado con células de TCG, extraído de alguno de los 3 diferentes grupos de ratones

DISEÑO DEL ESTUDIO

El proyecto se dividió en 3 etapas.

Etapa 1

La primera etapa consistió en: 1) la obtención de tejido fresco de tumor de células gigantes, 2) el cultivo del mismo, así como también su expansión y criopreservación, 3) la determinación de la dosis letal 50 de la quercetina en células cultivadas de tumor de células

gigantes y 4) Determinación de la viabilidad celular en cultivos 2D expuestos 24 hrs a la DL50 (Fig. 15)

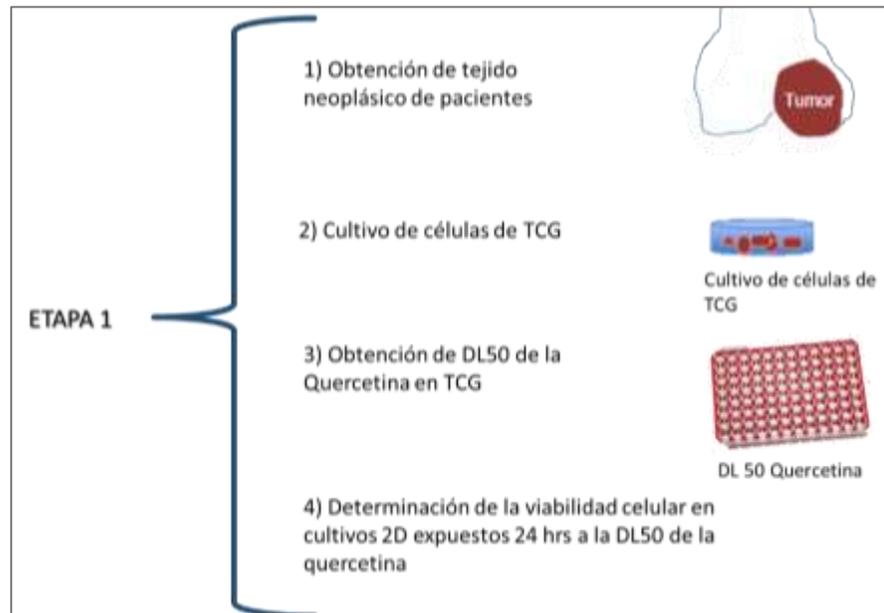


Fig 15 Descripción de la etapa uno del proyecto

Etapa 2

La segunda etapa consistió en exponer a las células de tumor de células gigantes en cultivos 2D a la Quercetina. Esta exposición fue por 24 hrs a la concentración de la DL50 obtenida. Las células también se expusieron por 24 hrs con el doble de la DL50 y finalmente a diferentes tiempos a una concentración de $120\mu\text{M}$ (Fig 16).

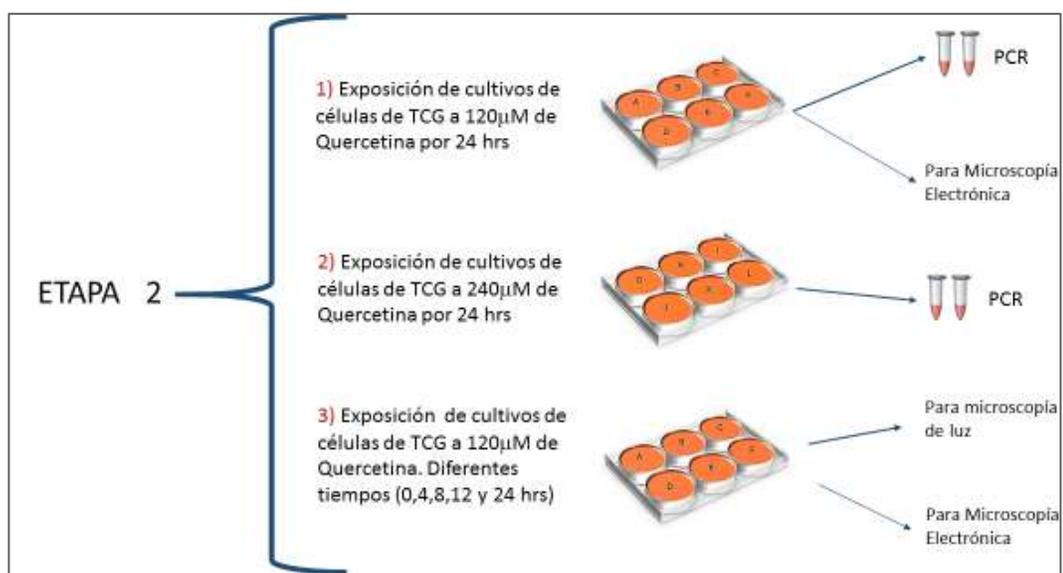


Fig 16 Descripción de la etapa 2 del proyecto

Etapa 3

La tercera etapa consistió en realizar experimentos con los constructos in vitro e in vivo, así como también en llevar a cabo las RT-PCR de los diferentes experimentos (Fig. 17)



Fig 17 Descripción gráfica de la etapa 3

Etapa 4

La cuarta etapa consistió en implantar los constructos en los ratones, administrándoles los diferentes tratamientos, de acuerdo al grupo de pertenencia. En esta cuarta etapa se procedió a analizar histológicamente mediante cortes en hematoxilina y eosina los constructos implantados en los ratones, así como también por RT-PCR la expresión de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8. En esta última etapa del proyecto también se procedió a realizar el análisis comparativo de expresión entre los diferentes modelos, es decir se comparó la expresión de entre el modelo 2D, el modelo 3D in vitro y el modelo 3D implantado en ratón, es decir el modelo animal (Fig. 18).

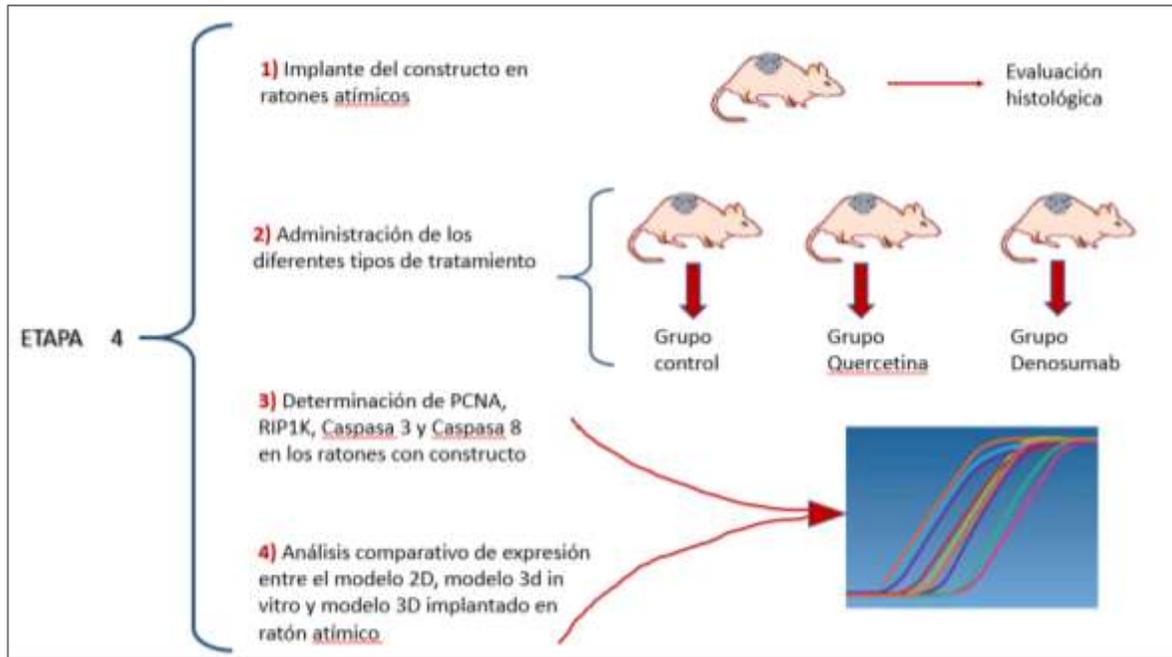


Fig 18 Descripción gráfica de la etapa 4 del proyecto

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

ETAPA 1

1.1 Obtener tejido en fresco de pacientes con diagnóstico previo de tumor de células gigantes de hueso.

Previo aprobación del proyecto por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación (**Anexo 1**) y debido a que no existen líneas celulares en el mercado que proporcionen células de TCG de hueso (repositorio de la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC: atcc.org/cell-products/cancer-research) se invitó a participar a pacientes con diagnóstico de tumor de células gigantes de hueso que cumplieran los criterios de inclusión. De aquellos pacientes que no tuvieron inconveniente en participar y que firmaron el consentimiento informado (**Anexo 4**) se obtuvo tejido en fresco.

Condiciones experimentales:

Se obtuvo muestra de pacientes en quienes el tratamiento quirúrgico de elección consistió en resección en bloque. Una vez obtenidas las resecciones en bloque en fresco, se procedió a realizar cortes sagitales (**Fig 19 A y B**), de esta forma fue posible obtener una “imagen en espejo” de la zona seleccionada para cultivo y también fue posible visualizar completamente el tumor y seleccionar tejido representativo, evitando zonas hemorrágicas.

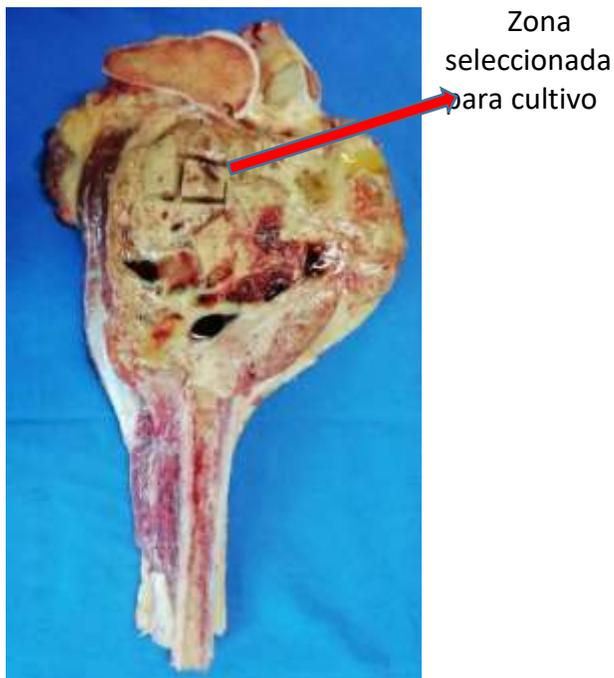


Fig 19 A Corte sagital de tumor en tibia con zona seleccionada para cultivo



Fig 19 B Imagen en espejo de tumor en tibia

1.2 Cultivo primario de tumor de células gigantes:

En cámara de flujo laminar y con material estéril, se obtuvieron fragmentos pequeños de tumor, aproximadamente 5 mm^3 , estos fragmentos fueron lavados primero con una solución buffer (Phosphate Buffered Saline PBS) y después con DMEM. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y con la ayuda de unas pinzas se transfirió el tejido a una caja Petri de 60 mm de radio. Utilizando tijeras y una hoja de bisturí del número 20 se procedió a fragmentar mecánicamente el tejido (**Fig 20A**), hasta que éste presentó consistencia semilíquida. A continuación, se transfirió el tejido a una caja de cultivo de 25 cm^2 para iniciar con el cultivo de las células tumorales por explante (**Fig 20B**), añadiéndose medio DMEM con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de antibiótico. Las cajas se colocaron en incubadora a 37°C con 5% de CO_2 y se cambió en medio cada tercer día. El cultivo celular se mantuvo de forma secuencial hasta obtener 1×10^6 células por cada caja de cultivo primario. Por último, se procedió a su congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido, utilizando crio-viales de 1mL con 1×10^6 /células por crio-vial en Suero Fetal Bovino al 10% con 90 % dimetilsulfóxido (DMSO).

Con la finalidad de confirmar que el tejido seleccionado y cultivado correspondió a tumor de células gigantes, se realizaron 4 procedimientos para cada una de las muestras obtenidas :



Fig 20 A Fragmentación mecánica del tumor de células gigantes de hueso



Fig 20 B Cultivo por explante en cajas de 25 cm²

1. Citología por impronta de la imagen en espejo del tejido seleccionado para cultivo. Esta técnica consiste en presionar ligeramente sobre un portaobjetos el tejido de interés y teñir el material que quedó adherido a la laminilla. Este procedimiento permite observar los componentes citológicos de una lesión, de manera rápida (aprox 5-10 min) y sencilla. Para la tinción se utilizó hematoxilina y eosina. Una vez que se verificó por citología que la zona seleccionada correspondía a TCG (**Fig 21**), se continuó con el proceso de cultivo.

Laminilla con
impronta de zona
seleccionada para
cultivo

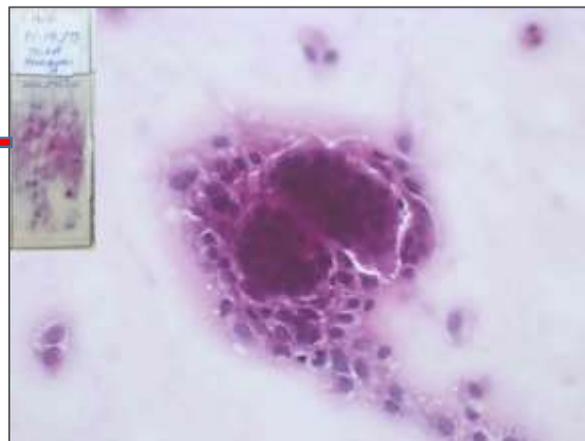


Fig 21 Citología de zona seleccionada para cultivo que muestra componentes histológicos del TCG: dos células gigantes multinucleadas en el centro, rodeadas por células estromales

2. Corte para estudio histológico de la zona en espejo seleccionada para cultivo.
Esta técnica también permitió demostrar que la zona seleccionada para cultivo celular correspondió a TCG, al visualizar los componentes histológicos de este tumor: células gigantes multinucleadas, células estromales y monocitos (**Fig 22A**).
3. Observación de los cultivos primarios con microscopio invertido.
Con esta técnica fue posible visualizar de manera directa a las células que forman parte del tumor en las cajas de cultivo , sin necesidad de extraerlas ni de someterlas a algún proceso para su observación (**Fig 22 B y 22 C**).
4. Tinción de TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) en los cultivos primarios.
Con esta técnica se visualizan de color magenta aquellas células que contienen fosfatasa ácida. Al ser positivas las células multinucleadas observadas en los cultivos, se confirma que estas células son de tipo osteoclasto ya que en estos la fosfatasa ácida se localiza en vesículas intracitoplasmáticas (**Fig 22 D**).

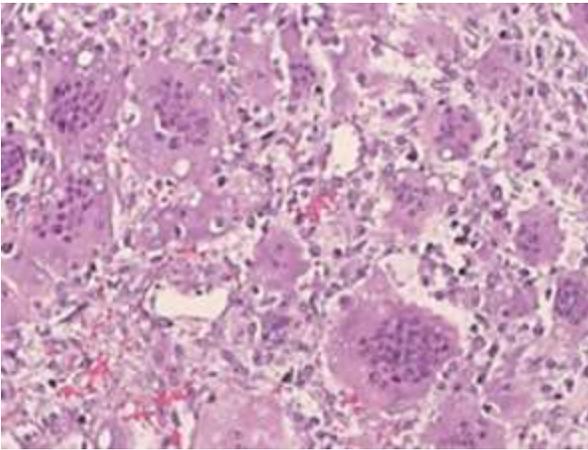


Fig 22A Corte histológico de zona en espejo seleccionada para cultivo que muestra células gigantes multinucleadas y células estromales

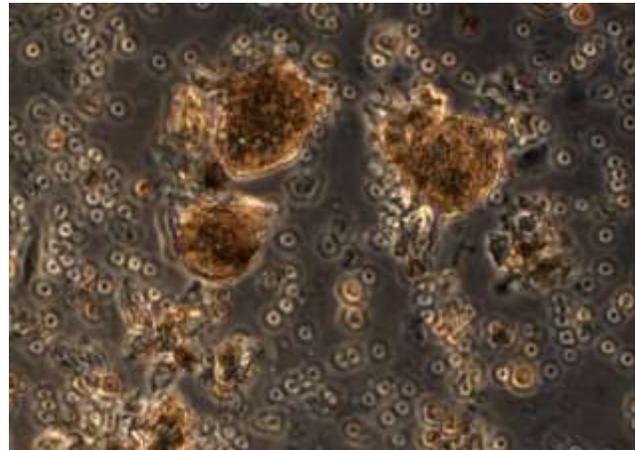


Fig 22B Fotomicrografía con microscopio invertido en la que se observan 3 células gigantes multinucleadas alternando con algunas células estromales

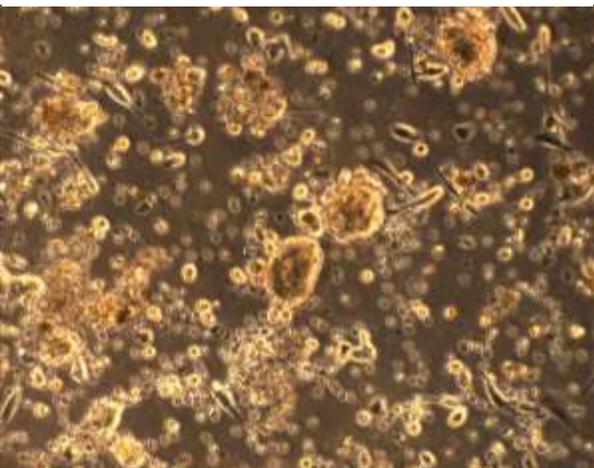


Fig 22C Fotomicrografía con microscopio invertido de cultivo de Tumor de Células Gigantes de Hueso

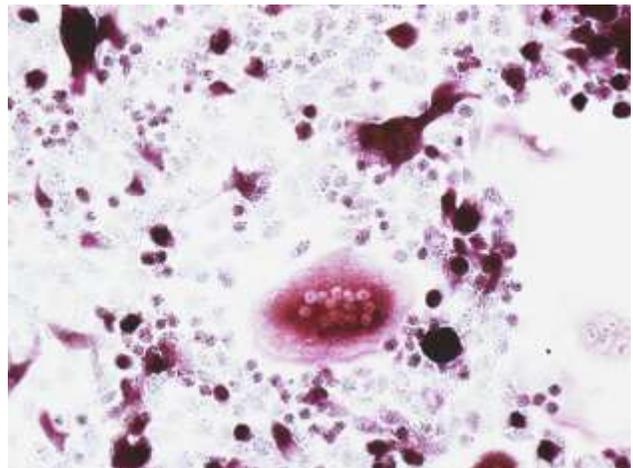


Fig 22D Tinción de Fosfatasa Acida Tartrato resistente, positiva en el citoplasma de las células gigantes multinucleadas del tumor

1.3 Determinación de la dosis letal 50 (DL50) de la quercetina mediante el método MTT

Fundamento del procedimiento: Existen varios procedimientos para determinar el número de células viables en un cultivo. Uno de ellos es el recuento celular cuya metodología es laboriosa e implica una excesiva manipulación de los cultivos. Otro procedimiento es el ensayo del MTT, el cual es un ensayo colorimétrico que se utiliza para medir supervivencia y proliferación celular. El Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es una sal de color amarillo que al ser metabolizada en las células vivas por la deshidrogenasa mitocondrial da como resultado la presencia de formazán, que es de color morado. De esta manera, la cantidad de formazán presente en una caja o en un pocillo es proporcional a la cantidad de células vivas (70). La lectura de la densidad óptica se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Condiciones experimentales

Paso 1: Se utilizó una caja de 96 pozos y se descongelaron 3 viales (con 1×10^6 células cada uno). El cálculo realizado consistió en colocar 15,000 células en cada pocillo. Se utilizaron 74 pozos. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 hrs para permitir su adherencia (**Fig 23**).

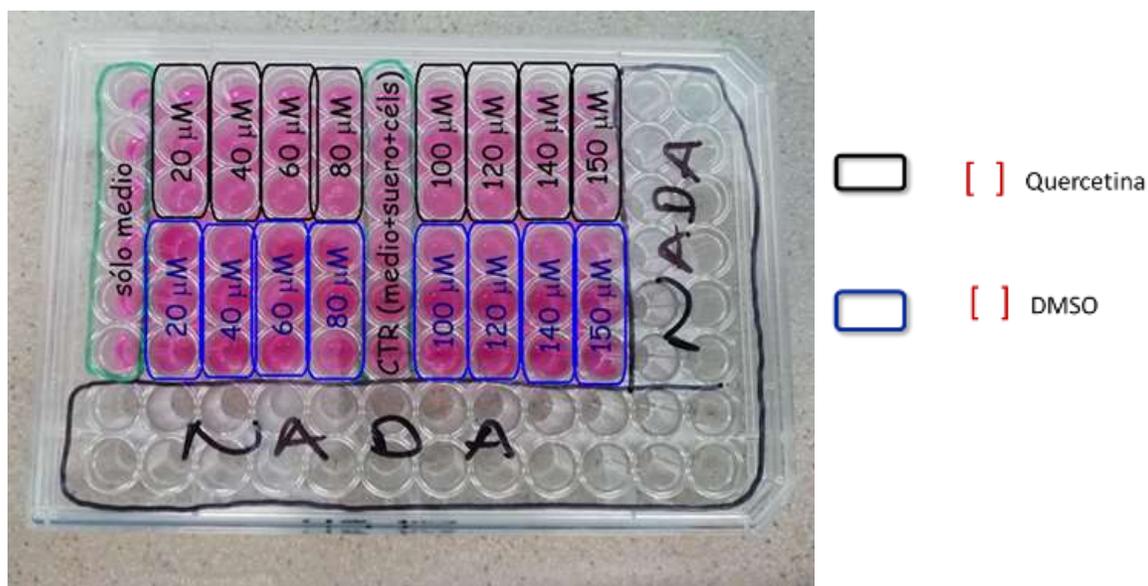


Fig 23 PASO 1: Incubación de células de TCG por 24 hrs para permitir adherencia y posteriormente realizar ensayo MTT

Paso 2: Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó quercetina + medio de cultivo, haciendo las siguientes diluciones seriadas: 20µM, 40µM 60µM,

80 μ M, 100 μ M, 120 μ M, 140 μ M y 150 μ M. Se dejaron incubando las células por 24 hrs a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las condiciones experimentales se realizaron por triplicado (**Fig 24**).

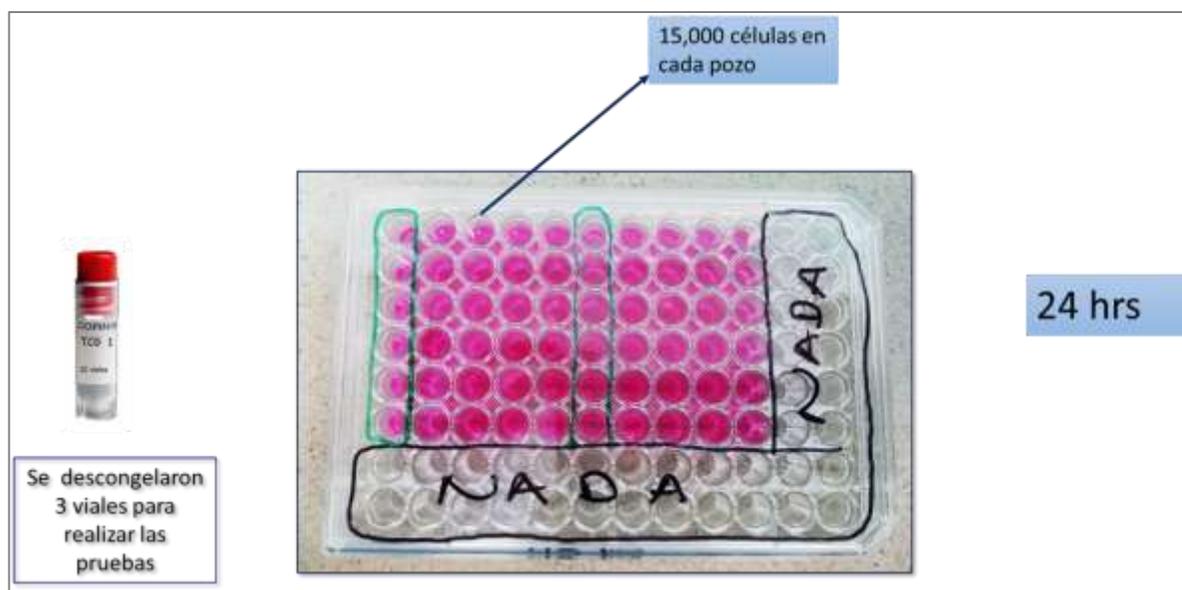


Fig 24 Paso 2 ensayo MTT con diferentes concentraciones de quercetina y DMSO.

El grupo a comparar consistió en las mismas diluciones con DMSO : 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M, 120 μ M, 140 μ M y 150 μ M. A continuación se retiró el medio de cultivo con quercetina o con DMSO de los pocillos, se agregaron 100 μ l de MTT a cada pocillo y se dejó incubar por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una vez que se forma un precipitado de color morado (cristales de formazán), se eliminó el sobrenadante, para añadir posteriormente 100 μ l de isopropanol. Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán fueron disueltos (**Fig 25**). Finalmente se realizó lectura en el espectrofotómetro. Para cada ensayo se utilizaron como controles células no tratadas con quercetina.



Fig 25 Pocillos con formazán en diferentes cantidades de acuerdo a la cantidad de células viables en cada pocillo

1.4 Determinación de viabilidad celular en cultivos 2D expuestos 24 hrs a la DL50 de la Quercetina

Propósito: Una vez determinada en el experimento anterior la DL50 de la quercetina, el objetivo de este experimento fue confirmar con otra técnica (calceína) que el porcentaje de células viables en un cultivo de células, expuestas durante 24 hrs a quercetina, es de 50% o cercano a este valor.

Fundamento: La calceína AM es un compuesto no fluorescente y permeable a las células que se convierte en calceína verde fluorescente cuando se hidroliza en las células vivas mediante las esterasas intracelulares. Se utiliza ampliamente para determinar la viabilidad celular ya que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de células vivas en un cultivo.

Condiciones experimentales: Se realizó cultivo primario de células de TCG en placa de 6 pozos, con 5 mm³ de tumor en cada pozo. Una vez que se llegó a la confluencia en cada pozo (15 días después), se retiró de cada pozo el medio de cultivo enriquecido con suero fetal bovino (SFB), para agregar posteriormente 2ml de medio + 1.5 µl de calceína a cada pozo. Se incubó por 40 minutos y posteriormente se retiró el medio con calceína. Se agregó medio con suero fetal bovino, se documentó la inmunofluorescencia con fotografía y se realizó lectura en espectrofotómetro, considerándose estos datos como la lectura basal (Tiempo 0). Posteriormente a cada pozo se agregaron 1760 µl de medio con una menor proporción de SFB (2%), así como también 240 µl de quercetina (2 ml volumen total). Se expusieron las células por 24 hrs y se retiró el medio con quercetina cumplido este tiempo. Se agregó a cada pozo medio con 1.5 µl de calceína, se incubó por 40 minutos, se retiró el medio con calceína y se agregó medio con SFB. Se documentó la inmunofluorescencia con fotografía y se realizó lectura de intensidad de inmunofluorescencia en espectrofotómetro. Se graficaron los datos.

ETAPA 2

2.1 Exposición de cultivos de células de TCG a 120µM de Quercetina por 24 hrs y su valoración por PCR y Microscopía Electrónica de Transmisión

La metodología se encuentra descrita en el Artículo “ ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN GIANT CELL TUMOR OF BONE CULTURED CELLS EXPOSED TO QUERCETIN” **Anexo**

2.2 Exposición de cultivos de células de TCG a 240 μ M de Quercetina por 24 hrs y determinación de PCNA, RIP1K , Caspasa 3 y Caspasa 8 por RT-PCR

PROPÓSITO. Determinar cuál es el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina con el doble de dosis (240 μ M)

METODOLOGÍA

Cultivo celular y exposición a quercetina.

Se obtuvo tejido fresco de TCG y se disgregó mecánicamente en pequeños trozos utilizando tijeras estériles y también un bisturí. Una vez que el tejido tuvo una consistencia homogénea y semilíquida, se colocó en cajas de cultivo celular de 162 cm² con DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina / estreptomycin al 1%. Las cajas de cultivo se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C con atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5%. El medio se reemplazó cada 3 días hasta que los cultivos fueron confluentes en un 80%. Posteriormente se añadió quercetina a una concentración de 240 μ M en las células experimentales. Las células control para este experimento fueron las mismas que para el experimento previo. Después de 24 horas de exposición, las células se recolectaron con un raspador de células y se guardaron a -80°C hasta llegado el momento de realizar PCR-RT.

Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real

Para determinar el nivel de expresión de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando SYBR Green. Se extrajo el ARN total utilizando 1 ml de Trizol que se añadió a las células recolectadas; después de homogenizar la muestra se añadieron 200 μ l de cloroformo. Se sustrajo la fase acuosa (superior) y se precipitó el RNA empleando 1.5 ml de isopropanol al 100%. Dos horas después se centrifugó la muestra y se extrajo el sobrenadante agregando etanol al 75%. La cantidad del RNA se determinó en un espectrofotómetro mediante la relación 260/230 y 260/280. La calidad del RNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa. El cDNA se sintetizó utilizando el kit de transcripción inversa QuantiTect[®] (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para lo cual se llevó a cabo un ciclo de transcripción inversa durante 15 min a 42°C y un ciclo de desnaturalización durante 3 min a 95°C. Se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el kit de Sybr Green de BioRad. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de desnaturalización durante 15 seg 95°C, seguidos de hibridación y alargamiento durante 30 seg a 58-61°C (dependiendo de la temperatura de fusión del cebador). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. La cuantificación relativa del ARNm se realizó utilizando el método $\Delta\Delta$ CT y como control endógeno se utilizó el gen HPLR27, normalizándose los resultados de acuerdo a su expresión. Como muestra calibrador se utilizaron células no tratadas. Las secuencias de los primers que se utilizaron en este experimento fueron:

GEN	sentido	antisentido
HPLR27	CTGGGAAGGTGGTGCTTGTC	TAGCGGTCAATTCCAGCCAC
Rip1k	TGGGCGTCATCATAGAGGAAG	CGCCTTTTCCATGTAAGTAGCA
Caspase 8	ATTTGCCTGTATGCCCGAGC	CCTGAGTGAGTCTGATCCACAC
Caspase 3	AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC	ACAGTCCAGTTCTGTACCACG
PCNA	CCTGCTGGGATATTAGCTCCA	CAGCGGTAGGTGTCTGAAGC

2.3 Exposición de cultivos de células de TCG a 120 μ M de Quercetina a diferentes tiempos: 0 hrs, 4 hrs, 8hrs, 12 hrs y 24 hrs. Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión

PROPÓSITO: Documentar a diferentes tiempos la serie de cambios morfológicos que se presentan antes de las 24 hrs.

Se consideró un grupo control. El grupo control consistió en células cultivadas no expuestas a Quercetina. Este grupo control a su vez se comparó ultraestructuralmente con tejido tumoral del paciente del cual se tomó muestra en fresco para realizar los cultivos primarios. La finalidad de esta valoración fue el comparar las características ultraestructurales entre el tejido neoplásico original del paciente y los cultivos primarios.

METODOLOGÍA:

-Se obtuvo pieza de resección en bloque, en fresco y una vez realizado corte sagital de ésta:

1) Se obtuvieron 5mm³ de tejido que fueron fijados inmediatamente en glutaraldehído y procesados para microscopía electrónica (tejido tumoral del paciente).

2) *Cultivo celular y exposición a quercetina:* Se seleccionaron fragmentos pequeños de aproximadamente 3 mm³. Estos fragmentos se disgregaron mecánicamente usando tijeras y bisturí estériles y una vez que el tejido tuvo una consistencia homogénea y semilíquida, se colocó en frascos de cultivo celular de 162 cm² con DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina / estreptomina al 1%. Las cajas de cultivo se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C con atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5%. El medio se reemplazó cada 3 días hasta que los cultivos fueron confluentes en un 80%. Posteriormente se añadió quercetina a una concentración de 120 μ M en las células experimentales. Las células de control se cultivaron en condiciones idénticas, pero sin la adición de quercetina. Se realizaron recolecciones a diferentes tiempos utilizando un raspador de células.

En el tiempo cero se recolectaron las células justo antes de ser expuestas a quercetina (células no expuestas). Este grupo fue considerado grupo control. En el tiempo 1 se recolectaron las células 4 hrs después de ser expuestas a quercetina. En el tiempo 2 se recolectaron las células 8 hrs después de ser expuestas a quercetina. En el tiempo 3 se recolectaron las células 12 hrs después de ser expuestas a quercetina. El tiempo 4 consistió en la recolección celular 24 hrs después de la exposición a quercetina.

3) *Microscopía electrónica de transmisión*: Las células recolectadas se fijaron con glutaraldehído al 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se realizaron 2 lavados de 10 minutos en buffer de sacarosa-fosfonato y las células se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% (OsO_4) durante 30 minutos bajo una campana, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incluyeron en resina Epon 812. Se realizaron cortes semifinos de media micra y se tiñeron con azul de toluidina. Estos cortes fueron examinados con el microscopio óptico para seleccionar las áreas a ser valoradas. Las áreas seleccionadas se cortaron en secciones delgadas, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron en un microscopio electrónico.

ETAPA 3

3.1 Elaboración de constructos, realización de pruebas de viabilidad y adherencia a los 7 y 14 días en ellos, así como también cortes histológicos.

Ver metodología en artículo titulado “A novel model to culture cells from giant cell tumor of bone using three-dimensional (3D) polycaprolactone scaffold” **Anexo 6**

3.2 Exposición por 24 hrs a quercetina ($120\mu\text{M}$ y $240\mu\text{M}$) y denosumab de constructos y determinación por RT-PCR de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8.

- a) Preparación de los andamios: dentro de la campana de flujo laminar en un pozo de una caja de 6 pozos, las caras laterales e inferior del andamio fueron recubiertas con el pegamento a base de fibrina humana “tisseel” (BAXTER), para así impedir que las células salieran del andamio y favorecer la adhesión de las células al mismo (el pegamento tarda en polimerizar aproximadamente 5 min).
- b) Las células que se obtuvieron de una caja de cultivo de 150 cm^2 , se concentraron por centrifugación en un tubo de fondo cónico de 50 ml, eliminado el sobrenadante se re-suspendieron en $100\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Posteriormente la solución celular se introdujo lentamente por uno de los poros del andamio localizados en la cara superior con la ayuda de una

micropipeta de 200 μ L. Finalmente se cubrió la totalidad del andamio sembrado con células con medio de cultivo (**Fig 26**).



Fig 26 Caja de 6 pozos con medio de cultivo y constructos

- c) Se incubaron los constructos durante una semana, cambiando el medio de cultivo cada tercer día y posteriormente se añadió quercetina a una concentración de 120 μ M. A las 24 hrs de exposición se obtuvieron los constructos: 3 se congelaron a -80°C para determinar posteriormente por PCR-RT la expresión de PCNA, RIP1K, CASPASA3 y CASPASA8 y 8 se fijaron en glutaraldehído para observación por Microscopía electrónica

ETAPA 4

4.1 Implante del constructo en modelo animal (ratones atímicos) y administración de tratamiento

Antes de proceder al implante de los constructos en el modelo animal, se prepararon 30 constructos de acuerdo a la descripción de los puntos a y b del procedimiento 3.2.

Previo autorización por el CICUAL (**Anexo 3**) se emplearon 24 ratones atímicos, heterocigotos, nu/nu, cepa CD1, machos, jóvenes adultos, de 9 meses de edad y 30g. de peso.

Bajo técnica estéril (en una campana de flujo laminar, clase II, en el cuarto de inmunocomprometidos del bioterio del INR), se utilizó anestesia general en los ratones empleando isofluorano al 4% (**Fig 27**)

Una vez anestesiado el ratón, se realizó antisepsia de la región dorso-torácica con cotonetes estériles y yodo Povidona. Se realizó incisión con una hoja de bisturí del

número 15, de aproximadamente 1 cm de longitud. La incisión abarcó piel y tejido celular subcutáneo; se disecó piel y tejido subcutáneo formando una “bolsa”(Fig 28). Posteriormente se seleccionó el constructo (Fig 29) y con la finalidad de anclarlo a músculo se introdujo aguja e hilo de sutura en el mismo (Fig 30).



Fig 27 Anestesia de ratón con isofluorano



Fig 28 Disección de piel y tejido celular subcutáneo

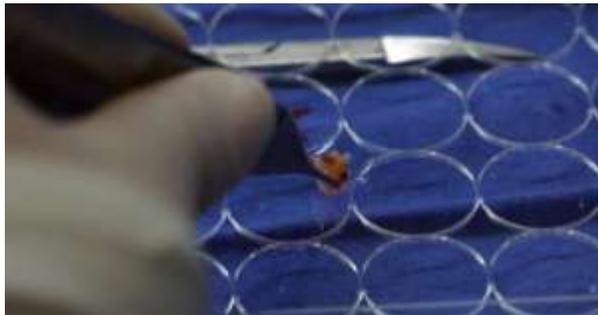


Fig 29 Selección del constructo

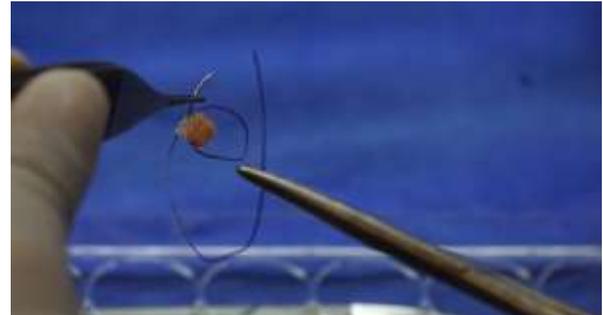


Fig 30 Preparación del constructo para anclaje

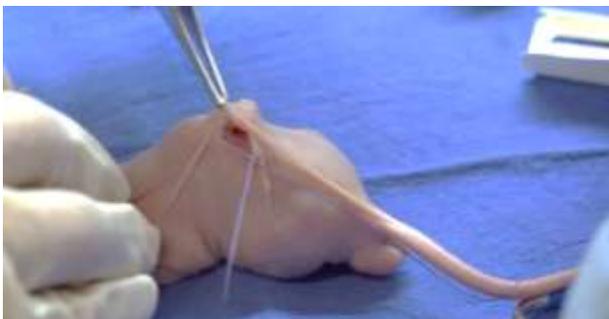


Fig 31 Anclaje del constructo a tejido muscular



Fig 32 Cierre de la herida quirúrgica

El constructo se ancló a tejido muscular subyacente para posteriormente ser cubierto con la piel del ratón (Fig 31). Al término de la implantación la herida se cerró en un solo plano con puntos en U con nylon 4-0 (Fig 32). Al final se limpió la herida con gasas estériles y solución salina.

Una vez con los andamios implantados, se esperó una semana para iniciar el tratamiento. Se colocaron los ratones en cajas con alimento y agua (**Fig 33**) y se etiquetaron para su correcta identificación



Fig 33 ratones atómicos con constructos implantados

4.2 Administración del tratamiento

La administración de cada uno de los tratamientos fue intraperitoneal, con aguja de insulina.

Grupo 1 Se administró .15 ml de solución fisiológica cada tercer día

Grupo 2 Se administró una sola dosis de denosumab de acuerdo a su peso

Grupo 3 Se administró .15 ml de quercetina cada tercer día

4.3 RT-PCR

Se utilizaron los mismos procedimientos empleados en el paso 2.3

RESULTADOS

Etapa 1

1. Obtención de tejido tumoral, cultivo y criopreservación

Se obtuvo tejido tumoral de 5 pacientes. De estas 5 muestras iniciales, se eliminaron 2 por contaminación de los cultivos durante la expansión de los mismos quedando 3 muestras de pacientes.

Las muestras de estos 3 pacientes se criopreservaron para ser utilizadas en etapas futuras del proyecto (**Fig 34**). En cada criovial se guardaron 1×10^6 células. Y se obtuvo un total de 43×10^6 células.

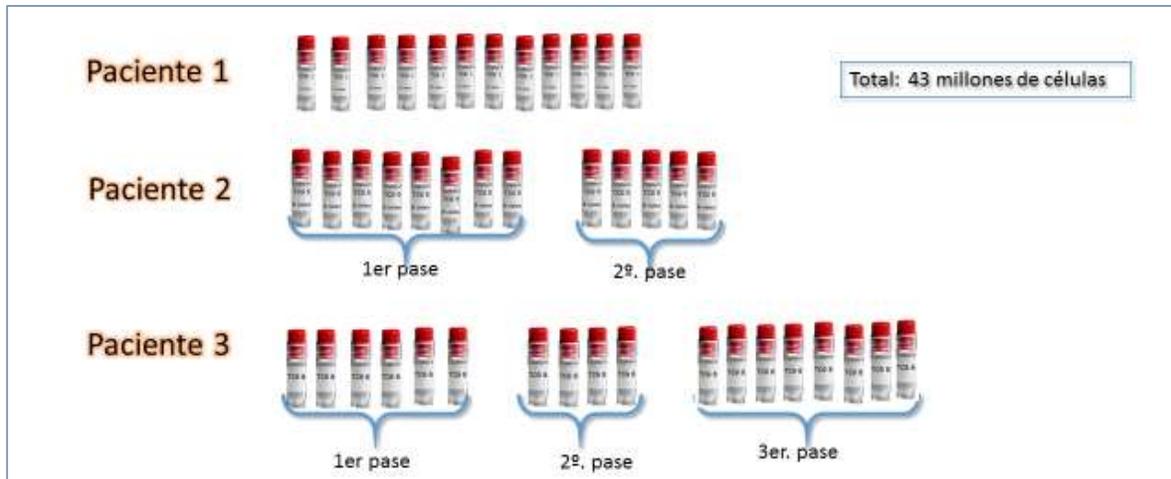


Fig 34 crioviales con células de TCG

Posteriormente se obtuvo tejido de otros 3 pacientes. De cada paciente se seleccionaron 5 fragmentos de 5mm^3 y se realizó cultivo en cajas de cultivo de 175cm^2 (total de 25 cajas). Estas células se utilizaron sin realizar pases para los experimentos de las etapas 2 y 3.

2. Determinación de la DL50 de la quercetina en células de tumor de células gigantes de hueso.

El valor de la densidad óptica obtenido en la lectura se expresó en una gráfica como el promedio de los valores.

Observándose en las lecturas de la densidad óptica una diferencia mayor entre el DMSO (control) a $120\mu\text{M}$ y la quercetina a $120\mu\text{M}$. Por lo que se consideró $120\mu\text{M}$ como la DL50 de la quercetina. (**Fig 35**)

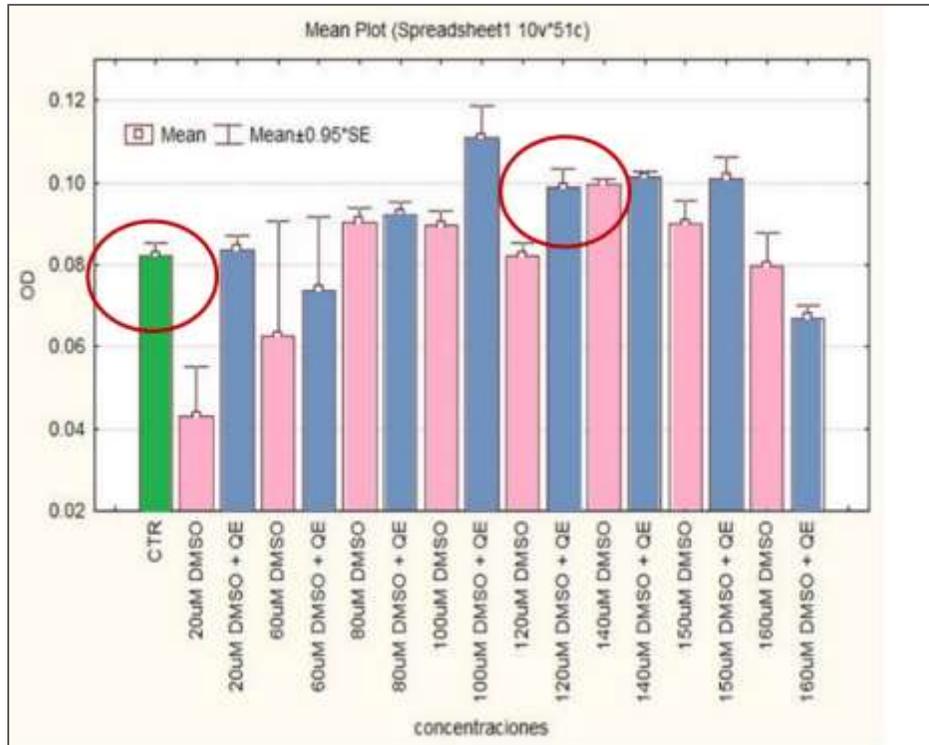


Fig 35 Gráfica con promedios de densidades ópticas a diferentes concentraciones de quercetina

2) Determinación de viabilidad celular en cultivos 2D expuestos 24 hrs a 120µM Quercetina

A las 24 hrs de exposición se observó un 41.5% de reducción en la viabilidad celular con una diferencia entre las medias estadísticamente significativa ($p=0.000011$) (Fig 36)

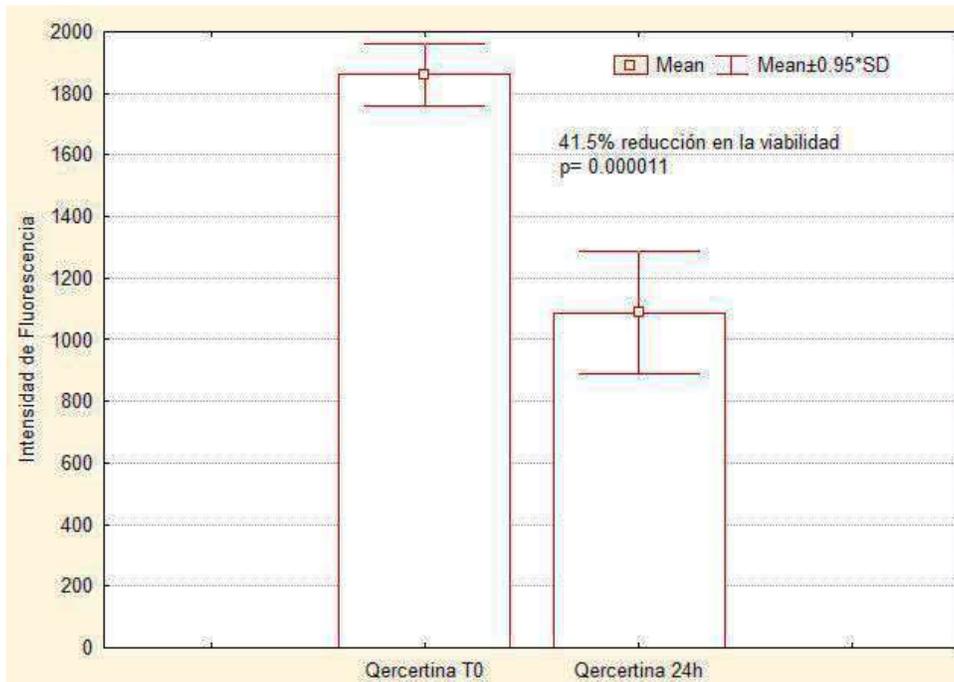


Fig 36 Gráfica que muestra la intensidad de fluorescencia en el tiempo 0 y 24 hrs después

La intensidad de la fluorescencia se documentó fotográficamente, observándose una diferencia cualitativa entre el tiempo cero (**Fig 37 a**) y a las 24 hrs de exposición a quercetina (**Fig 37 b**)

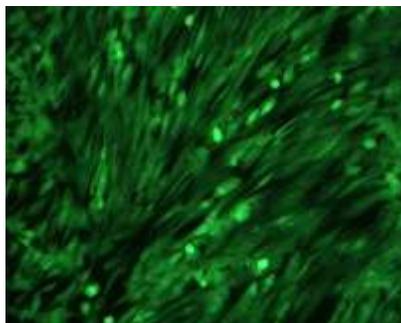


Fig 37a Intensidad de fluorescencia
Tiempo Cero (Calceína)

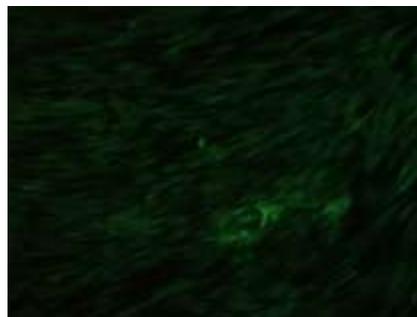


Fig 37b Intensidad de fluorescencia 24
hrs después (Calceína)

ETAPA 2

2.1 Exposición de cultivos de células de TCG a 120mM de Quercetina por 24 hrs y su valoración por PCR y Microscopía Electrónica de Transmisión

Los resultados se encuentran en el Artículo “ ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN GIANT CELL TUMOR OF BONE CULTURED CELLS EXPOSED TO QUERCETIN” (**Anexo 6**)

2.2 Exposición de cultivos de células de TCG a 240μM de Quercetina por 24 hrs y su valoración por PCR

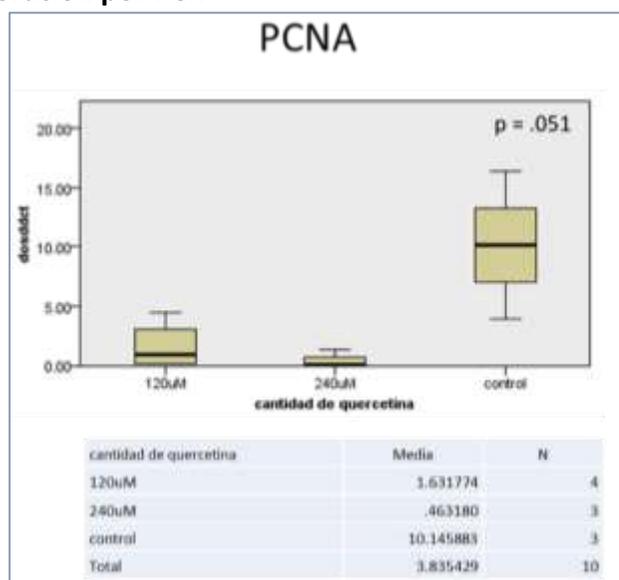


Fig 38 Expresión de PCNA en cultivos 2D con diferentes concentraciones de Quercetina

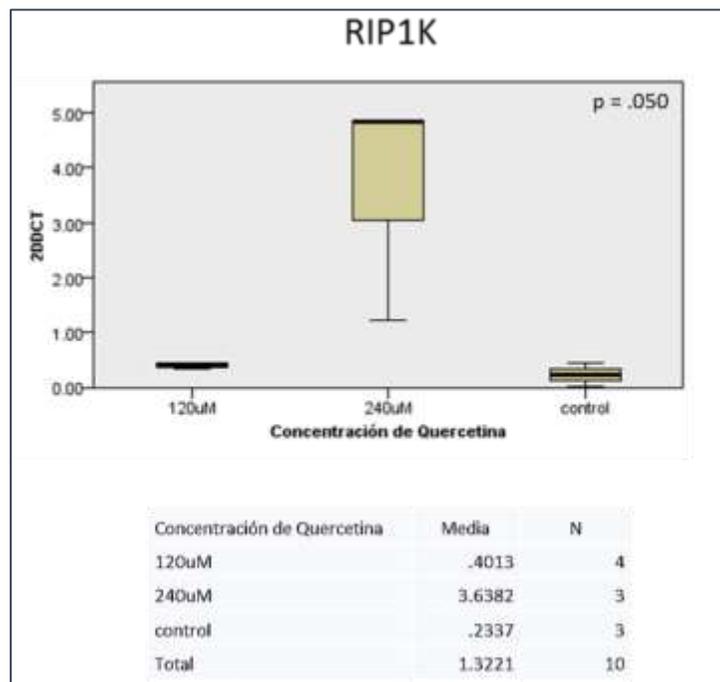


Fig 39 Expresión de RIP 1K en cultivos 2D a diferentes concentraciones de Quercetina

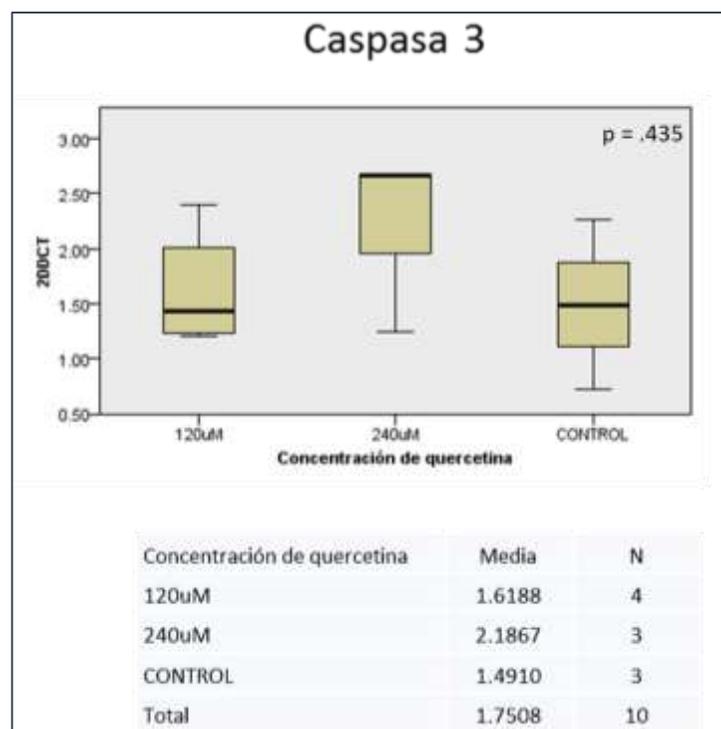


Fig 40 Expresión de Caspasa 3 en cultivos 2D de tumor de células gigantes a diferentes concentraciones de Quercetina

2.3 Exposición de cultivos de células de TCG a 120mM de Quercetina a diferentes tiempos: 4 hrs, 8hrs, 12 hrs y su valoración por Microscopía Electrónica de Transmisión

Tejido del paciente: Se observan 2 tipos de células. Unas son de citoplasma claro y otras son de citoplasma denso. Este citoplasma se observa tanto en las células mononucleadas como en las multinucleadas, aunque las características nucleares son iguales en algunos casos y en otros son diferentes también (**Fig 41**). Se observan uniones intercelulares. Se observan células cuyas prolongaciones se encuentran rodeando parcialmente o casi completamente a otras células

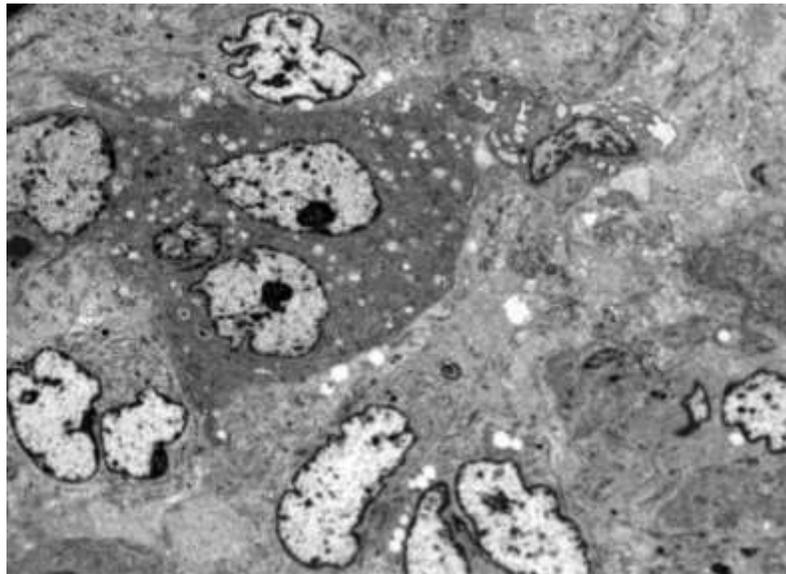


Fig 41 Ultraestructura de tumor de células gigantes de hueso (TEJIDO). Se observan núcleos claros, algunos con nucléolo notorio. Hay células con citoplasma ópticamente claro y otras con citoplasma más denso

Cultivo 2D Tiempo 0:

Las características observadas en el tejido del paciente y en las células del tiempo cero, son muy semejantes. Se encuentran células multinucleadas y células mononucleadas, con citoplasmas de diferentes densidades (**Fig 42**).

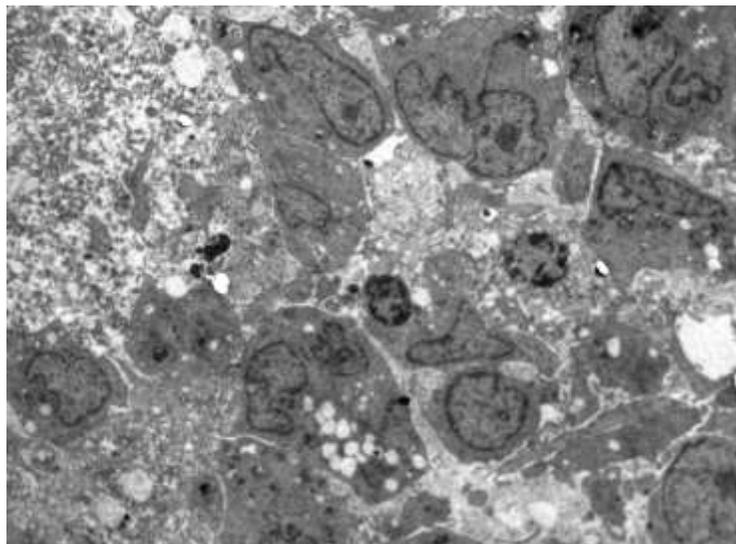


Fig 42 Ultraestructura de células de TCG obtenidas en tiempo cero. Es decir, sin ser sometidas a tratamiento con quercetina

Cultivo 2D 4hrs: A las 4 hrs de exposición, se inicia la observación de células con citoplasmas claros y presencia de vacuolas en el mismo. Sin embargo la mayor parte de la población celular se encuentra viable aparentemente. Se observan además cristales (**Fig 43**).

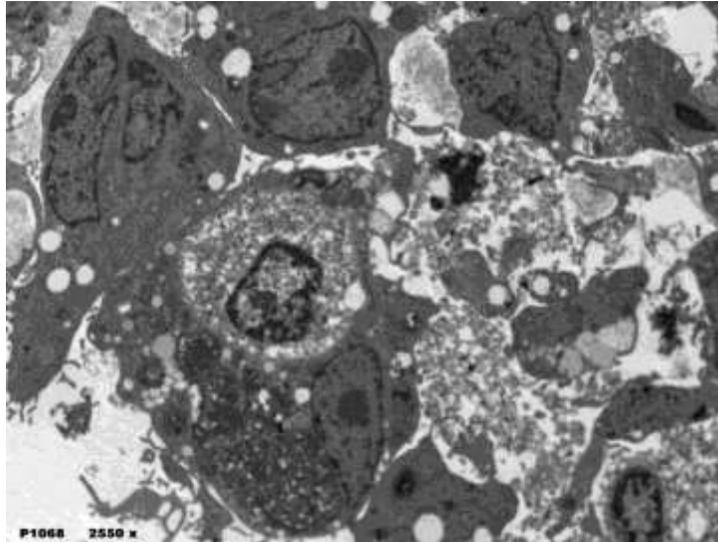


Fig 43 Ultraestructura de células cultivadas con 4 hrs de exposición a la quercetina

Cultivo 2D 8hrs: A las 8 hrs se observan células viables. En el cultivo se observa la presencia de cristales tanto intracelulares como extracelulares (**Fig. 44**).

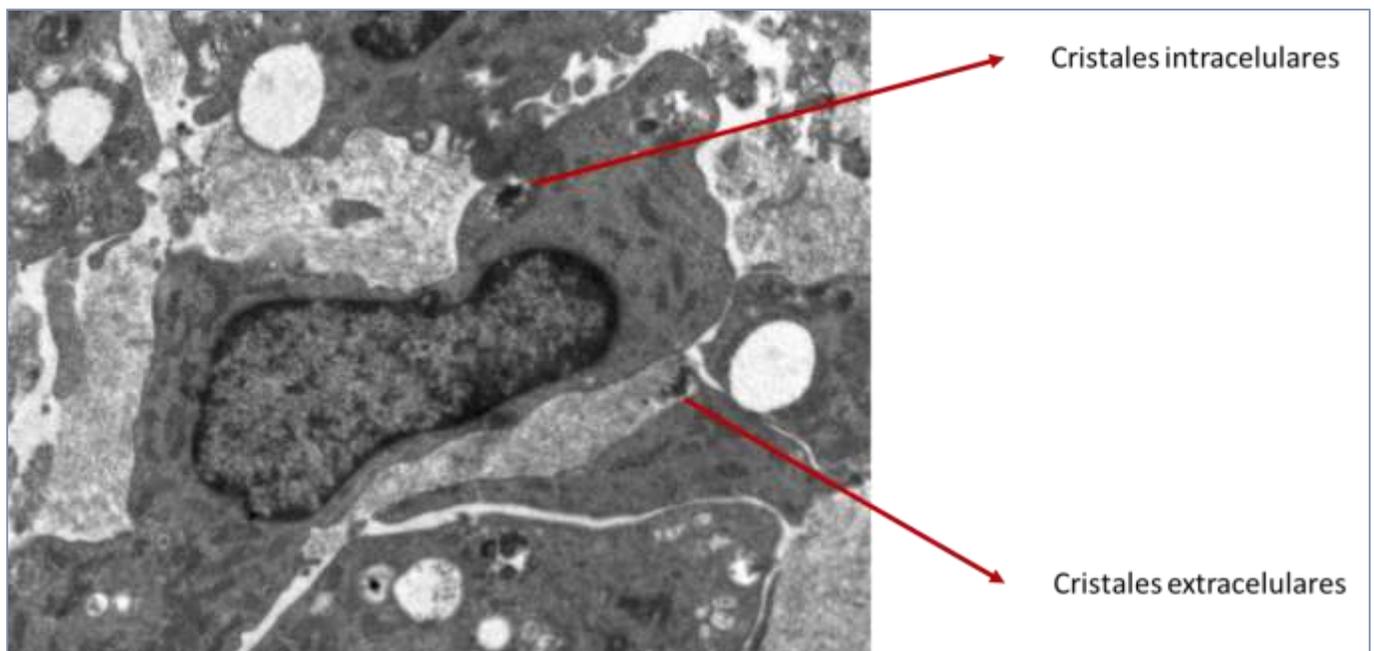


Fig 44 A las 8 hrs se observan múltiples cristales en el citoplasma de las células tanto mononucleadas como multinucleadas

Cultivo 2D 12 hrs: A las 12 hrs de exposición se observa una mayor cantidad de células con datos de necrosis y pocas células con conservación de su estructura. En estas últimas se observan cristales intracitoplasmáticos de quercetina (**Fig 45**)

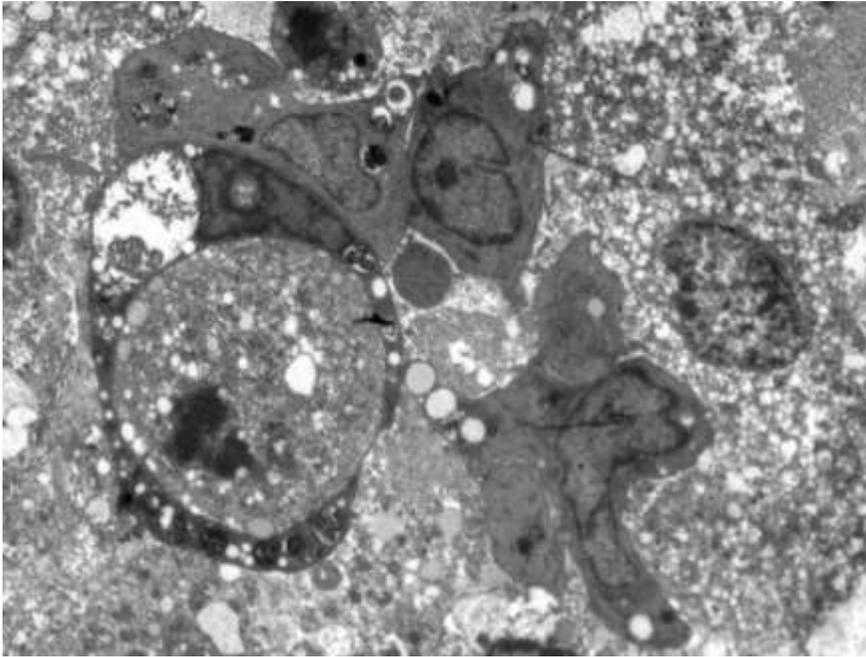
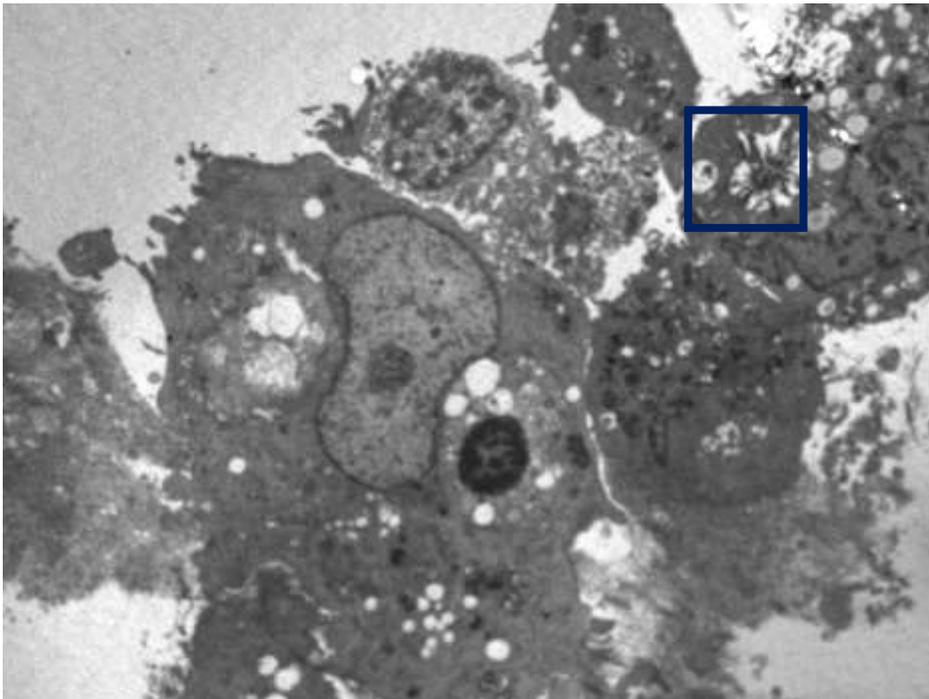


Fig 45 A las 12 hrs de exposición a la quercetina se observan múltiples vacuolas en el citoplasma de las células

Cultivo 2D 24 hrs de exposición: En este tiempo de observación la mayor parte de las



células no se encuentran viables. Las zonas donde hay células aún viables, muestran cristales (**Fig 46**).

Fig 46 Ultraestructura de zonas con células viables a las 24 hrs de exposición con quercetina. Se observan cristales intracitoplasmáticos

Al realizar la medición de estos cristales intracitoplásmicos (**Fig 47**) observamos que estos cristales miden más de 1000 nm de eje mayor (**Fig 48**).

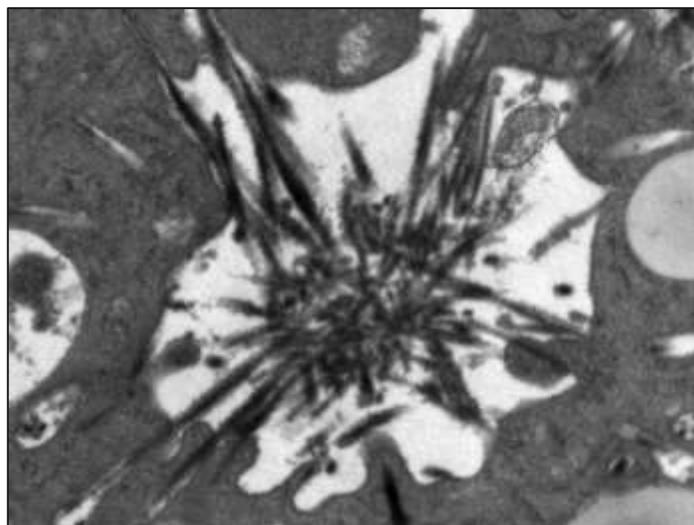


Fig 47 Detalle del recuadro de la Fig 46 mostrando cristal de quercetina, localizado en el citoplasma, a mayor aumento

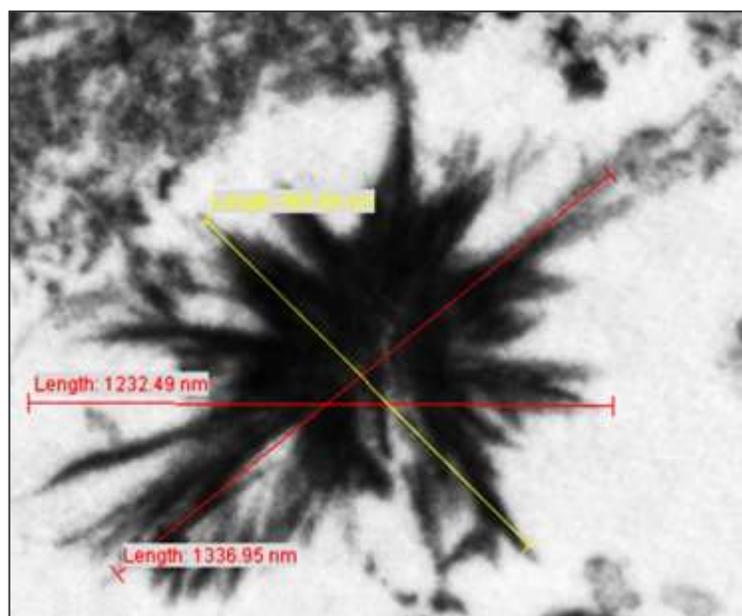
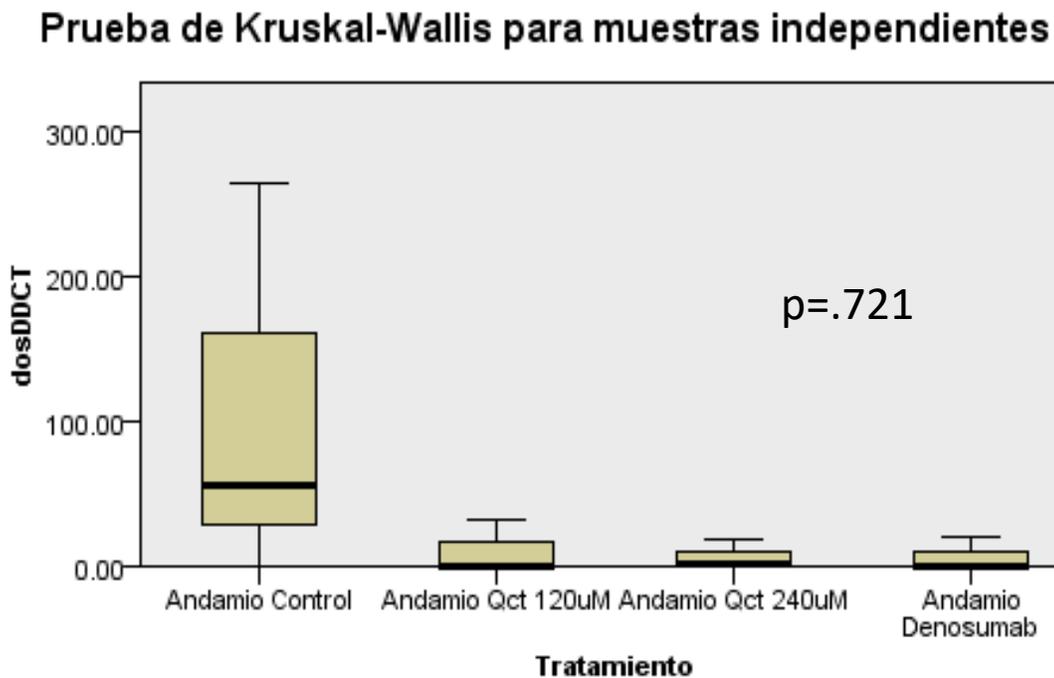


Fig 48 Cristal de quercetina con medidas, las cuales son de 1336.65 nm de eje mayor

ETAPA 3

- Los resultados en la determinación por RT-PCR de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8 en constructos expuestos por 24 hrs a 120 μ M, 240 μ M de quercetina y denosumab (modelo 3D in vitro) se muestran en las **Fig 49**, **Fig 50**, **Fig 51** y **Fig 52**.

PCNA



GRUPO	Media	N	Desviación estándar	Mediana
Andamio Control	107.2333	3	139.76424	56.4000
Andamio Qct 120uM	10.8000	3	18.44695	.3000
Andamio Qct 240uM	6.6000	3	9.58958	2.2000
Andamio Denosumab	7.0000	3	11.77795	.2000
Total	32.9083	12	75.28074	1.2500

Fig 49 Expresión dePCNA en modelos 3D in vitro

RIP1 K

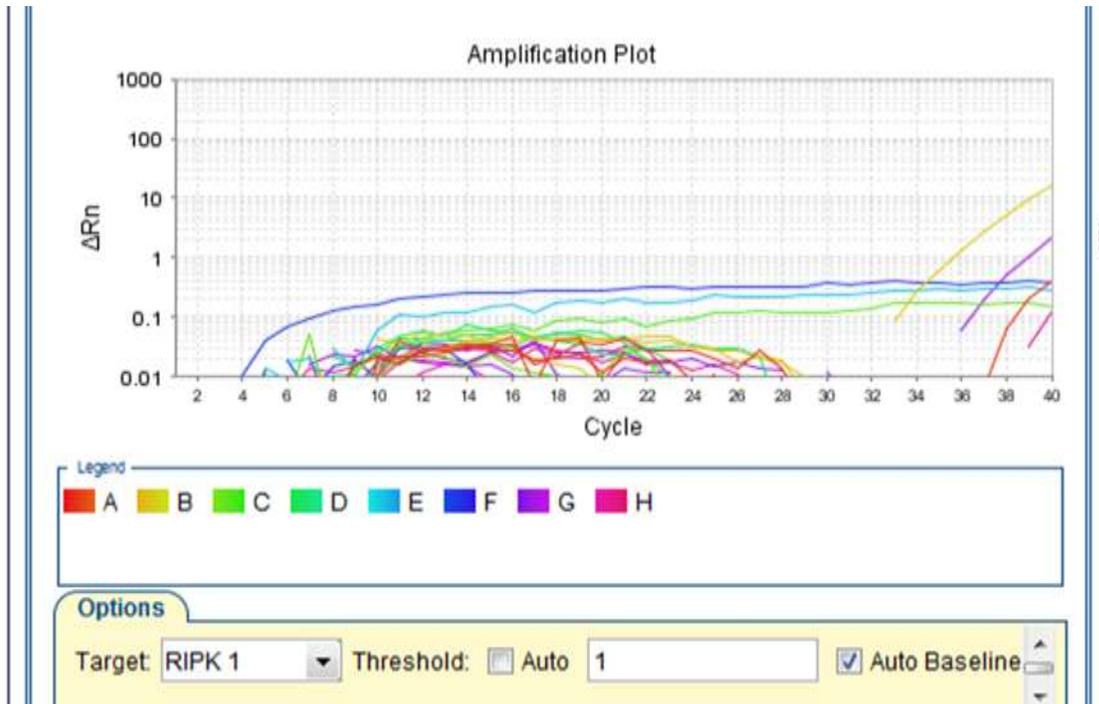


Fig 50 Se observa en esta gráfica que RIP1 K no amplificó

Caspasa 8

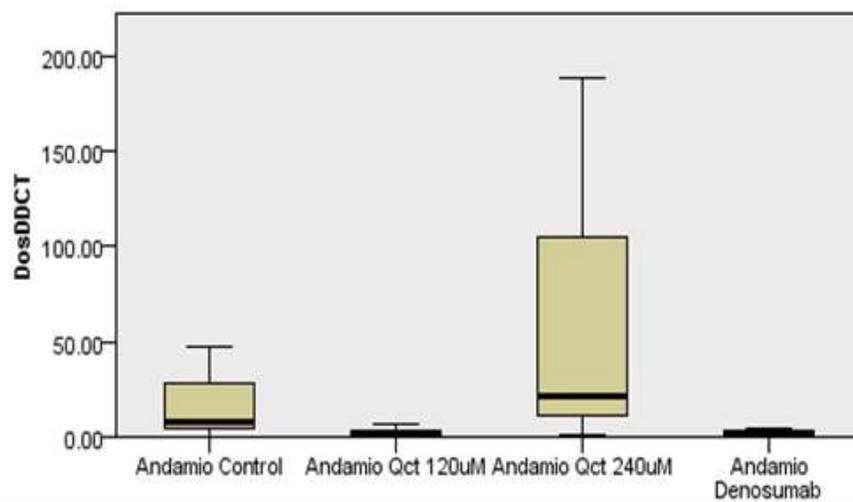
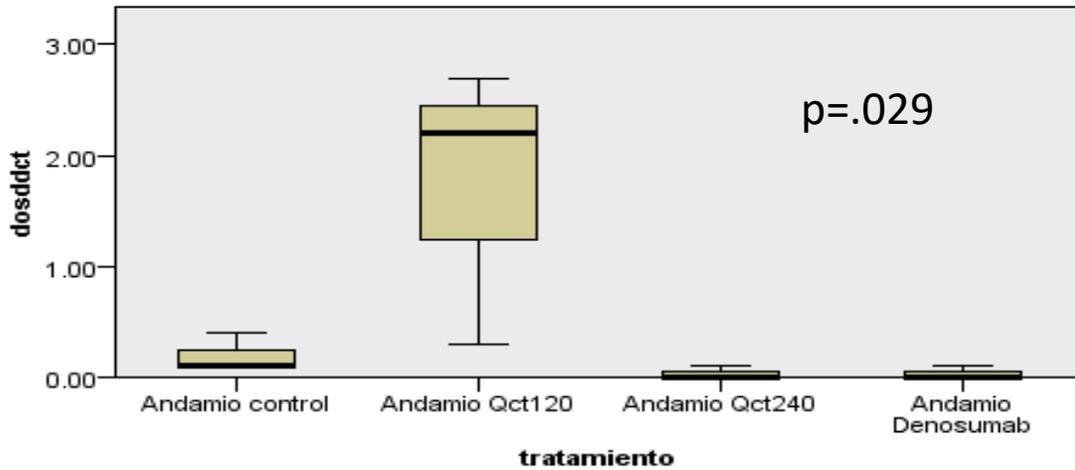


Fig 51 Expresión de Caspasa 8 en modelos 3D in vitro

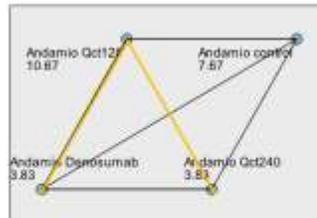
EXPRESIÓN DE CASPASA 3 MODELO 3D IN VITRO

Caspasa 3



GRUPO	Media	N	Desviación estándar	Mediana
Andamio control	.2000000	3	.17320508	.1000000
Andamio Qct120	1.7333333	3	1.26622799	2.2000000
Andamio Qct240	.0333333	3	.05773503	.0000000
Andamio Denosumab	.0333333	3	.05773503	.0000000
Total	.5000000	12	.92539918	.1000000

Comparaciones por parejas de tratamiento



Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
Andamio Qct240-Andamio Denosumab	.000	2.839	.000	1.000	1.000
Andamio Qct240-Andamio control	3.833	2.839	1.350	.177	1.000
Andamio Qct240-Andamio Qct120	6.833	2.839	2.407	.016	.097
Andamio Denosumab-Andamio control	3.833	2.839	1.350	.177	1.000
Andamio Denosumab-Andamio Qct120	6.833	2.839	2.407	.016	.097
Andamio control-Andamio Qct120	-3.000	2.839	-1.057	.291	1.000

Fig 52 Expresión de Caspasa 3 en modelos 3D in vitro

ETAPA 4

Implante del constructo en modelo animal (ratones atómicos) y tratamiento con quercetina o denosumab

El modelo animal presentó varios eventos inesperados y en consecuencia se perdieron muestras para análisis. Los eventos fueron los siguientes:

- 2 ratones murieron por sobredosis de anestesia
- En 1 ratón se abrió la herida quirúrgica a las 8 hrs posteriores a la cirugía. Se volvió a implantar el constructo y hubo de nuevo pérdida del mismo. Este ratón se dio por perdido
- Del grupo de ratones tratados con quercetina hubo 3 pérdidas. Con la finalidad de no continuar perdiendo ratones del grupo experimental, se dio por terminado el experimento a los 7 días después de haber iniciado el tratamiento (**Fig 53**).

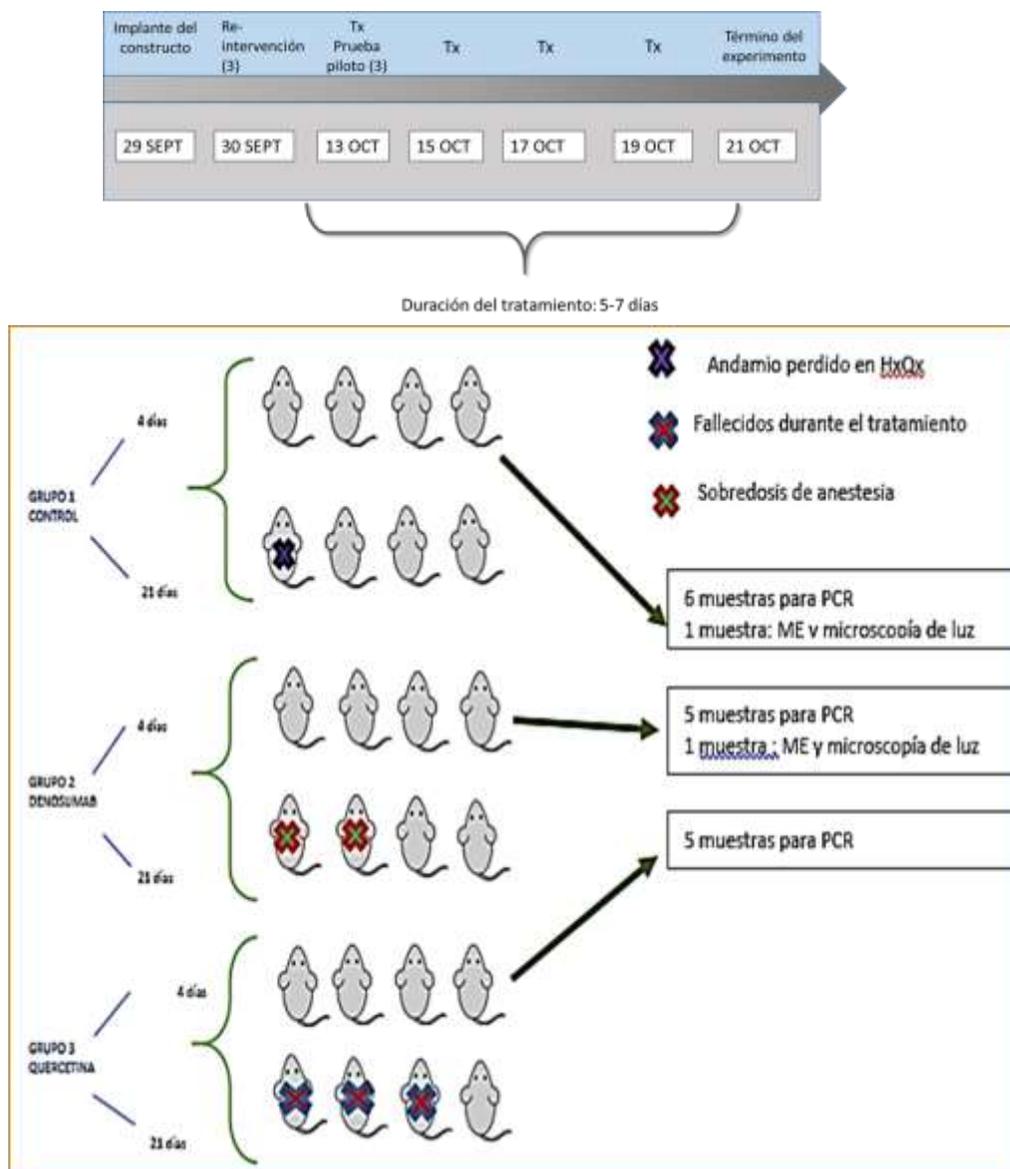


Fig 53 Grupos de ratones y eventualidades surgidas durante el experimento

En aquellos ratones que fallecieron durante el experimento se realizó autopsia, así como también en aquellos que se realizó eutanasia, revisando la cavidad peritoneal, así como también tomando fragmentos representativos de riñón y de hígado.

En los ratones que recibieron tratamiento con quercetina y que fallecieron se encontró en la cavidad peritoneal depósito de ésta (**Fig 54a**). A diferencia de aquellos ratones que recibieron tratamiento con quercetina y que no fallecieron, en los que no se observó quercetina en la cavidad peritoneal (**Fig 54b**). Se realizaron improntas del material presente en cavidad peritoneal y se observó el material presente en cavidad peritoneal en microscopio de luz (**Fig 55a y 55b**) Se tomaron muestras también de hígado y de riñón de ambos grupos, sin observar diferencias en los cortes histológicos.

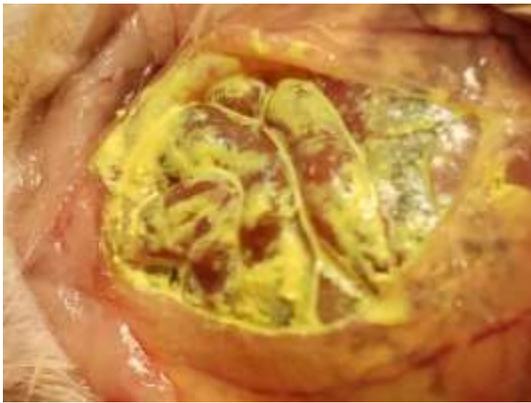


Fig 54a Cavidad peritoneal en ratones expuestos a quercetina y fallecidos



Fig 54b Cavidad peritoneal en ratones expuestos a quercetina sacrificados al momento de dar por terminado el experimento

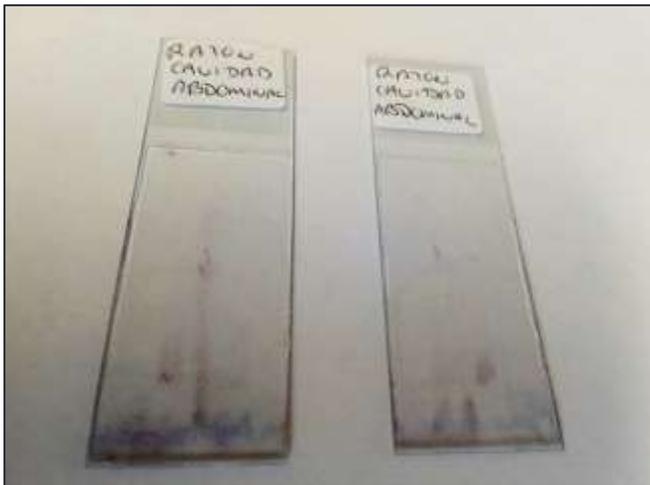


Fig 55a improntas de cavidad peritoneal de ratones fallecidos y tratados con quercetina

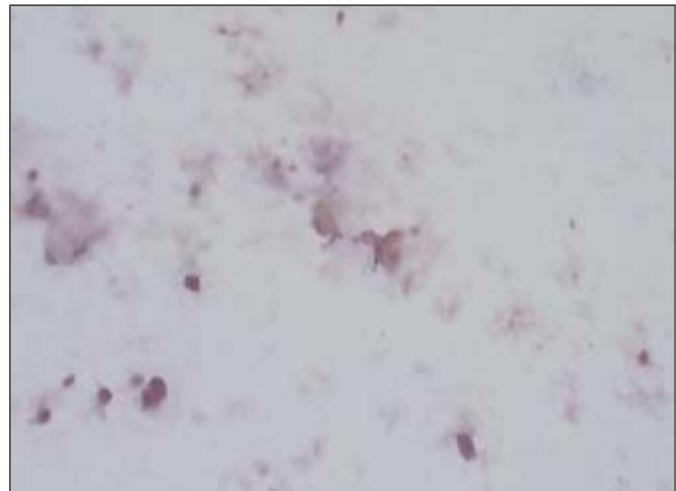


Fig 55b En la citología se observa depósito y/o acúmulo de material. No hay neutrófilos ni linfocitos en la citología.

Corte histológico de constructo con células de TCG implantado en ratón atímico

En los cortes histológicos realizados de los constructos implantados en los ratones atímicos pertenecientes al grupo control, se observaron entre las cavidades que correspondieron a las fibras de policaprolactona del andamio, zonas con los componentes histológicos del tumor de células gigantes de hueso, es decir células gigantes multinucleadas, células de núcleos ovalados (estromales) y monocitos (**Fig 56**) .

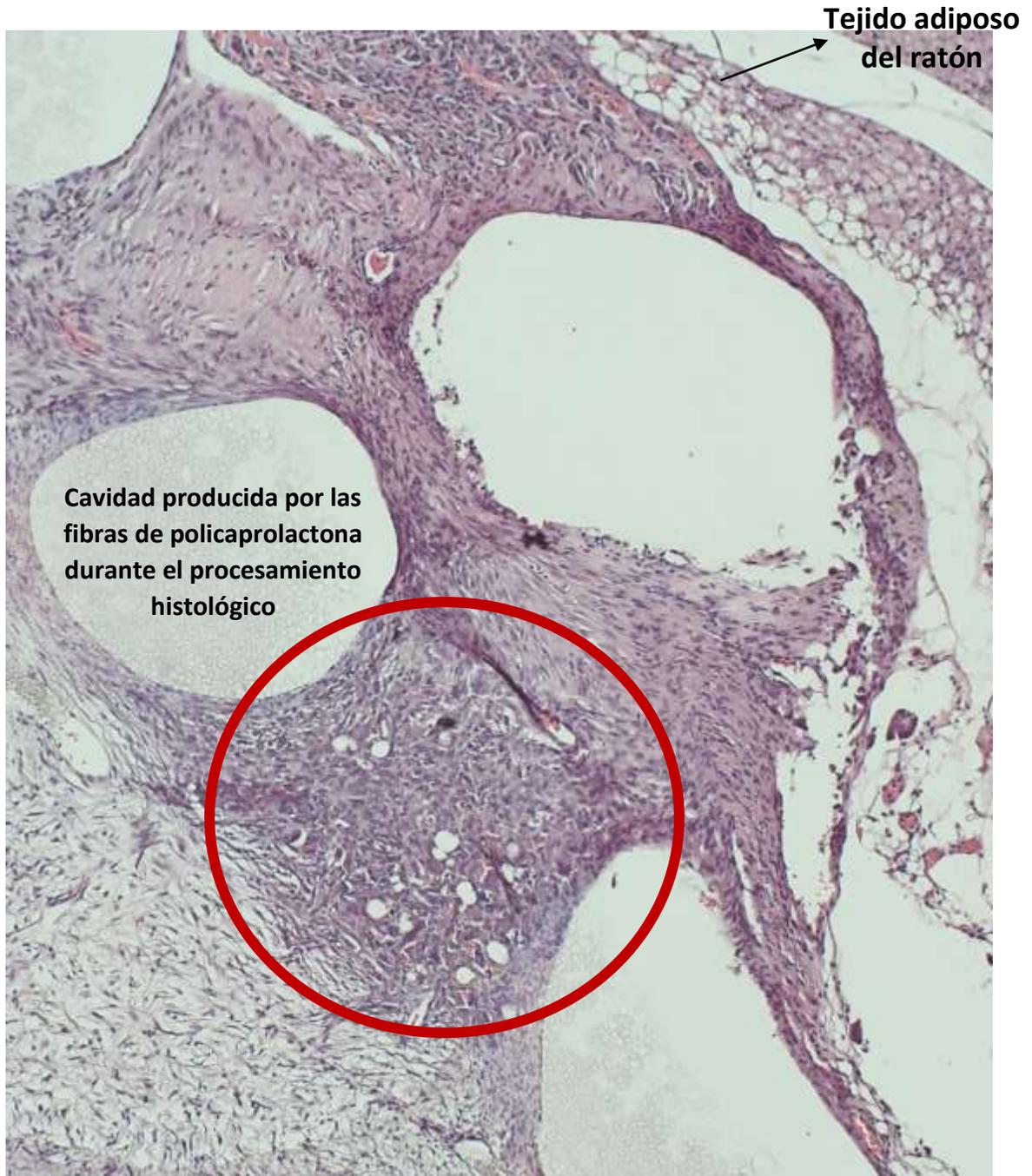


Fig 56 Corte histológico de Constructo

A un mayor acercamiento de la zona que se encuentra adentro del círculo de color rojo, se pueden observar células con múltiples núcleos y que corresponden a las células gigantes multinucleadas. Se observan también células de núcleos pequeños, que corresponden a los monocitos, así como también células de núcleos ovalados, cuyos núcleos presentan características muy semejantes a los núcleos de las células gigantes multinucleadas. Estas últimas células corresponden a las células estromales. Se observan también estructuras tubulares con eritrocitos en su luz, siendo interpretadas como capilares (**Fig 57**).

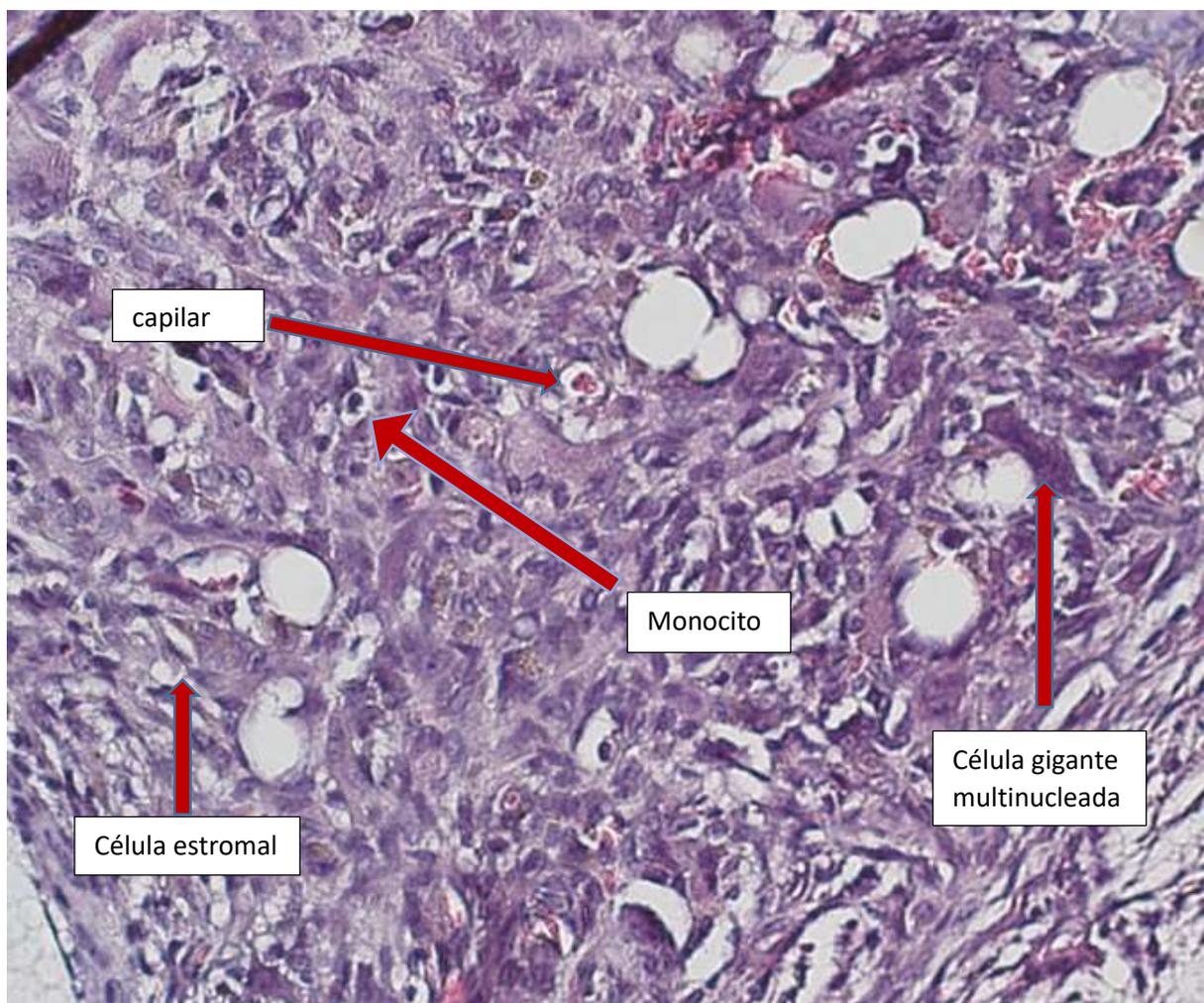


Fig 57 Acercamiento de zona del constructo implantado en ratón de grupo control, que muestra los componentes histológicos de un tumor de células gigantes

Expresión de PCNA en modelo animal

La expresión de PCNA en el grupo de ratones control fue de 1.8, expresándose 2.2 veces más en los ratones que recibieron tratamiento con quercetina y 5.7 veces más en los ratones que recibieron tratamiento con denosumab. Las diferencias observadas entre estos 3 grupos, no fueron estadísticamente significativas (**Fig 58**).

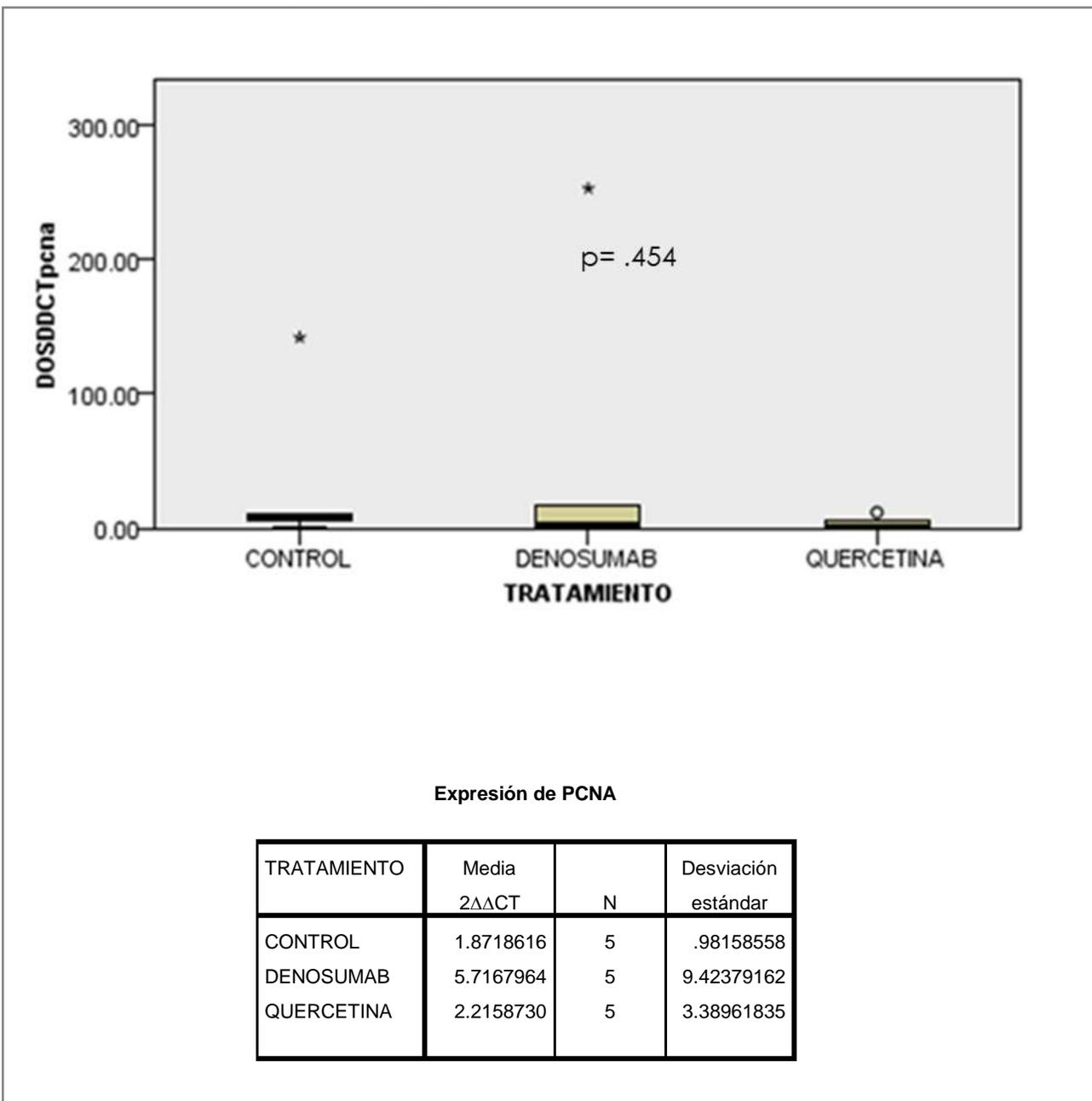


Fig 58 Resultados de expresión de PCNA en modelo animal

Expresión de RIP1K en modelo animal

La expresión de RIP1K en el grupo de ratones control fue de 1.4, siendo la expresión de RIP1K en el grupo de ratones que recibieron como tratamiento quercetina menor. La expresión de RIP1K en el grupo de ratones que recibieron denosumab fue casi igual que en el grupo control (**Fig 59**). Estas diferencias en la expresión no fueron estadísticamente significativas.

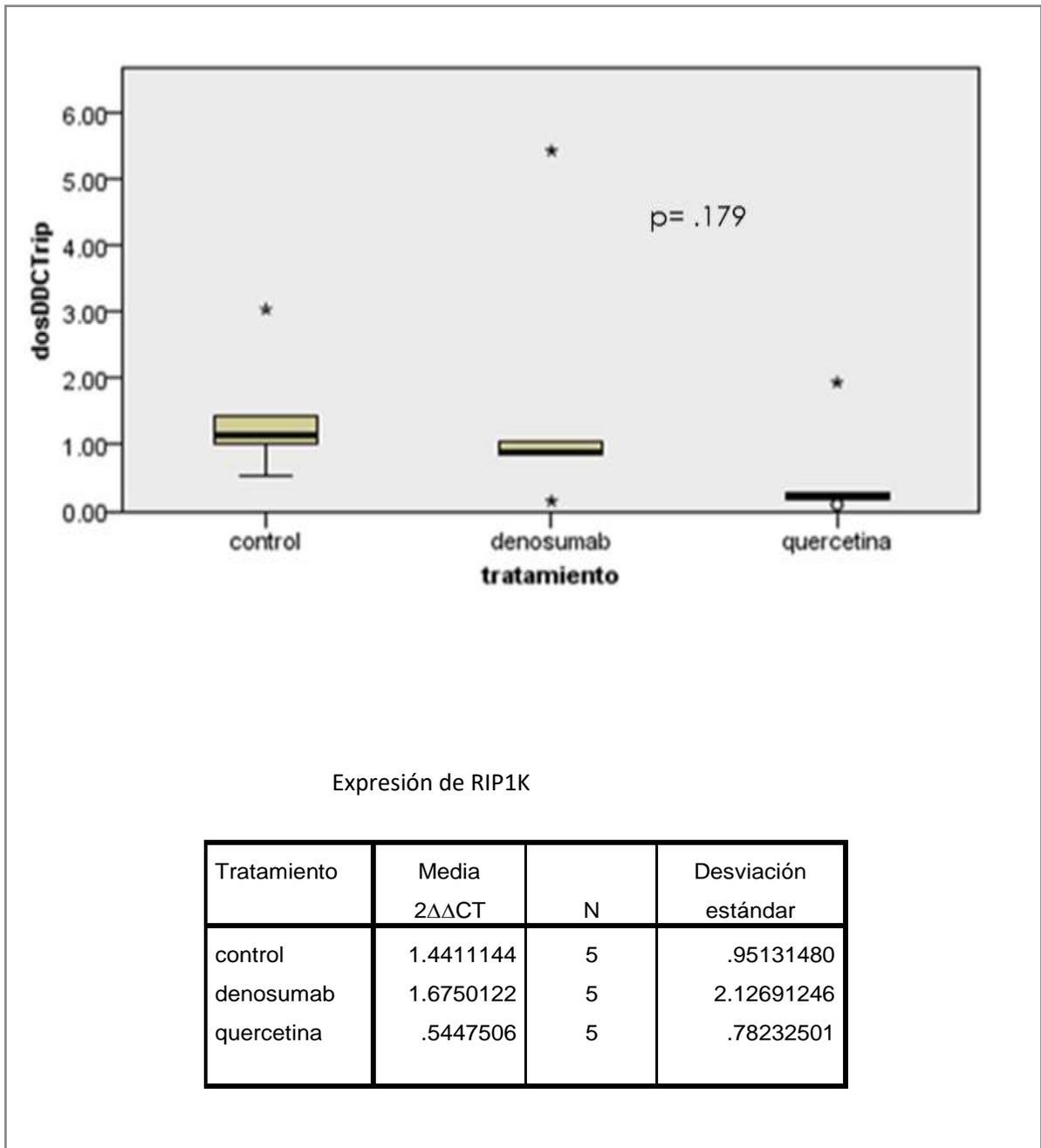


Fig 59 Resultados de expresión de RIP1K en modelo animal

Expresión de Caspasa 3 en modelo animal

Caspasa 3 se expresó en el grupo de ratones tratados con denosumab 4.8 veces más que en el grupo control, mientras que en el grupo tratado con quercetina se expresó casi la mitad que en el grupo control. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Fig 60**).

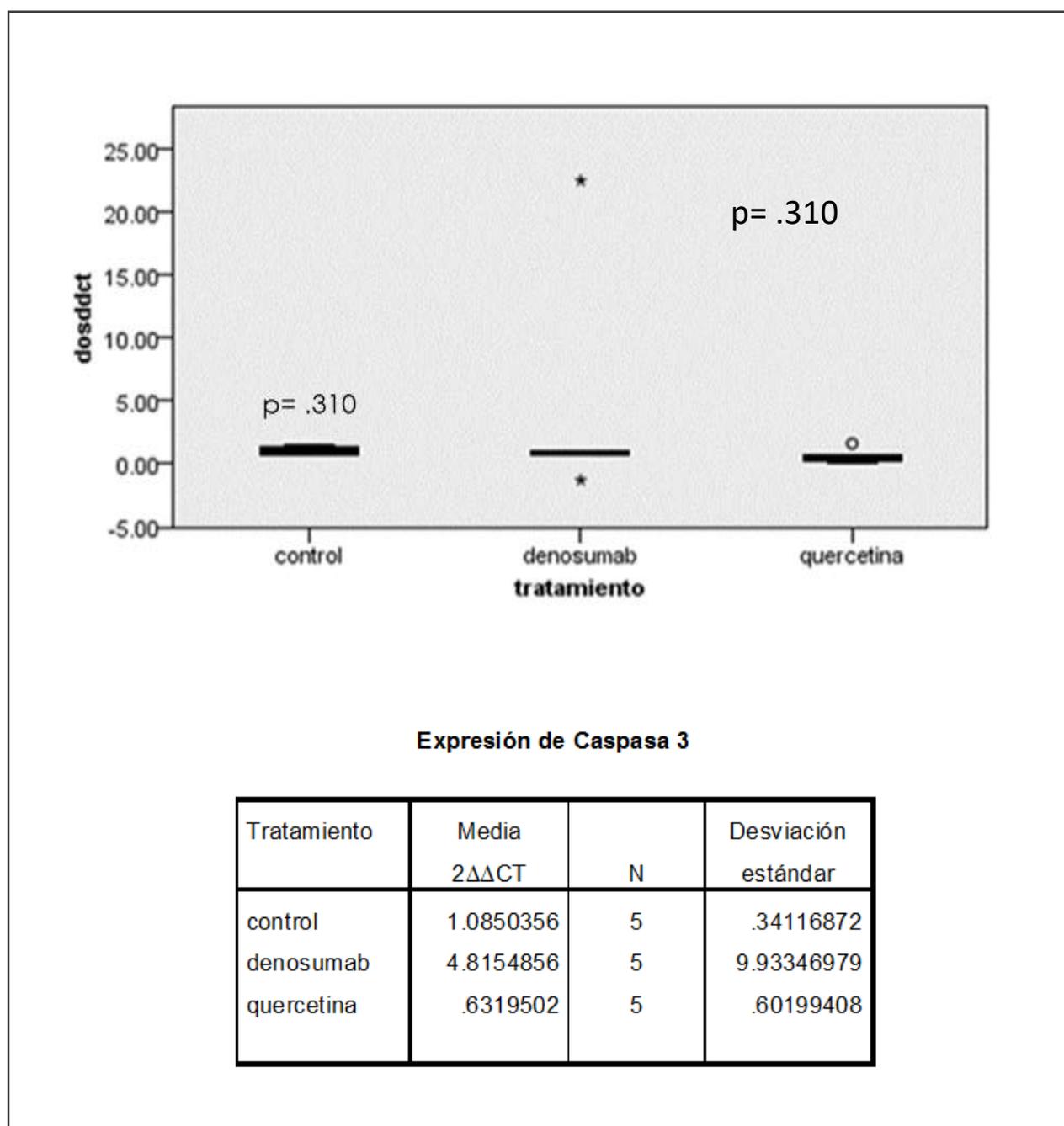


Fig 60. Resultados de expresión de Caspasa 3 en modelo animal

Expresión de Caspasa 8 en modelo animal

La expresión de Caspasa 8 fue mayor en el grupo de ratones tratados con Denosumab, siendo casi del doble en relación al grupo control y el grupo de quercetina. Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas (**Fig 61**).

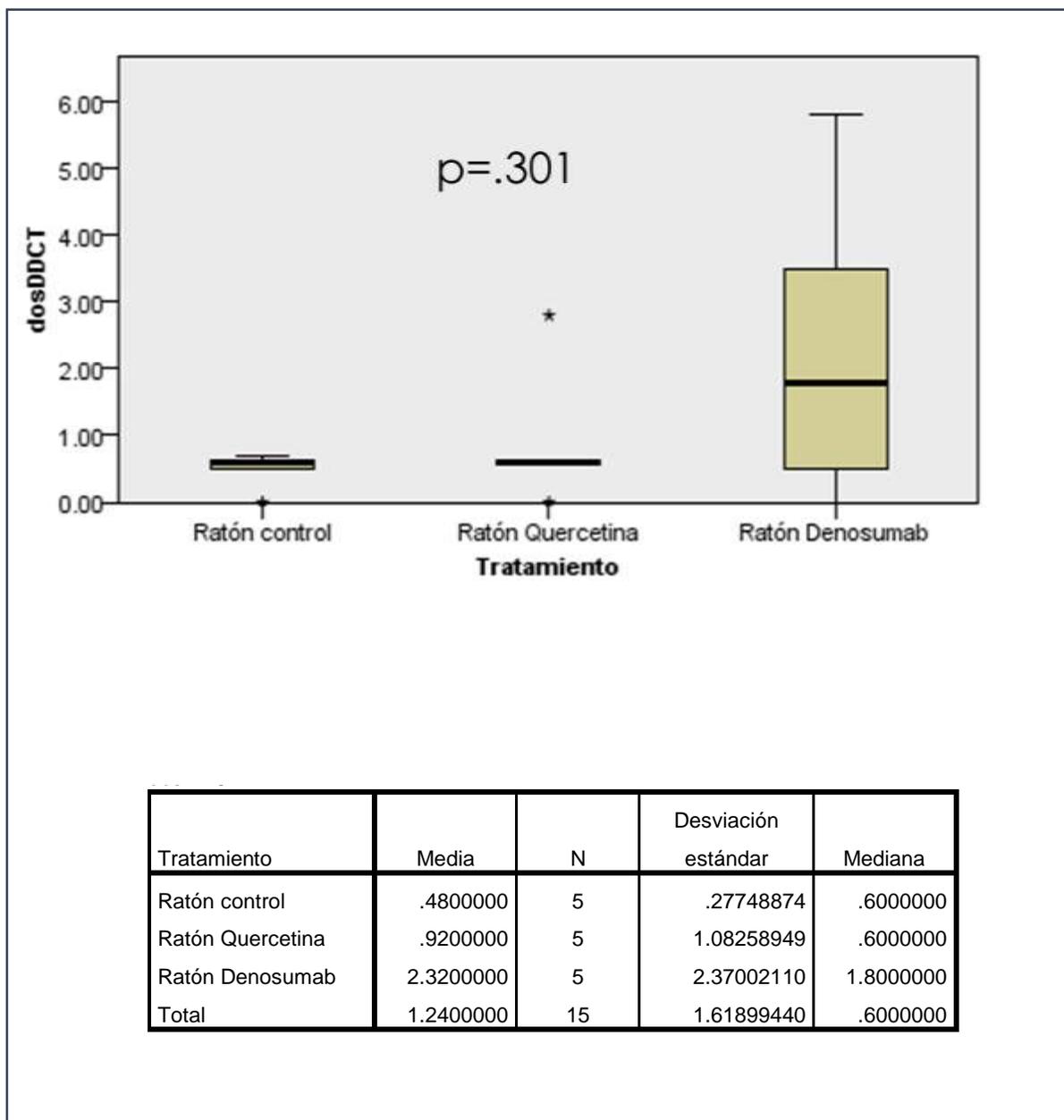


Fig 61. Resultados de expresión de expresión de Caspasa 8 en modelo animal con implante

Expresión de PCNA, RIP1K y Caspasa 3 en cultivos 2D y modelo animal.

En los cultivos 2D se observó una mayor expresión de Caspasa 3 y de RIP1K en comparación con los modelos animales, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. La expresión de PCNA en el modelo 2D fue de 1.9725 y en el modelo animal fue de .7167, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa (**Fig 62**).

Expresión de PCNA				P=.343
tipo de modelo	Media	N	Desviación estándar	
cultivo 2D	1.97259250	4	1.697635655	
ratones	.71671500	4	.622340822	

Expresión de RIP1K				P=.029
tipo de modelo	Media 2 $\Delta\Delta$ CT	N	Desviación estándar	
cultivo 2D	.4013077	4	.05209276	
ratones	.1959370	4	.07007212	

Expresión de Caspasa 3 en cultivos 2D y modelo animal				p=.029
tipo de modelo	Media 2 $\Delta\Delta$ CT	N	Desviación estándar	
cultivo 2D	1.6187572	4	.55300888	
ratones	.3824560	4	.26107708	

Fig 62 expresión de PCNA, RIP1K y Caspasa 3 en cultivos 2D (120 mM) y modelo animal

Expresión de PCNA en modelo 2D, 3D in vitro y animal

Al comparar la expresión de PCNA entre los 3 modelos utilizados, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, siendo la expresión de PCNA 3 veces mayor en el modelo animal en comparación con el modelo 2D (**Fig 63 A**).

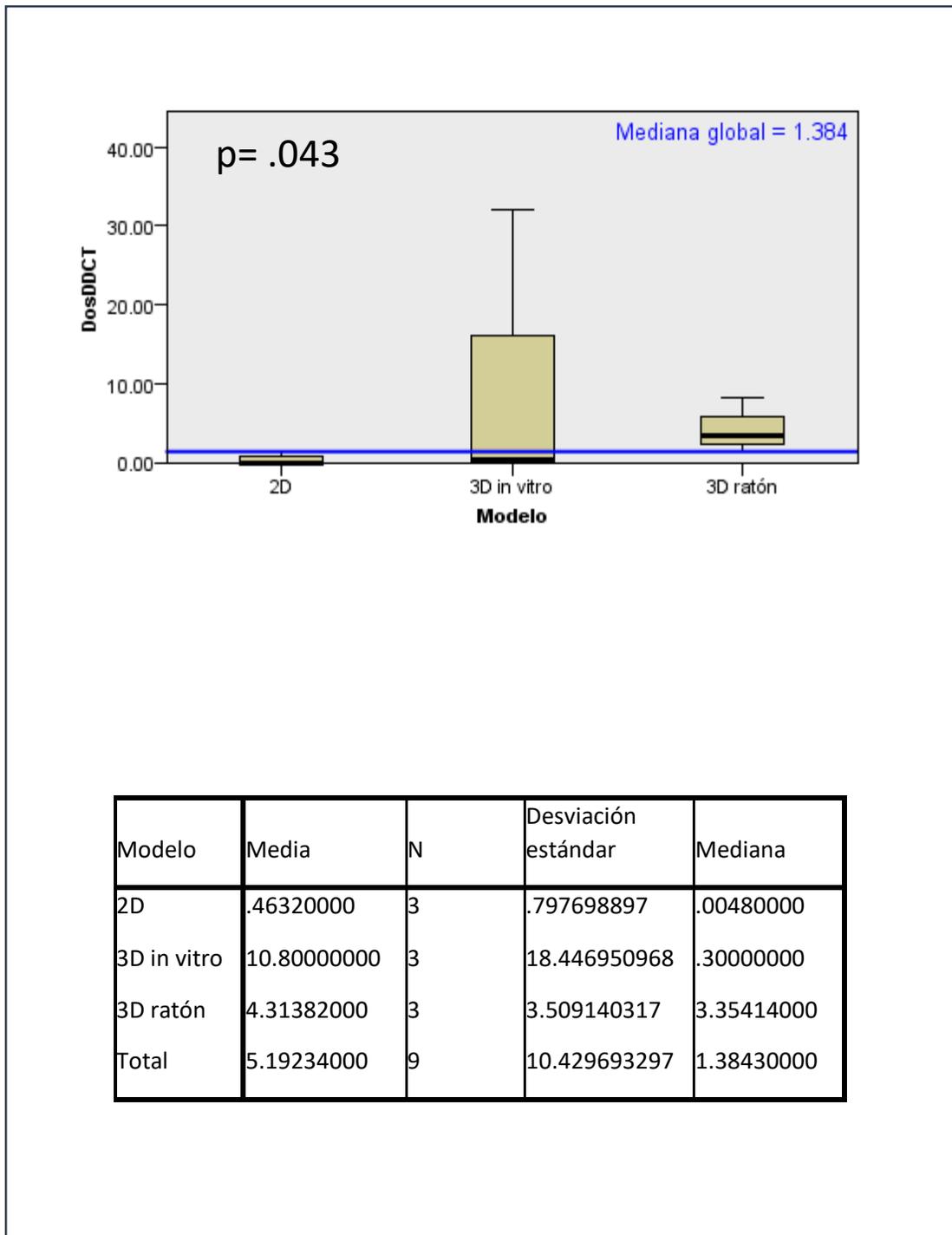


Fig 63 A Resultados de la expresión de PCNA en modelo 2D, 3D in vitro y animal con implante

Con la finalidad de determinar entre qué grupos se encuentran las diferencias observadas, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis a posteriori. Observándose que entre el modelo 2D y el modelo animal es en donde se encuentran las diferencias estadísticamente observadas (**Fig 63 B**).

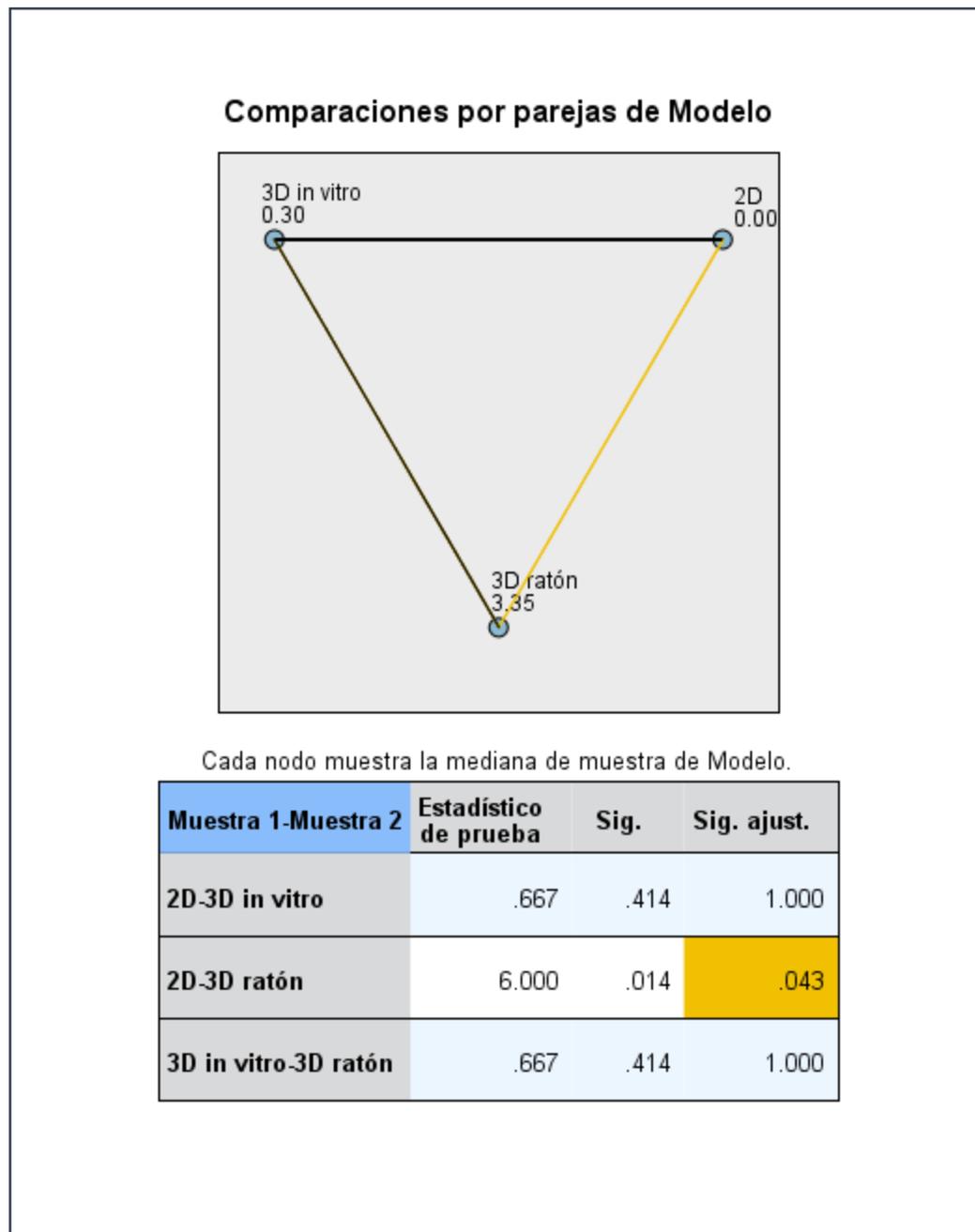


Fig 63B Resultados de Prueba a posteriori para determinar entre qué grupos se encuentra la diferencia estadísticamente significativa

Expresión de RIP1K en modelo 2D, 3D in vitro y modelo animal con implante

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de RIP1K entre los 3 grupos. Aquí es importante considerar que en el modelo 3D in vitro RIP1K no amplificó, considerándose su valor de cero. El valor de RIP1K en el grupo 2D fue de .40 y el valor de RIP1K en el modelo animal con implante fue de .20 (Fig 64). Al realizar comparación a posteriori para determinar entre qué grupos es la diferencia, se observó que la diferencia es entre el grupo 3D in vitro y el grupo 2D (Fig 64).

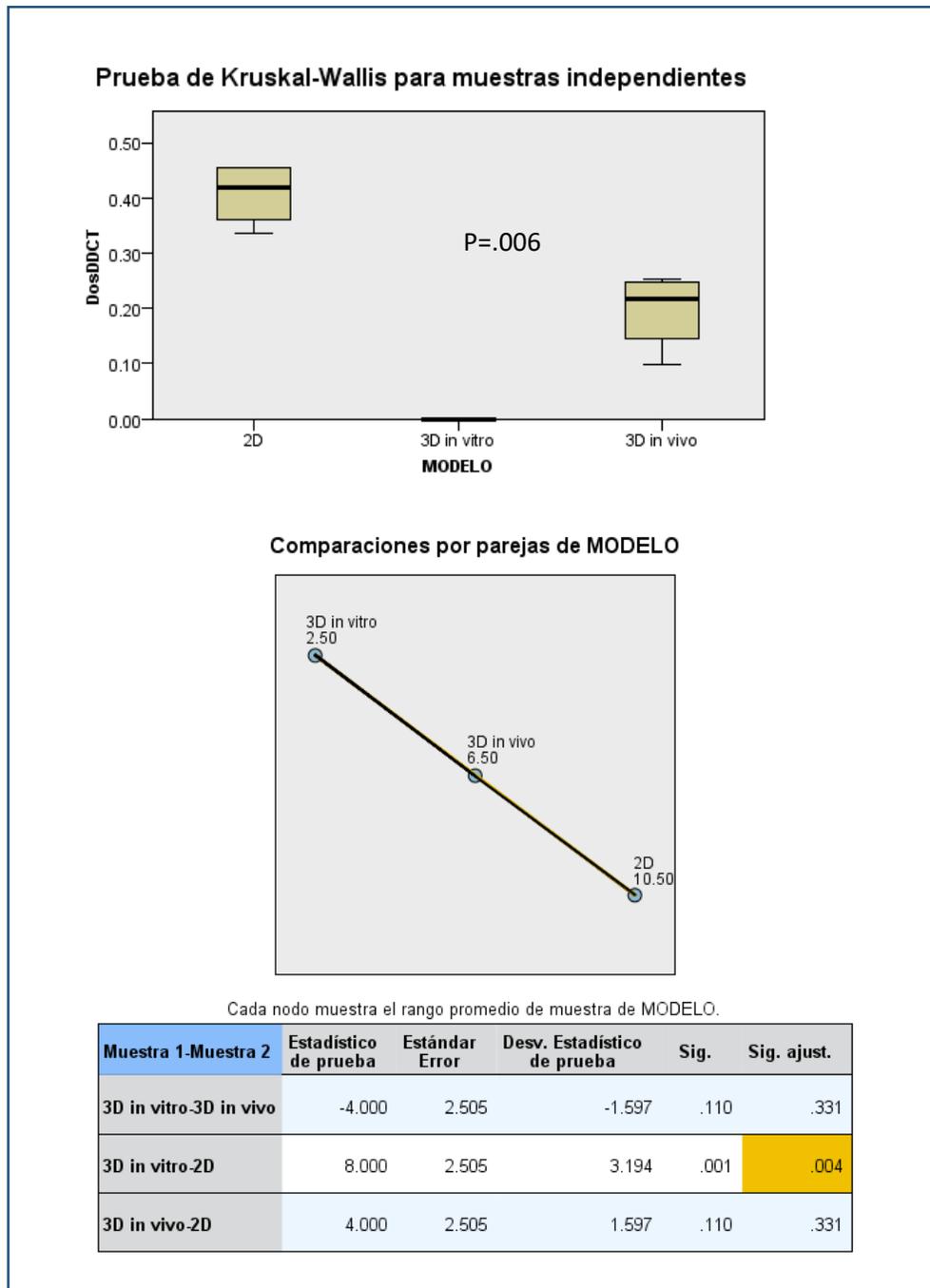


Fig 64 Expresión de RIP1K 1 en modelo 2D, 3D in vitro y en modelo animal con implante 3D

Expresión de Caspasa 3 en modelo 2D, 3D in vitro y modelo animal con implante 3D

Encontramos diferencias en la expresión de Caspasa 3 entre los 3 modelos, siendo menor la expresión de ésta en el modelo animal con implante y mayor en el modelo 3D in vitro. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Fig 65**)

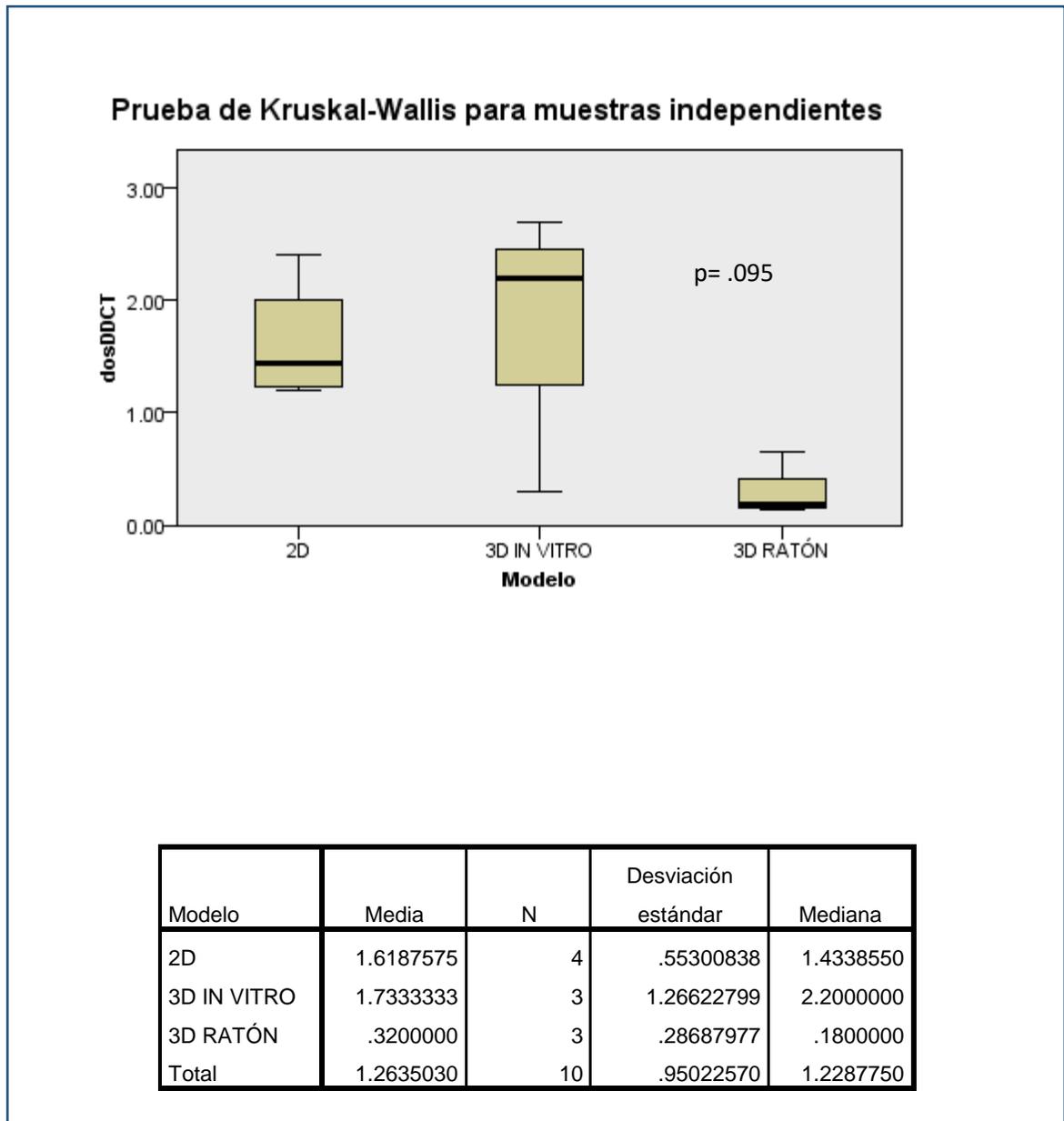


Fig 65 Expresión de Caspasa 3 en modelo 3D, 3D in vitro y en modelo animal con implante 3D

Expresión de Caspasa 8 en modelo 2D, 3D in vitro y modelo animal

La expresión de Caspasa8 fue cinco veces mayor (5.1) en el modelo 2D en comparación con el modelo 3D in vitro. La menor expresión de caspasa 8 se observó en el modelo animal. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (**Fig 66 A**).

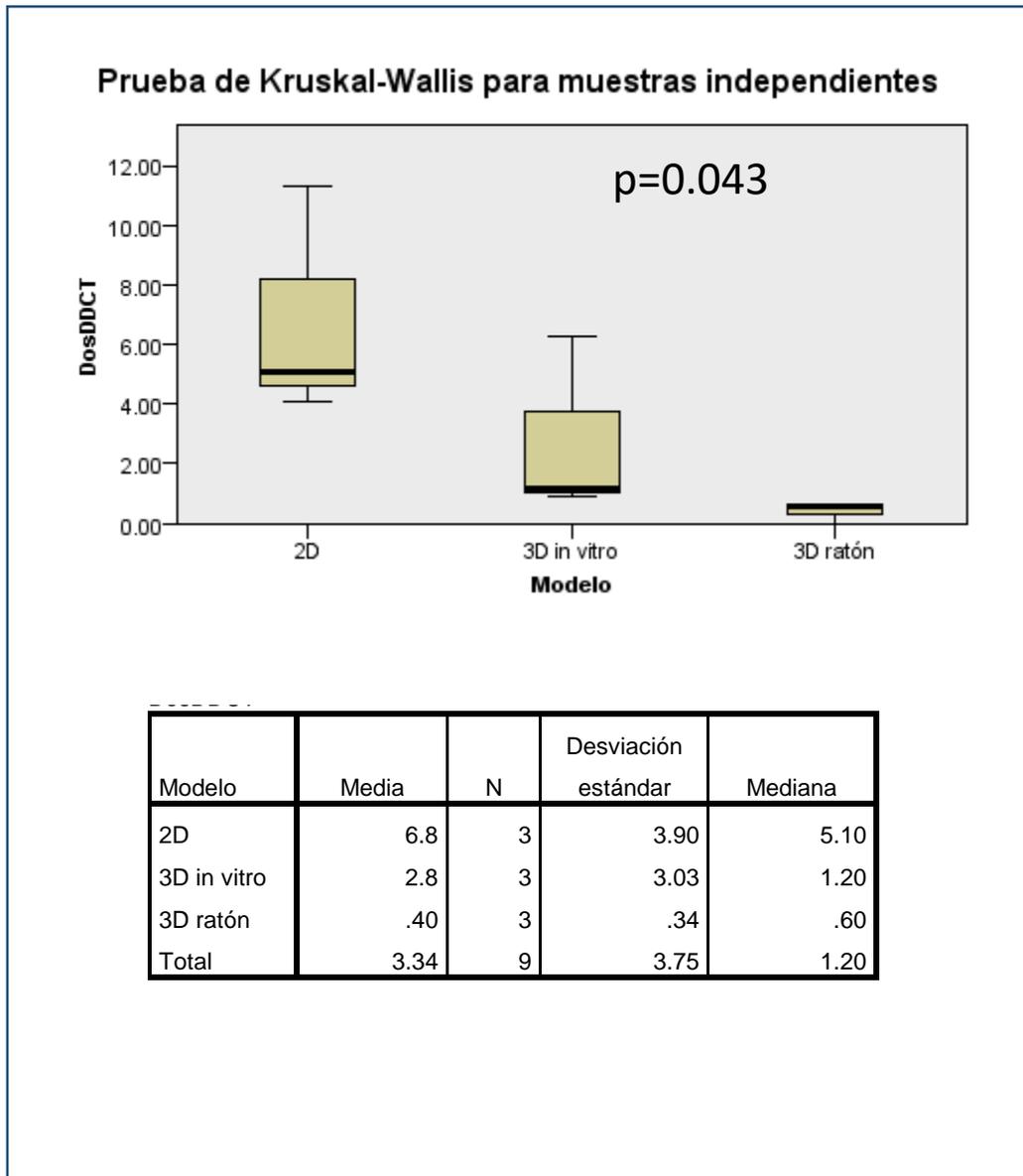


Fig 66 A Expresión de Caspasa 8 en modelo 2D, 3D in vitro y modelo animal con implante

Expresión de Caspasa 8 en modelo 2D, modelo 3D in vitro y modelo animal con implante

Al realizar prueba de Kruskal Wallis a posteriori para determinar entre cuál de estos grupos existe la diferencia, se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa al comparar la expresión de Caspasa 8 entre el modelo animal y el modelo 3D in vitro, así como también al comparar la expresión de Caspasa 8 entre el modelo animal y el modelo 2D (**Fig 66 B**).

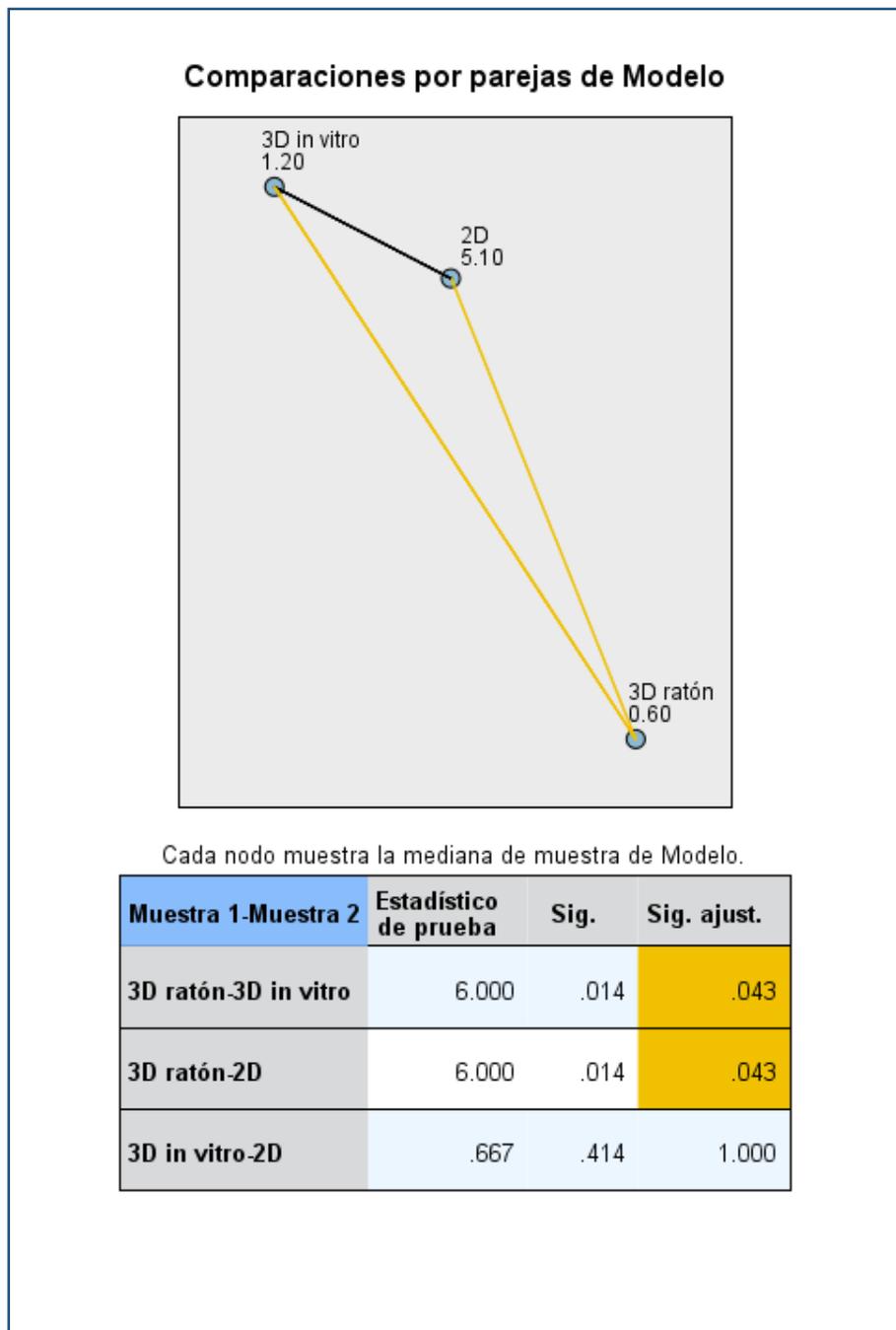


Fig 66 B Kruskal Wallis a posteriori para determinar entre qué grupos existe la diferencia en la expresión de Caspasa 8

DISCUSIÓN

Un candidato a fármaco antineoplásico eficaz, debería entre sus características de poder limitar la proliferación celular, inducir la apoptosis, restringir la migración, así como también no ejercer actividad necrótica en cultivos de células no tumorales. La quercetina presenta esta última característica. A diferencia de los agentes utilizados en la quimioterapia, el uso de la quercetina no está acompañado de efectos secundarios. De hecho, existen estudios en los cuales la quercetina previene del efecto nefrotóxico del cisplatino sin afectar la actividad antitumoral de éste. Otra característica importante de la quercetina es que al utilizarse junto con otros agentes quimioterapéuticos se presenta un efecto sinérgico observándose un incremento en las células neoplásicas con apoptosis.

Por otro lado, al ser la quercetina un producto natural, tiene un menor costo en comparación con las terapias convencionales para el cáncer, esto aunado a la ausencia de efectos secundarios, lleva a considerarla como un posible candidato en el tratamiento de las neoplasias.

PROLIFERACIÓN CELULAR Y PCNA y quercetina

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína celular esencial que participa tanto en la replicación del DNA como en la reparación del DNA, la organización de la cromatina, la transcripción y la cohesión de las cromátides hermanas. Además, es uno de los marcadores utilizados mediante la técnica de inmunohistoquímica para determinar la actividad proliferativa de las células neoplásicas. A mayor expresión de PCNA mayor actividad proliferativa presente en las células neoplásicas y no neoplásicas. Considerando estas características es que actualmente se investiga la posibilidad de dirigir la quimioterapia contra esta proteína en neoplasias altamente proliferantes, siendo las estrategias el uso de moléculas pequeñas o péptidos que se unen al PCNA o utilizar moléculas que sean competidores de las proteínas con las cuales interactúa (71).

Existe escasa literatura que evalúe la expresión génica de PCNA para determinar el efecto antiproliferativo de la quercetina en células neoplásicas (72,73,74), siendo lo más común la evaluación del efecto antiproliferativo determinando la expresión de ciclinas. Sin embargo, considerando que en estudios posteriores, se puede determinar también la expresión de PCNA en los constructos y esta técnica ya está montada en el servicio de Anatomía Patológica (ver Modelo animal en Trabajo a futuro), fue que se seleccionó este marcador de proliferación celular.

Efecto necroptótico de la quercetina

Aunque la información existente con respecto al efecto necroptótico de la quercetina en células neoplásicas es escasa (75), este mecanismo de muerte celular es tan importante como el de la apoptosis y la autofagia.

La cuantificación de la expresión de RIP1K en este trabajo y su documentación por microscopía electrónica de transmisión (ver anexo 7), apoya la información previa sobre la

necroptosis como uno de los mecanismos mediante los cuales la quercetina ejerce su efecto anti-neoplásico. Sin embargo por los datos obtenidos en este trabajo, que a continuación se discutirán, observamos que al parecer la necroptosis no fue el único mecanismo mediante el cual la quercetina presentó efecto antineoplásico en las células de Tumor de Células Gigantes de hueso, ya fuera en modelo 2D o en el modelo animal.

Ramírez L, et al., encontraron en su trabajo en el que utilizaron sorafenib en células de mieloma, que en condiciones en las que hay una ineficiente activación de las caspasas, se induce la muerte celular por necroptosis (76). Nosotros observamos en nuestro trabajo una expresión 11.5 veces mayor en comparación con los cultivos control, de la caspasa 8, que es una caspasa iniciadora, sin ser la expresión de caspasa 3, que es una caspasa efectora, semejante, ya que esta última sólo se expresó .5 veces más que el cultivo control. Consideramos que este hecho podría significar un inicio común, con la caspasa 8 como iniciadora, de tanto la apoptosis como la necroptosis.

Considerando que una característica de las células neoplásicas es la resistencia a la apoptosis inducida por agentes anticancerígenos y que en el cáncer, la necroptosis tiene propiedades inmunogénicas y activa las respuestas antitumorales, la necroptosis podría ser una estrategia terapéutica para eliminar las células tumorales resistentes a la apoptosis (77,78).

Efecto pro-apoptótico de la quercetina

Con la finalidad de determinar el efecto proapoptótico de la quercetina sobre las células de tumor de células gigantes, seleccionamos una caspasa iniciadora de la vía extrínseca (Caspasa 8) y una caspasa efectora (caspasa 3). Sin embargo, con los datos obtenidos es difícil determinar mediante qué vía de la apoptosis ejerce la quercetina su efecto.

Nuestros resultados concuerdan con reportes previos sobre el efecto apoptótico de la quercetina encontrándose expresión a la alza tanto de caspasas iniciadoras como de caspasas efectoras. En esos trabajos previos también se ha demostrado la participación de la quercetina tanto en la vía intrínseca como también en la vía extrínseca de la apoptosis, siendo las expresiones de las caspasas correspondientes a la vía intrínseca ligeramente a la alza, en comparación con la expresión de las caspasas que participan en la vía extrínseca por lo que sugiere en estos trabajos que hay un menor énfasis en la vía mitocondrial (79).

Debido a la compleja relación que existe entre el mecanismo de apoptosis, necroptosis y autofagia (80), al igual que como con otros fitoquímicos o químicos derivados de las plantas, como la Curcumina (81), aún no está aclarado del todo cuál es la vía por la cual la Quercetina “ejerce” la apoptosis (vía intrínseca o extrínseca) y /o inclusive la muerte celular.

Cabe señalar que el efecto pro-apoptótico observado por ultraestructura a consecuencia de la exposición a la quercetina, se observó no sólo en las células gigantes multinucleadas, sino también en los otros componentes histológicos del tumor. Consideramos que esta característica es importante porque, a diferencia del denosumab o de los bifosfonatos que

actúan únicamente sobre las células gigantes multinucleadas, ocasionando apoptosis de las mismas, el efecto de la quercetina es generalizado y no únicamente sobre las células gigantes multinucleadas que forman parte del tumor, sino en todos los componentes.

Es interesante mencionar que aunque encontramos una expresión 11.5 veces más de Caspasa 8 (una caspasa iniciadora), no fue así para la caspasa efectora 3. Estos resultados podrían tener explicación al considerar lo descrito por Nikolettou et al., en el que se describe que la autofagia, la necroptosis y la apoptosis comparten al inicio de sus vías a la caspasa 8 (79).

Esto podría significar que la sobre-expresión de caspasa 8 observada, no necesariamente significa un efecto apoptótico, ya que también se activa esta caspasa en el caso de que otros mecanismos de muerte celular como la necroptosis y la autofagia se activen.

DISCUSIÓN de resultados

1.2 Determinación de la dosis letal 50 de la quercetina en células cultivadas de tumor de células gigantes de hueso mediante el método MTT

Existen diferentes trabajos con cultivos de células neoplásicas en los que se ha determinado la DL50 de la quercetina en estas células, como por ejemplo: ca de mama (82), ca de colon (83), ca de próstata (84), ca de páncreas (85) y glioblastoma (86), por mencionar algunos. Sin embargo, el hecho de que no existieran trabajos previos en la literatura sobre el efecto de la quercetina en células de tumor de células gigantes de hueso, hizo necesario hacer la determinación de la DL50.

La determinación de la DL50 de la quercetina en células de TCG de hueso, además de ser un dato nuevo en el conocimiento médico, fue el punto de partida para los siguientes experimentos de este trabajo en los que se utilizó quercetina.

2.1 Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión de cultivos de células de TCG expuestos a 120µM de Quercetina por 24 hrs y determinación de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8 por RT-PCR.

En el presente estudio, además de documentarse en cultivos 2D el efecto proapoptótico y necroptótico de la quercetina (Anexo 7), se observó por microscopía electrónica de transmisión la presencia de autofagosomas y autolisosomas en las células expuestas a quercetina (Figura 5 del Anexo 7). Estas estructuras se observan en el proceso de autofagia. En relación a la autofagia, existen algunos estudios en los que se ha descrito esta como uno de los mecanismos mediante los cuales la quercetina ejerce su efecto antitumoral (87,88,89,90,91,92). En estos estudios se han empleado marcadores moleculares de autofagia tales como LC3, LC3II y p62. Sin embargo, sólo hay un estudio en el que se

demuestra también este fenómeno por Microscopía electrónica de transmisión al observarse en células de hepatocarcinoma expuestas a quercetina tanto autofagosomas como autolisosomas (93).

Existe una relación compleja entre la apoptosis, la necrosis y la autofagia en el proceso de muerte celular, ya que hay varios iniciadores de muerte, moléculas efectoras y vías de señalización que son compartidas por estos tres procesos. Varias de estas moléculas funcionan como sitios de control y al parecer, dependiendo de la situación específica en la que se encuentre la célula, se activan o desactivan para dirigirla hacia una ruta específica(94).

Sin embargo, la autofagia tiene roles opuestos en el proceso del cáncer, previniendo el desarrollo de éste al inicio pero, por el contrario, una vez que se establece el cáncer, el aumento del flujo autofágico favorece la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales. Por esta razón una terapéutica enfocada en la autofagia podría dirigirse tanto a la estimulación como a la inhibición, dependiendo del momento en la progresión del tumor en que se decida intervenir (95).

Por otro lado, existe evidencia actual que sugiere que en aquellas células neoplásicas en las cuales la apoptosis se encuentre inhibida y/o bloqueada, la estimulación y/o activación de la autofagia podría ser una alternativa terapéutica (96).

2.2 Exposición de cultivos de células de TCG a 240µM de Quercetina por 24 hrs y determinación de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8 por RT-PCR

Existen una serie de estudios en los que se reporta que los efectos proapoptóticos y de arresto en el ciclo celular de la quercetina en cultivos de células neoplásicas incrementan al aumentar la dosis empleada en ésta. Es decir, la quercetina presenta un efecto “dosis dependiente”, mostrando en líneas celulares como por ejemplo, cáncer de mama y glioblastoma multiforme, diferencias significativas en la expresión de marcadores de apoptosis, de acuerdo a la dosis de exposición. Así mismo, se ha observado que aún utilizando una misma concentración, a mayor tiempo de exposición, mayor efecto pro-apoptótico (97,98).

El propósito de este experimento fue determinar si la quercetina tenía no únicamente un efecto pro-apoptótico dosis dependiente(como ya se ha reportado en la literatura) en los cultivos de células de Tumor de Células Gigantes, sino también si tiene un efecto antiproliferativo o necroptótico dosis dependiente.

Lo esperado a observar era que a mayor cantidad de quercetina, menor expresión de PCNA y así fue como observamos una expresión menor de PCNA en los cultivos de células expuestas a 240mM de Quercetina, en comparación con los cultivos de células expuestas a 120mM. Así mismo observamos mayor expresión de RIP1K (que fue estadísticamente significativa) en las células expuestas a 240mM de Quercetina. La expresión de Caspasa 3 también fue mayor en las células expuestas a 240mM, aunque sin significancia estadística.

Estas observaciones sugieren que los 3 efectos de nuestro interés (antiproliferativo, necrótico y pro-apoptótico) son dosis dependientes.

2.3 Exposición de cultivos de células de TCG a 120 μ M de Quercetina a diferentes tiempos: 0 hrs, 4 hrs, 8hrs, 12 hrs y 24 hrs. Observación por Microscopía Electrónica de Transmisión

La observación realizada previamente por microscopía electrónica de transmisión a las 24 hrs. de exposición a la quercetina, mostró necroptosis, así como también apoptosis y necrosis secundaria (Ver anexo 7) en las células cultivadas. La necrosis secundaria observada fue el punto final de un proceso que sucedió previamente. Por esta razón se decidió realizar observaciones por microscopía electrónica de transmisión a tiempos previos a las 24 hrs. y así poder determinar cuáles son los cambios morfológicos que anteceden a la necrosis secundaria a las 24 hrs de exposición a la quercetina y de ser posible determinar la secuencia temporal de cambios ultraestructurales.

Sin embargo, en este experimento obtuvimos dos hallazgos inesperados: 1) presencia de cristales de quercetina de localización tanto intracelular como extracelular y 2) ausencia de cambios ultraestructurales correspondientes a necroptosis y/o apoptosis en células con estos cristales en su citoplasma (Ver figura 67 A y 67 B)

Al comparar los cambios ultraestructurales presentes en las células expuestas por 24 hrs a la quercetina con cristales y sin cristales, observamos diferencias. Mientras que en las células sin presencia de cristales observamos necrosis secundaria, vacuolas en el citoplasma de las células viables y cambios nucleares como dilatación del espacio internuclear, así como núcleos hiperdensos, en las células con cristales observamos los núcleos sin alteraciones y vacuolas ocasionales en el citoplasma (**Figura 67 A y 67 B**).

Buscando en la literatura datos en referencia a los cristales de quercetina, es que encontramos un artículo reciente, en el que está descrita la presencia de cristales de quercetina y cómo estos afectan la biodistribución y bio disponibilidad de la quercetina (88). En este trabajo, Shena et al., producen de manera intencionada cristales de quercetina de 2 tamaños diferentes: de 280 nm y de 550 nm. Ellos observaron que a mayor tamaño, menor biodisponibilidad y mayor tiempo necesario para la distribución generalizada de la quercetina en el cuerpo de las ratas. A mayor tamaño de los cristales menor absorción y menor cantidad de quercetina disponible.

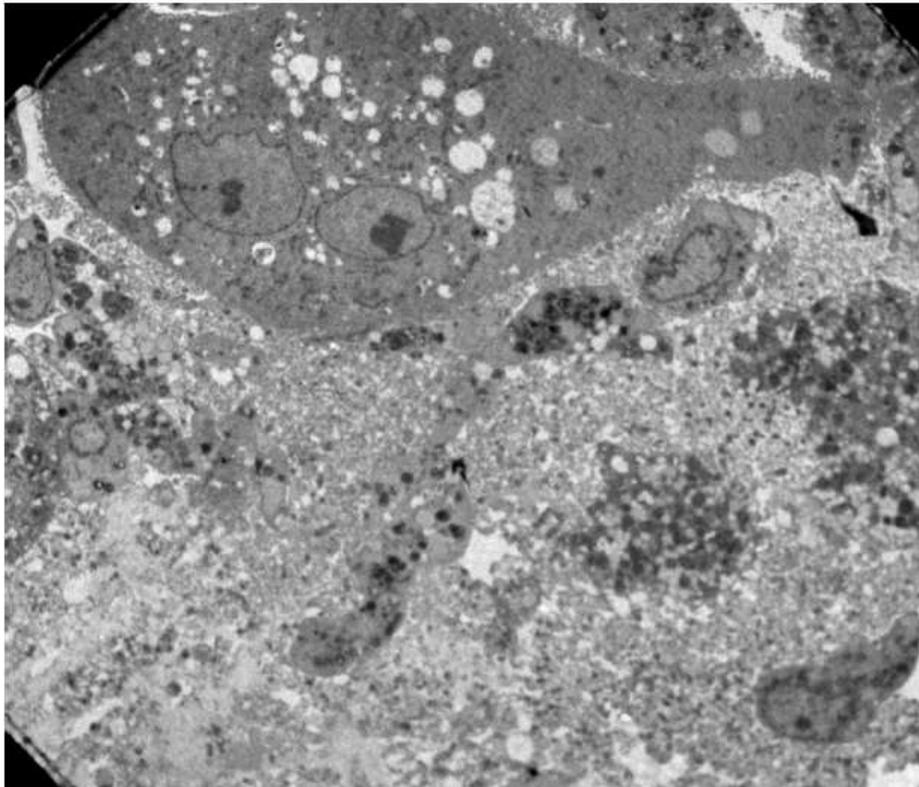


Fig 67A Ultraestructura de células expuestas a quercetina durante 24 hrs, sin cristales presentes

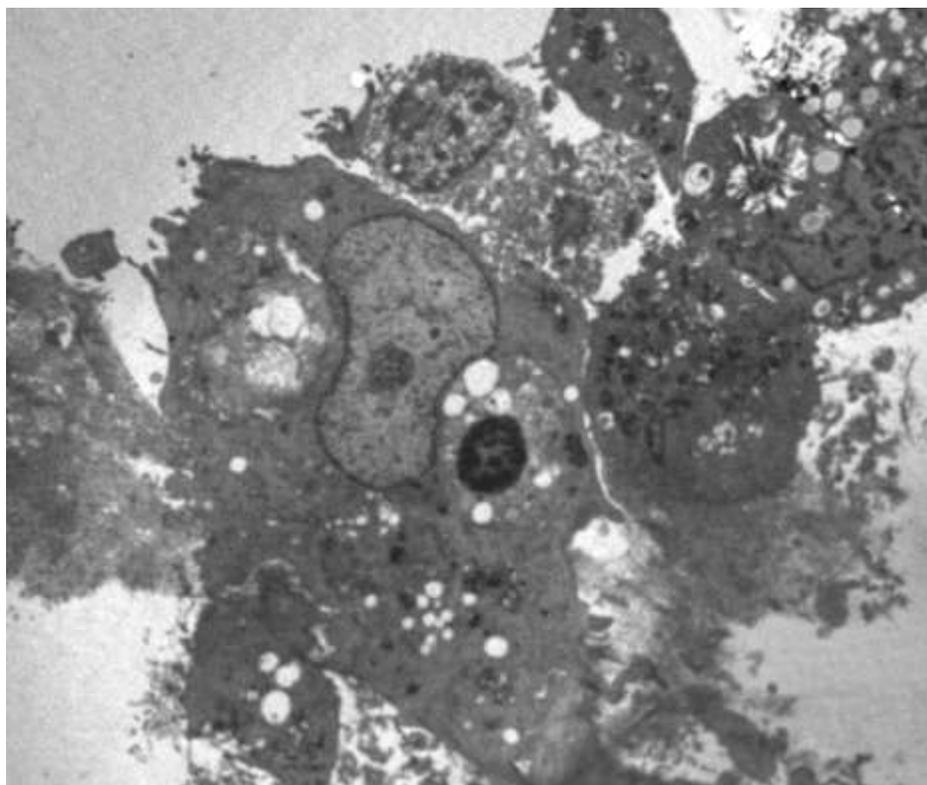


Fig 67B Ultraestructura de células expuestas durante 24 hrs a quercetina con cristales presentes

Consideramos que, aún sin haber obtenido los resultados esperados, el hallazgo accidental de cristales de quercetina en nuestro experimento es valioso y publicable por varias razones: 1) obtuvimos evidencia por microscopía electrónica de transmisión, de la formación de cristales de quercetina y de su localización intracelular y extracelular (sin existir literatura al respecto), 2) los cristales observados y creados en este experimento, de forma accidental, tienen en promedio 1500 nm de eje mayor, es decir, son de un tamaño mayor al descrito por Shena et al., Consideramos importante publicar la presencia de cristales de mayor tamaño, 3) observamos que la quercetina en su forma cristalizada, aún teniendo localización intracelular, no muestra los efectos apoptótico y/o necrótico como los observados en el experimento de exposición a las 24 hrs. (en el primer experimento de observación a las 24 hrs de exposición no hubo cristales de quercetina), 4) nos lleva a tener consideraciones sobre el almacenamiento de la quercetina, una vez preparada el Stock, tales como la temperatura y el tiempo transcurrido una vez preparada ésta. Nosotros preparamos un Stock inicial, que fue almacenado a 4°C y de éste se fueron obteniendo las cantidades necesarias de quercetina para los diferentes experimentos. Shena et al., mencionan en su proceso de fabricación de cristales de quercetina temperaturas que van de los 4°C a -20°C. Sin embargo, desconocemos si para la formación de cristales de un mayor tamaño (como fue nuestro caso) intervenga el tiempo de almacenamiento de la solución inicial.

3.1 Sembrado de andamios de PCL con células de TCG de hueso y su evaluación mediante cortes histológicos, inmunohistoquímica y pruebas de viabilidad y adherencia

El sembrado de andamios de policaprolactona con células de TCG de hueso y su cultivo es un modelo innovador para el estudio de este tipo de tumor, que no había sido reportado previamente en la literatura (**Ver anexo 6**). Demostramos en este trabajo que las células presentes en el constructo conservaron su viabilidad, así como su adherencia a los 14 días de sembradas en el andamio. La inmunohistoquímica al ser positiva para Catepsina K en las células gigantes multinucleadas, así como también para p63 en las células estromales, confirmó que no sólo desde el punto de vista morfológico sino también funcional, las células presentes en el andamio correspondían a los elementos histológicos presentes en el TCG de hueso (**Fig 68**).

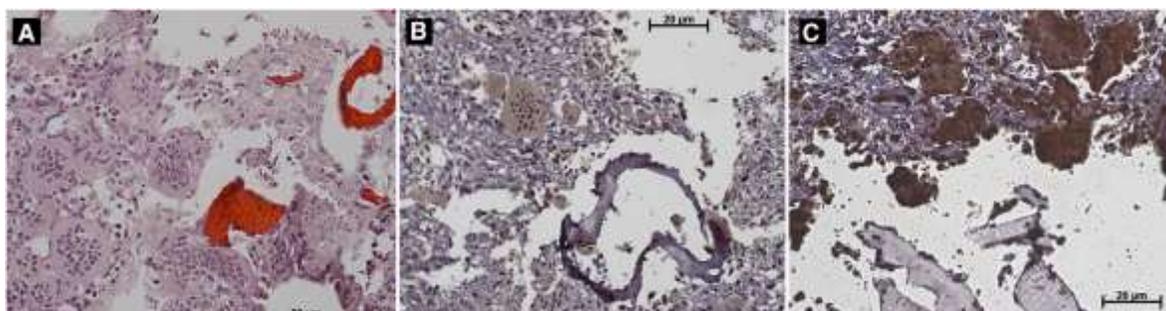


Figura 68 Cortes histológico de constructo, teñido con hematoxilina y eosina en A. Inmunohistoquímica para p63 en B y catepsina K en C. Tomado de Estrada et al Ref 89

3.2 Exposición por 24 hrs a quercetina (120 μ M y 240 μ M) y denosumab de constructos y determinación por RT-PCR de PCNA, RIP1K , Caspasa 3 y Caspasa 8.

En el modelo 3D in vitro observamos para PCNA una mayor proliferación en los andamios correspondientes al grupo control, siendo ésta 107 veces mayor que el grupo que mostró menos proliferación (constructos expuestos a 240 μ M de quercetina). Sin embargo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ($p=.73$)

Caspasa 3. No fue posible concluir que el efecto anti-apoptótico en los andamios, fuera dosis dependiente, ya que al aumentar la cantidad de quercetina, no aumentó la expresión de caspasa 3, siendo así que con una concentración de 120mM la expresión de caspasa 3 fue de 1.7 y con una concentración de 240mM la expresión de quercetina fue de .03. Sin embargo, al comparar la expresión de caspasa 3 entre los 4 grupos (andamios control, andamios quercetina 120mM, andamios quercetina 240mM y andamios denosumab) se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.23$). Al realizar el análisis posterior observamos que los grupos entre los cuales se presentó la diferencia fue entre el grupo Andamiso quercetina 120mM y Andamios deosumab, así como también andamios quercetina 120 y andamios quercetina 240 mM.

Caspasa 8: En el caso de caspasa 8 su expresión fue mayor en los andamios expuestos a 240mM de quercetina, siendo los valores de caspasa 8 muy semejantes para el grupo expuesto a 120mM de quercetina y denosumab. Por lo que aunque podríamos decir que para Caspasa 8 se observó un efecto pro-apoptótico dosis dependiente, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

En ninguno de los constructos, al realizar la RT-PCR amplificó RIP1K, sin ser posible determinar su expresión. Queda aún por dilucidar la razón por la cual RIP1K no amplificó.

4.1 Expresión de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8 en los constructos implantados en ratones atímicos

Los efectos observados de la quercetina en el modelo animal fueron nulos. En algunos casos inclusive la expresión de marcadores en el grupo de ratones atímicos que recibió quercetina fue menor o muy semejante a la observada en el grupo control. Como por ejemplo, la expresión de PCNA en el grupo control fue de 1.8 y en el grupo de ratones que recibió quercetina 2.2, es decir, la proliferación fue inclusive .4 veces mayor en los ratones que recibieron quercetina. En el caso de la determinación de RIP1K los resultados obtenidos fueron diferentes a los esperados, al ser el valor de RIP1K en el grupo de ratones control 1.4 y en el grupo de ratones que recibieron quercetina .54, es decir la mitad a lo observado en el grupo control.

Para Caspasa 3 observamos que su expresión en el grupo control fue de 1.08, mientras que en el grupo de ratones que recibió quercetina fue de .63, es decir, su expresión fue menor.

En Caspasa 8 observamos que las diferencias observadas en su expresión entre el grupo control y el grupo de ratones que recibió quercetina, fueron mínimas (.48 en grupo control vs .92 en el grupo de quercetina)

Estos resultados nos llevan a replantear la dosis empleada en el modelo animal y la vía de administración, ya que con 120mM de quercetina administrada cada 3er día a los ratones, en un tiempo máximo de 7 días (que fue el tiempo máximo de supervivencia de los ratones) los efectos fueron mínimos.

4.2 Expresión de PCNA, RIP1K y Caspasa 3 en cultivos 2D y modelo animal

Al comparar los niveles de expresión entre los diferentes modelos empleados, observamos lo siguiente:

- La expresión de RIP1K y de Caspasa 3 fue mayor en el modelo 2D en comparación con el modelo animal, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=.029$)
- Para PCNA se observó un mayor efecto antiproliferativo en el modelo animal (valor de .716 de PCNA)en comparación con el modelo 2D (valor de PCNA de 1.9) ($p=343$). Sin embargo, esta diferencia observada no fue estadísticamente significativa

4.3 Expresión de PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8 en 2D, 3D in vitro y modelo animal

PCNA: Al comparar la expresión de PCNA entre los 3 modelos utilizados, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($P=.043$) entre ellos, siendo la expresión de PCNA 3 veces mayor en el modelo animal en comparación con el modelo 2D (.46 en modelo 2D versus 4.3 en modelo animal). Esto significa que hubo mayor proliferación celular, y por lo tanto menor efecto de la quercetina, en el modelo animal en comparación con el modelo 2D que fue en el que se observó un mayor efecto antiproliferativo de la quercetina.

RIP1K: Al comparar los niveles de expresión de RIP1K entre los diferentes modelos, observamos diferencias estadísticamente significativas siendo la expresión de RIP1K en el modelo 2D de y en el modelo animal. Sin embargo debido a que Rip1K no amplificó (ver en el modelo 3D in vitro, tal vez habría que considerar este resultado con reservas.

Caspasa 3. La mayor expresión se observó en el modelo 3D in vitro. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (.095)

Caspasa 8 La expresión de Caspasa8 fue mayor en el modelo 2D en comparación con el modelo animal

MODELOS TRIDIMENSIONALES IN VITRO EN RATÓN

Observamos un efecto diferente de la quercetina en el modelo 3D in vitro a 3D in vivo. Siendo menor el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico en el modelo animal. Como posibles razones de esta observación están el que la biodisponibilidad puede ser menor en el modelo animal y por lo tanto la exposición de las células presentes en el constructo

también menor. Consideramos importante esta observación ya que únicamente existe un artículo en la literatura en referencia al diferente tipo de comportamiento de células tumorales cuando están sembradas en un andamio 3D in vitro a cuando se encuentran en un andamio 3D in vivo. (Ushashi C. Dadwal ,y , Alyssa R. Merkel ,y , Jonathan M. Page , Kristin A. Kwakwa Michael Kessler and Julie A. Rhoades. 3D Bone Morphology Alters Gene Expression, Motility, and Drug Responses in Bone Metastatic Tumor Cells Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 6913; doi:10.3390/ijms21186913)

CONCLUSIONES

La quercetina tiene efecto antiproliferativo, necrótico y proapoptótico en cultivos 2D de células de Tumor de Células Gigantes de hueso. Este efecto observado en monocapa es dosis dependiente. Observamos que los efectos antitumorales de la quercetina utilizando una concentración de 120 μ M varían de acuerdo al modelo que se utilice, siendo mayores en los cultivos 2D y poco evidentes en el modelo animal.

TRABAJO A FUTURO:

- **Autofagia:** Además de documentarla por microscopía electrónica, sería importante cuantificar su expresión con otra técnica , como por ejemplo RT-PCR utilizando LC3II como marcador molecular de la misma
- Una vez cuantificado el proceso de autofagia en células de TCG de hueso, expuestas a quercetina y documentado por microscopía electrónica de transmisión, podría establecerse la participación que tanto la apoptosis como la necroptosis y la autofagia tienen en el proceso de muerte celular presente en las células de TCG de hueso cuando son expuestas a quercetina. Estos resultados podrían publicarse al ser generadores de conocimiento nuevo
- **Cristales:** En nuestro experimento se observó que la presencia de los cristales, está relacionada con la ausencia de los efectos apoptótico y necroptótico. Los experimentos que se podrían continuar realizando serían aquellos en los cuales se determinara en cultivos celulares, observaciones a diferentes tiempos para determinar si estos cristales se logran disolver (cambiando únicamente el medio a las células cada 24 hrs) y si hay alteraciones en las células una vez que estos cristales se han logrado disolver.
- **Efecto dosis y tiempo dependiente:** En este trabajo mostramos que la quercetina tiene un efecto antiproliferativo, proapoptótico y necroptótico dosis dependiente, utilizando únicamente el doble de la DL50 y con el mismo tiempo de exposición. Un experimento que podría realizarse sería analizar a tiempos más largos de exposición (48 y 72 hrs.) y a dosis menores, el comportamiento de las células de TCG cultivadas, en cuanto a la expresión de PCNA, Caspasa 3, Caspas 8 y RIP1K

- **Sembrado de andamios de PCL con células de TCG de hueso:** En el modelo 3D in vitro empleado en este proyecto, las células tienen una disposición tridimensional, lo cual permitiría realizar estudios posteriores con énfasis en dilucidar las interacciones célula-célula y célula-matriz en este tipo de tumor.
- Este modelo 3D permitiría estudiar la expresión diferencial de proteínas de acuerdo a la ubicación de las células en el tumor (porción periférica vs porción central del tumor).
-
- **Modelo animal:** Al observar en la cavidad peritoneal de los ratones que murieron quercetina precipitada (sin estar relacionada con algún tipo de inflamación, de acuerdo a lo que observamos en las improntas), se pueden probar otras vías de administración para la quercetina, como por ejemplo la vía oral. El experimento consistiría en implantar un constructo con células de TCG en ratones atímicos, administrarles quercetina por vía oral y determinar por RT-PCR la expresión de PCNA, RIP1K, Caspasa 3, Caspasa 8, así como también observar por microscopía electrónica de transmisión los cambios ultraestructurales en los constructos.
- Es factible además realizar tinciones de inmunohistoquímica (PCNA, RIP1K, Caspasa 3 y Caspasa 8) de los casos control y los que reciban tratamiento, para comparar la positividad.
- También se podrían hacer evaluaciones ultraestructurales del tubo digestivo e hígado con el fin de determinar la presencia de cristales y el proceso de absorción de los mismos, en el tubo digestivo, así como su presencia o ausencia en hígado.

REFERENCIAS

1. De la Garza JM, Ceccopieri CA, Cruz Ortiz H, Díaz Rodríguez LR, Martínez Macías R. Tumor de células gigantes de hueso. Aspectos generales de 11 casos. *Revista médica del Hospital General de México*, SS Vol 62, Núm 4, 1999 pp 240-244
2. McCarthy EF. Giant-cell tumor of bone. An historical perspective. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1980;(153):14-25.
3. Jaffe HL, Lichtenstein L, Portis RB. Giant cell tumor of bone. *Arch Pathol* 1940; 30:993-1031.
4. Goldenberg RR, Campbell CJ, Bonfiglio M. Giant cell tumor of bone. An analysis of two hundred and eighteen cases. *J. Bone Joint Surg (AM)* 1970; 52:619-664.
5. Dahlin DC, Unni KK. Bone tumors: General aspects and data on 8,542 cases. 4th ed. Springfield Ill: Charles C Thomas, 1986; 119-140.
6. Jain K, Ravishankar R, Rupakumar C, et al. Bone tumors in a tertiary care hospital of south India: A review 117 cases. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2011;32(2):82. doi:10.4103/0971-5851.89778
7. Estrada-Villaseñor E, Lm L, Ea D. Prevalencia y características clínico-patológicas del tumor de células gigantes. *Acta ortopedica mexicana*. 2015;29(6):295-298.
8. Yüçetürk G, Sabah D, Keçeci B, Kara AD, Yalçinkaya S. Prevalence of bone and soft tissue tumors. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2011;45(3):135-143. doi:10.3944/AOTT.2011.2504
9. Dabak N, Çiraklı A, Gülman B, Selçuk MB, Bariş S. Distribution and evaluation of bone and soft tissue tumors in the middle Black Sea Region. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2014;48(1):17-24. doi:10.3944/AOTT.2014.3013
10. Verschoor AJ, Bovée JVMG, Mastboom MJL, Sander Dijkstra PD, Van De Sande MAJ, Gelderblom H. Incidence and demographics of giant cell tumor of bone in The Netherlands: First nationwide Pathology Registry Study. *Acta Orthopaedica*. 2018;89(5):570-574. doi:10.1080/17453674.2018.1490987
11. Liede A, Bach BA, Stryker S, et al. Regional variation and challenges in estimating the incidence of giant cell tumor of bone. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*. 2014;96(23):1999-2007. doi:10.2106/JBJS.N.00367
12. Amelio JM, Rockberg J, Hernandez RK, et al. Population-based study of giant cell tumor of bone in Sweden (1983-2011). *Cancer Epidemiology*. 2016;42:82-89. doi:10.1016/j.canep.2016.03.014
13. Liede A, Hernandez RK, Tang ET, et al. Epidemiology of benign giant cell tumor of bone in the Chinese population. *Journal of Bone Oncology*. 2018;12(July):96-100. doi:10.1016/j.jbo.2018.07.003
14. Niu X. Epidemiologic Comparison of 9200 Patients Treated at Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing, China, With 10 165 Patients at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota Xiaohui. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(2):1149-1155. doi:10.5858/arpa.2014-0432-OA

15. Wulling M, Engels C, Jesse N, Werner M, Delling G, Kaiser E. The nature of giant cell tumor of bone. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2001;127(8):467-474.
16. Cowan RW, Singh G. Giant cell tumor of bone: A basic science perspective. *Bone*. 2013;52(1):238-246. doi:10.1016/j.bone.2012.10.002
17. Chetan A. Giant cell tumor of bone with secondary aneurysmal bone cyst. *Int J Shoulder Surg*. 2008;2(3):68. doi:10.4103/0973-6042.42582.
18. Verma V, Puri A, Shah S, Rekhi B, Gulia A. Giant Cell Tumor Developing in Paget ' s Disease of Bone : A Case Report with Review of Literature. *J Orthop CASE REPORTS*. 2016;6(4):103-107. doi:10.13107/jocr.2250-0685.594.
19. Estrada EG, Ayala AG, Lewis V CB. Dedifferentiated chondrosarcoma with a noncartilaginous component mimicking giant cell tumor of bone. *Ann Diagn Pathol*. 2002;6(3):159-163.
20. Knösel T, Werner M, Jung A, Kirchner T DH. Dedifferentiated chondrosarcoma mimicking a giant cell tumor. *Pathol Res Pr*. 2014;210(3):194-197. doi:10.1016/j.prp.2013.12.003.
21. Jaffe HL., Lichtenstein L. PR. Giant cell tumor of bone: its pathological appearance, grading, supposed variants and treatmentNo Title. *Arch Pathol*. 1940;30:993-1031.
22. NG S. Malignancy, aggressiveness, and recurrence in giant cell tumor of bone. *Cancer*. 1980;46(7):1641-1649.
23. Lausten GS, Jensen PK, Schiodt T LB. Local recurrences in giant cell tumor of bone. Long-term follow up of 31 caseso Title. *Int Orthop*. 1996;20(3):172-176
24. Skubitz KM, Cheng EY, Clohisy DR, Thompson RC, Skubitz APN. Gene expression in giant-celltumors. *J Lab Clin Med*. 2004;144(4):193-200. doi:10.1016/j.lab.2004.06.005.
25. Lausten GS, Jensen PK, Schiodt T LB. Local recurrences in giant cell tumor of bone. Long-term follow up of 31 caseso Title. *Int Orthop*. 1996;20(3):172-176.
26. Osaka S, Toriyama M, Taira K, Sano S SK. Analysis of giant cell tumor of bone with pulmonary metastases. *Clin Orthop Relat Res*. 1997;(335):253-261.
27. Alberghini M, Kliskey K, Krenacs T, Picci P, Kindblom L, Forsyth R AN. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch*. 2010;456(1):97-103. doi:10.1007/s00428-009-0863-2
28. Gong L, Liu W, Sun X, Sajdik C, Tian X, Niu X HX. Histological and clinical characteristics of malignant giant cell tumor of bone. *Virchows Arch*. 2012;460(3):327-334. doi:10.1007/s00428-012-1198-y.
29. Miller IJ, Blank A, Yin SM, McNickle A, Gray R, Gitelis S. A case of recurrent giant cell tumor of bone with malignant transformation and benign pulmonary metastases. *Diagn Pathol*. 2010;5:62. doi:10.1186/1746-1596-5-62

30. Cheng DD, Hu T, Zhang HZ, Huang J, Yang QC. Factors Affecting the Recurrence of Giant Cell Tumor of Bone after Surgery: A Clinicopathological Study of 80 Cases from a Single Center. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(5):1961-1970. doi:10.1159/000430164
31. Teixeira LEM, Vilela JCS, Miranda RH, Gomes AH, Costa FA, De Faria VC. Giant cell tumors of bone: Nonsurgical factors associated with local recurrence. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2014;48(2):136-140. doi:10.3944/AOTT.2014.2714
32. Abuhejleh H, Wunder JS, Ferguson PC, et al. Extended intralesional curettage preferred over resection–arthrodesis for giant cell tumour of the distal radius. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2019;(0123456789). doi:10.1007/s00590-019-02496-2
33. Formica, J.V., R. W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol*. 1995 33:1061-1080
34. S. Martínez-Flores, J. González-Gallego, J. M. Culebras y M.J. Tuñón. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp* 2002 (6) 271-278
35. Escamilla Jiménez C.I, Cuevas Martínez E.Y., Guevara Fonseca J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac Med. UNAM* 2009 (52): 73-75
36. Soriano de Richards E. Los metabolitos de las plantas y las células cancerosas I. Los flavonoides. 2003 *REB22*(4):191-197
37. Benavente-García O y Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids. New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem*.2008, Vol. 56, (15): 6185–6205
38. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 1979;39:1141–9. [PubMed: 217531]
39. GS Kelly, ND. Quercetin Monograph. *Altern Med Rev*. 2011 Vol 16 No 2. 172-194
40. Gabriele D’Andrea, Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?, *Fitoterapia* (2015), doi: 10.1016/j.fitote.2015.09.018
41. Sakanashi, Y.; Oyama, K.; Matsui, H.; Oyama, T.B.; Oyama, T.M.; Nishimura, Y.; Sakai, H.; Oyama, Y. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Life Sci.*, 2008, 83, 164-169.
42. Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, Mubarak MS. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018 Nov;32(11):2109-2130
43. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 1979;39:1141–9. [PubMed: 217531]
44. Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F, Morales AI, Lopez-Novoa J. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumor activity. *Nephrol Dial Transplant* (2011) 0: 1-12
45. Wang G, Song L, Wang H, Xing N. Quercetin synergizes with 2-methoxyestradiol inhibiting cell growth and inducing apoptosis in human prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2013;30:357-63.
46. Mu C, Jia P, Yan Z, Lin X, Li X, Lin H. Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating

Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29:179–83

47. Ong C, Tran E, Nguyen T, Ong C, Lee S, Lee J, Ng C, Leong C, Huynh H. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep.* 2004;11:727–33.
48. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem.* 2009;106:73–82.
49. Ramírez Agudelo ME, Rojas López M. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia vol 23 no 2 Medellín Apr/June 2010*
50. Ravishankar D, Watson KA, Boateng SY, Green RJ, Greco F, Osborn HMI. Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 5;97:259-74
51. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1(2): 112–19
52. Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, Chan FKM (2012a) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150(2): 339–50
53. Mary E. Choi, David R. Price, Stefan W. Ryter, Augustine M. K. Choi. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease *JCI Insight.* 2019 Aug 8; 4(15): e128834. Published online 2019 Aug 8. doi: 10.1172/jci.insight.128834
54. Oliveira SR, Amaral JD, Rodrigues CM (2018) Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation. *Cell Death Dis* 9(9): 903.
55. Li J, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 2021;150(2):339-350
56. Cai Z, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2014;16(1):55-65
57. Hildebrand JM, et al. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(42):15072-15077.
58. Dondelinger Y et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep* 2014;7(4):971-981
59. Mark S D'Arcy. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 43 (2019) 582–592 ISSN 1065-6995 doi: 10.1002/cbin.11137

- 60 Kashyap D, Mittal S, Sak K, Singhal P, Singh Tuli H. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-016-5184-x
- 61 Xian Xua, Mary C. Farach-Carsonb and Xinqiao Jiaa,. Three-Dimensional In Vitro Tumor Models for Cancer Research and Drug Evaluation. *Biotechnol Adv.* 2014 November 15; 32(7): 1256–1268. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.009
- 62 Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432,332, 2004
- 63 Hale MD, Hayden JD, Grabsch HI. Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cell Oncol (Dordr).* 2013 Apr;36(2):95-112. Doi:10.1007/s13402-013-0127-7
- 64 Vanderburgh J, Sterling JA, Guelcher SA. 3D Printing of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening *Ann Biomed Eng.* 2017 Jan;45(1):164-179. doi: 10.1007/s10439-016-1640-4. Epub 2016 May 11.
- 65 Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., Rao S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular Biotechnology* 2018, 60(7), 506-532. Doi:10.1007/s12033-018-0084-5
- 66 Rijal G, Bathula C and Li W. Application of Synthetic Polymeric Scaffolds in Breast Cancer 3D Tissue Cultures and Animal Tumor Models. *Int J Biomaterial.* 2017;2017:8074890 doi: 10.1155/2017/8074890
- 67 Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, Ramamoorthy V, Lazar AJ, Kasper FK, Farach-Carson MC, Vishwamitra D, Demicco EG, Menegaz BA, Amin HM, Mikos AG, Ludwig JA. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013. 110(16)2013. 6500-6505
- 68 Müller WE1, Tolba E, Schröder HC, Diehl-Seifert B, Link T, Wang X. Biosilica-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers mats provide a morphogenetically active surface scaffold for the growth and mineralization of the osteoclast-related SaOS-2 cells. *Biotechnol J.* 2014 Oct;9(10):1312-21.
- 69 Oh ET, Kim HG, Choi MH, Lee JS, Kim SJ, Kwak JY, Park HJ. Multi-Layer Nanofibrous PCL Scaffold-Based Colon Cancer Cell Cultures to Mimic Hypoxic Tumor Microenvironment for Bioassay. *Cancer (Basel).* 2021 Jul 15;13(14):3550. Doi: 10.3390/cancers13143550.
- 70 Francois Denizot * and Rita Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89 (1986) 271-277
- 71 Cardano M, Tribioli C, Prosperi E. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen PCNA as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation. *Current Cancer Drug Targets* 2020;20(4):240-252. doi: 10.2174/1568009620666200115162814
- 72 Chen, F., Chien, M. Chern, I (2015) Impact of lower concentrations of phytoestrogens on the effects of estradiol in breast cancer cells. *Climateric*, 2015,18(4), 574-581.

- 73 Priyadarsini RV, Vinothini G, Murugan RS, Manikandan R, Nagini S. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr Cancer*. 2011;63(2):218-26.
- 74 Firous AB, Sharmila G, Balakrishan S, RajaSingh P, Suganya S, Srinivasan N, Arunakaran J. Food Funct. 2014 Oct;5(10):2632-45 Quercetin, a natural dietary flavonoid, acts as a chemopreventive agent against prostate cancer in an in vivo model by inhibiting the EGFR signaling pathway. *Food Funct*. 2014 Oct;5(10):2632-45
- 75 Khorsandi L, Orazizadeh M, Niazvand F, Abbaspour MR, Mansouri E, Khodadadi A. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratisl Med J* 2017; 118 (2)123 – 128 DOI: 10.4149/BLL_2017_025
- 76 A. Ramírez-Labrada, N López-Royuela, V Jarauta, P Galán-Malo, G Azaceta, L Palomera, J Pardo, A Anel, I Marzo, J Naval. Two death pathways induced by sorafenib in myeloma cells: Puma- mediated apoptosis and necroptosis. *Clin Transl Oncol*. 2015 Feb;17(2):121-32
- 77 Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan Kun, Cheng H, Jin H, Ni Q, Yu X and Chen Liu C. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer* (2019) 18:100 <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
- 78 Choi ME, Price DR, Rytte SW and Choi AMK. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*.2019;4(15):e128834. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834>.
- 79 Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells .Madhumitha Kedhari Sundaram, Ritu Raina, Nazia Afroze, Khuloud Bajbouj, Mawieh Hamad, Shafiul Haque, Arif Hussain.*Biosci Rep*. 2019 Aug 30; 39(8): BSR20190720. Prepublished online 2019 Jul 31. Published online 2019 Aug 13. doi: 10.1042/BSR20190720.PMCID:PMC6692570
- 80 Nikolettópoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (2013) 3448–3459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
- 81 Extrinsic or intrinsic Apoptosis by Curcumin and Light: Still a Mystery. Laubach V, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger S, Zöller N. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 19;20(4):905
- 82 Nguyen, L., et al. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*,2017(21): 205–213.
- 83 Zhang, X. A. et al.,Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappaB Pathway. *Pharmacognosy Magazine*, 2015(11): 404–409
- 84 Sharma, V.et al. Sensitization of androgen refractory prostate cancer cells to anti-androgens through re-expression of epigenetically repressed androgen receptor— Synergistic action of quercetin and curcumin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016(431):12–23

- 85 Kim, J. H et al. Quercetin sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through JNK-mediated cFLIP turnover. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016 (78): 327–334
- 86 Wang, H.et al. Effect of quercetin on glioma cell U87 apoptosis and feedback regulation of MDM2-p53. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*.2014 (34), 686–689
- 87 Psahoulia FH, Moutzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. *Carcinogenesis* 2007;28:1021-31.
- 88 Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Bruning A. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol* 2012; 137:25-36.
- 89 Jia L, Huang S, Yin X, Zan Y, Guo Y, Han L. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. *Life Sci* 2018;208:123-30
- 90 Calgarotto AK, Maso V, Junior GCF, Nowill AE, Filho PL, Vasallo J, et al. Antitumor activities of quercetin and Green tea in xenografts of human leukemia HL60 cells. *Sci Rep* 2018;8:3459.
- 91 Moon JH, Eo SK, Lee JH, Park SY. Quercetin-induced autophagy flux enhances TRAIL-mediated tumor cell death. *Oncol Rep* 2015;34:375-81.
- 92 Tomas-Hernandez S, Blanco J, Rojas C, Roca-Martinez J, Ojeda-Montes MJ, Beltran-Debon R, et al. Resveratrol potentially counteracts quercetin starvation-induced autophagy and sensitizes HepG2 cancer cells to apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 2018;62
- 93 Yi Ji, Li Li, Yan Xia Ma, Wen-Ting Li, Liu Li, Heng-Zhou Zhu, Mian-Hua Wu, Jin-Rong Zhou Quercetin inhibits growth of hepatocellular carcinoma by apoptosis induction in part via autophagy stimulation in mice . *Journal of Nutritional Biochemistry* 69 (2019) 108-119.
- 94 Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (2013) 3448–3459
- 95 Mulcahy Levy JM, Towers CG and Thorburn A. Targeting Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 Sep; 17(9): 528–542
- 96 Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK and Yang JM: Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin*. 31:1154–1164. 2010
- 97 Lich Thi Nguyen, Yeon-Hee Lee, Ashish Ranjan Sharma, Jong-Bong Park, Supriya Jagga, Garima Sharma, Sang-Soo Lee, Ju-Suk Nam. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017 Mar; 21(2): 205–213. Published online 2017 Feb 21. doi: 10.4196/kjpp.2017.21.2.205
- 98 Hyeonji Kim, Jeong Yong Moon, Kwang Seok Ahn, Somi Kim Cho. Quercetin Induces Mitochondrial Mediated Apoptosis and Protective Autophagy in Human Glioblastoma

- U373MG Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 596496. Published online 2013 Nov 28. doi: 10.1155/2013/596496
- 99 Shena B, Shena C, Zhub W, Yuan H. The contribution of absorption of integral nanocrystals to enhancement of oral bioavailability of quercetin. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2021;11(4):978-988
- 100 Estrada-Villaseñor E, Valdés-Flores M, Meneses-García A, Silva-Bermudez P, 4 Raul Pichardo-Bahena R, Ostoa-Saloma P, Mercado-Celis G, Delgado-Cedillo E, Olivos-Meza A, Landa-Solís C. A novel model to culture cells from giant cell tumor of bone using three-dimensional (3D) polycaprolactone scaffold. *Eng Life Sci*. 2021;21:539–543.
- 101 Ushashi C. Dadwal ,y , Alyssa R. Merkel ,y , Jonathan M. Page , Kristin A. Kwakwa Michael Kessler and Julie A. Rhoades. 3D Bone Morphology Alters Gene Expression, Motility, and Drug Responses in Bone Metastatic Tumor Cells *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21, 6913; doi:10.3390/ijms21186913

Anexo 1.

No de Registro de Protocolo en el INR

	SALUD SECRETARÍA DE SALUD		Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra Comité de Investigación
		INRLGII/CI/314//2019. Ciudad de México, a 12 de agosto de 2019.	
D. EN C. CARLOS LANDA SOLÍS INVESTIGADOR PRINCIPAL PRESENTE			
En respuesta a la solicitud que usted envió a este Comité para la revisión del proyecto de investigación titulado: Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina en células aisladas de tumor de células gigantes utilizando un modelo tridimensional implantado en ratón atímico , le informo que el Comité de Investigación emitió el siguiente dictamen:			
Estatus del proyecto:	APROBADO		
Número de registro definitivo:	52/19		
Investigador Principal:	Carlos Landa Solís		
Investigadores Asociados:	Margarita Valdés Flores Luis Miguel Linares Víctor Cárdenas Eréndira Georgina Estrada Villaseñor Phaedra Suriel Silva Bermúdez Anell Olivos Meza Clemente Ibarra Ponce de León		
Es requisito informar los avances del protocolo, independientemente de la fecha de aprobación, en los meses junio y diciembre, en el formato F01-PR-DI-04 Hoja de Seguimiento de Protocolos de Investigación , el cual se encuentra disponible en la página electrónica del INRLGII, así como cualquier otro asunto relacionado con el mismo.			
En el caso de los protocolos que incluyan pacientes, un requisito adicional es dar cumplimiento a la <i>Encuesta de Satisfacción de Pacientes en Protocolo</i> , en el formato F01-PR-DI-08, que se encuentra disponible en la página del INR, en la sección de documentos ISO, en el apartado de Investigación: http://iso9001.inr.gob.mx/Descargas/iso/Formatos/F01-PR-DI-08.doc .			
1/2			
Calzada México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México, C.P. 14389 Tel. (55) 5999 1000 ext. 13260			

Anexo 2
Aprobación Comité de Ética


SALUD
 SECRETARÍA DE SALUD

Instituto Nacional
 de Rehabilitación
 Luis Guillermo Ibarra Ibarra
 Comité de Ética en Investigación

Número de registro:
CONBIOETICA-09-CEI-031-20171207

"2019. Año del Castillo del Sr. Emiliano Zapata"

Ciudad de México, a 25 de julio de 2019

ACUERDO CEI-111-ORD-2019

DICTAMEN DEL PROTOCOLO:

Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la quercetina en células aisladas de tumor de células gigantes utilizando un modelo tridimensional implantado en ratón atímico. Estudio piloto.

Investigación con riesgo mayor al mínimo. Art. 17 fracción III, RLGSMIS

Investigador principal: **D. en C. Carlos Landa Solís**

La investigación se llevará a cabo en: Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

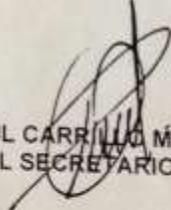
Documentos revisados:

a) Consentimiento Informado, versión 03

Dictamen: **APROBADO**

 **ATENTAMENTE**

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
PRESIDENTE

 **DR. PAUL CARRILLO MORA**
VOCAL SECRETARIO

Nota: El Comité de Ética en Investigación no actúa como verificador, por lo que el investigador principal, patrocinador u organización de investigación clínica, deben comprometerse a informarle cualquier circunstancia significativa para la protección de los sujetos.

Anexo 3
Aprobación CICUAL

<h1 style="margin: 0;">SALUD</h1>	 <p style="margin: 0;">Instituto Nacional de Rehabilitación <small>Luis Guillermo Ibarra Ibarra</small></p>
<p>COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO</p>	
<p>"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"</p>	
<p>Ciudad de México a 16 DE Agosto del 2019 CICUAL/005/2019 Asunto: Dictamen protocolo</p>	
<p>Para: Comité de Investigación</p>	
<p>Presente.</p>	
<p>Por este medio de este conducto, me permito informarle que las observaciones realizadas por este Comité Interno al proyecto de Investigación titulado "EFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÍMICO. ESTUDIO PILOTO" con número de registro 52/19, han sido realizadas, por lo cual no existe ninguna objeción para que dicho proyecto se lleve a cabo.</p>	
<p>Dictamen: Aprobado</p>	
<p>Sin otro en particular aprovecho la presente para enviarles un cordial saludo.</p>	
	
<p>MVZ/Hugo Lecona Butrón Secretario Técnico del CICUAL</p>	
<p>Anexo: archivo electrónico señalando con amarillo las nuevas modificaciones realizadas de acuerdo a las observaciones.</p>	

Anexo 4.

Consentimientos informados de los pacientes

Parte II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación médica **EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÍMICO**, llevada a cabo en la Unidad de Ingeniería en Tejidos y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Entiendo que mi tratamiento no se verá modificado por participar o no en esta investigación y que seguiré recibiendo la misma atención en caso de preferir no participar. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir solo la toma de un pequeño fragmento de tejido en fresco al momento de mi tratamiento quirúrgico. Sé que no obtendré beneficio alguno hacia mi persona y que no se me recompensará económicamente por participar. Se me han proporcionado los datos de los principales investigadores (nombre, ubicación, teléfono y correo electrónico) para contactarlos en caso de que me surgiera alguna duda o inquietud.

He leído la información proporcionada y me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente a las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de cambiar de opinión y no participar sin que afecte de manera alguna a mi cuidado médico.

Nombre del Participante Mario Alonso Molina Martínez

Firma del Participante Mario Alonso Molina Mtz

Fecha 10/10/2019

Correo electrónico o Núm. de teléfono 4681185130 (con la finalidad de que me sea comunicada la información obtenida en esta investigación médica)

Parte II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación médica **EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÍMICO**, llevada a cabo en la Unidad de Ingeniería en Tejidos y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Entiendo que mi tratamiento no se verá modificado por participar o no en esta investigación y que seguiré recibiendo la misma atención en caso de preferir no participar. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir solo la toma de un pequeño fragmento de tejido en fresco al momento de mi tratamiento quirúrgico. Sé que no obtendré beneficio alguno hacia mi persona y que no se me recompensará económicamente por participar. Se me han proporcionado los datos de los principales investigadores (nombre, ubicación, teléfono y correo electrónico) para contactarlos en caso de que me surgiera alguna duda o inquietud.

He leído la información proporcionada y me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente a las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de cambiar de opinión y no participar sin que afecte de manera alguna a mi cuidado médico.

Nombre del Participante Cesar Eduardo Lopez Hernandez

Firma del Participante  _____

Fecha Jueves 19 septiembre

Correo electrónico o Núm. de teléfono 963 670 1413 (con la finalidad de que me sea comunicada la información obtenida en esta investigación médica)

Parte II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación médica EFECTO ANTIPROLIFERATIVO, NECRÓTICO Y APOPTÓTICO DE LA QUERCETINA EN CÉLULAS AISLADAS DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES UTILIZANDO UN MODELO TRIDIMENSIONAL IMPLANTADO EN RATÓN ATÓMICO, llevada a cabo en la Unidad de Ingeniería en Tejidos y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Entiendo que mi tratamiento no se verá modificado por participar o no en esta investigación y que seguiré recibiendo la misma atención en caso de preferir no participar. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir solo la toma de un pequeño fragmento de tejido en fresco al momento de mi tratamiento quirúrgico. Sé que no obtendré beneficio alguno hacia mi persona y que no se me recompensará económicamente por participar. Se me han proporcionado los datos de los principales investigadores (nombre, ubicación, teléfono y correo electrónico) para contactarlos en caso de que me surgiera alguna duda o inquietud.

He leído la información proporcionada y me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente a las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de cambiar de opinión y no participar sin que afecte de manera alguna a mi cuidado médico.

Nombre del Participante

Javier Sotelo Hernández

Firma del Participante



Fecha

15 nov. 2019

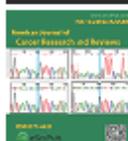
Correo electrónico o Núm. de teléfono 5503472813 (con la finalidad de que me sea comunicada la información obtenida en esta investigación médica)

Anexo 5. Artículo 1

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020,4:13

Review Article

AJCRR 2020,4:13



American Journal of Cancer Research and Reviews
(ISSN:2577-4425)



Giant Cell Tumor of Bone, current treatments, and potential therapeutic alternatives

Estrada-Villaseñor E.,¹ Meneses A.,² Valdés-Flores M.,³ Coutiño-Alcaraz JM.,⁴ Linares-González LM.,⁵ Olivos Meza A.,⁶ Ostoa-Saloma P.,⁷ Delgado Cedillo EA.,⁸ Landa Solís C.⁹

¹National Institute of Rehabilitation. Pathology Service. Mexico City, México. ²National Cancer Institute. Managing Director. Mexico City, Mexico. ³National Institute of Rehabilitation. Assistant Manager Clinical Research in genetic service. Mexico City, México. ⁴National Institute of Rehabilitation. Pathology Service. Mexico City, Mexico. ⁵National Institute of Rehabilitation. Bone Tumors Service. Mexico City, Mexico. ⁶National Institute of Rehabilitation. Arthroscopy Service. Mexico City, México. ⁷Postgraduate degree in Biological Sciences, National Autonomous University of Mexico, University City, Mexico, Mexico City. ⁸National Institute of Rehabilitation. Bone Tumors Service. Mexico City, Mexico. ⁹National Institute of Rehabilitation. Tissue Engineering and Cell Therapy Unit. Mexico City, Mexico.

ABSTRACT

Giant cell tumor of bone (GCTB) is a primary bone tumor, locally aggressive. For many, a GCTB is considered a tumor with an unpredictable behavior, particularly regarding recurrences, pulmonary implants, and the possibility of primary malignancy. In terms of risk of recurrence, it is known that it is associated with the type of treatment used initially for the GCTB. The greater the number or recurrences, the greater the risk of pulmonary implants, and the greater the risk of malignant degeneration. Therefore, much of the prognosis of this tumor could be related to the type of initial treatment. Hence the importance of the treatment theme. This review includes a comparison between the various modalities for treatment in GCTB, considering the advantages and disadvantages of each one. Existing GCTB treatments are not 100% safe and effective at the same time. and this is the reason why the search for other treatment modalities should continue to offer a better oncologic and functional outcome to patients. In the end of this review, based on research work, we also mention other possible therapeutic options that could be explored and used in the future for GCT treatment.

Keywords: Bone tumors, Giant cell tumor of bone, treatment, Denosumab, Bisphosphonates.

*Correspondence to Author:

Landa Solís C.

National Institute of Rehabilitation.
Tissue Engineering and Cell Therapy Unit. Mexico City, Mexico.

How to cite this article:

Estrada-Villaseñor E., Meneses A., Valdés-Flores M., Coutiño-Alcaraz JM., Linares-González LM., Olivos Meza A., Ostoa-Saloma P., Delgado Cedillo EA., Landa Solís C. Giant Cell Tumor of Bone, current treatments, and potential therapeutic alternatives. American Journal of Cancer Research and Reviews, 2020, 4:13.

 eSciPub
eSciPub LLC, Houston, TX USA.
Website: <https://escipub.com/>

INTRODUCTION

A giant cell tumor of bone [GCTB], first described in 1818 by Sir Astley Cooper^[1], is a primary bone tumor that is classified as an intermediate, locally aggressive but rarely metastasizing tu-

mor^[2,3]. The frequency of GCTB varies in different countries, being 5% in the United States of America^[4], 20% in China and India^[5, 6], and 17% in Mexico.^[7] Approximately 80% of the patients are between 20 and 50 years old, who constitute an economically active population^[8].

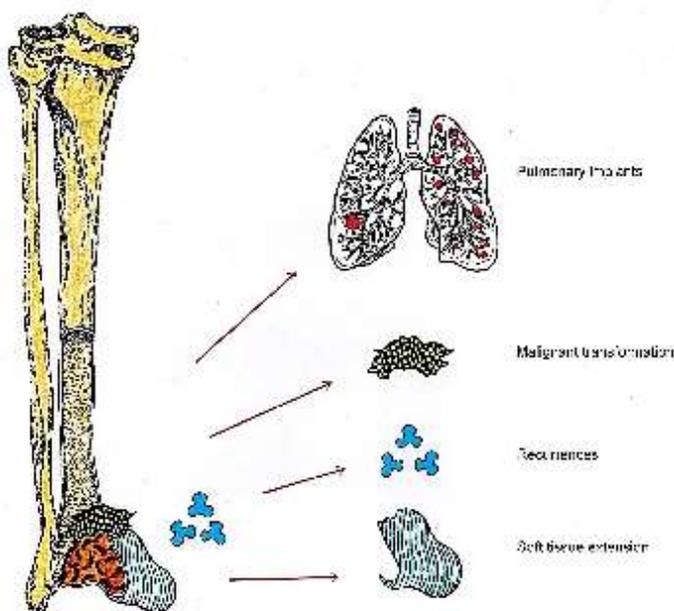


Fig. 1 Clinical presentation of the Giant Cell Tumor of Bone: 1]it can be only in the bone, 2] it can present wide spread to adjacent soft tissues, 3] one or multiple recurrences, 4] single or multiple lung implants or 5] malignant transformation.

GCTB are considered tumors with an unpredictable and varied behavior^[9], which can range from being just confined and limited to the bone, to extensive bone destruction, cortical expansion, invasion into soft tissues, one or multiple recurrences^[10], lung implants or even malignant transformation^[Fig. 1]^[11]. In terms of risk of recurrence, it is known to be associated with the type of treatment used initially for the GCTB^[12], and Campanacci's grade^[13, 14]. The surgery methods and soft tissue extension are potential risk factors for local recurrence. Recurrences lead to more aggressive surgical interventions and more complications. Hence the relevance of

treatment topic, and the reason for our literature review on various modalities of treatment in GCTB.

It is not possible to apply the same treatment for all the GCTB. In order to choose between the different treatment modalities, orthopedic oncologist must consider, principally, the location and the size of the tumor. Although, the initial clinical presentation [lung metastases or presence of recurrence], histology, the functional and oncologic outcome after the treatment chosen, secondary effects, and the patient's desire, are also taken into account in the treatment decision.

The purpose of this article is to provide an overview of the existing treatments for GCTB, with its advantages, disadvantages, and points where a consensus is missing. We also mention possible therapeutic options that have been underutilized.

TREATMENTS FOR GCTB

Studies have shown that treatments for GCTB were classified into three groups: 1) Surgical treatment, 2) Complementary therapies and, 3) Underexplored and novel therapies.

1) Surgical Treatment

Surgical treatment is considered the major treatment modality for GCTB. The goal of surgical treatment is the complete removal of the tumor, to preserve the function of the affected zone, and to avoid local recurrences that may lead to more surgeries. The surgical treatment of GCTB consists of two main procedures: en bloc resection and curettage.

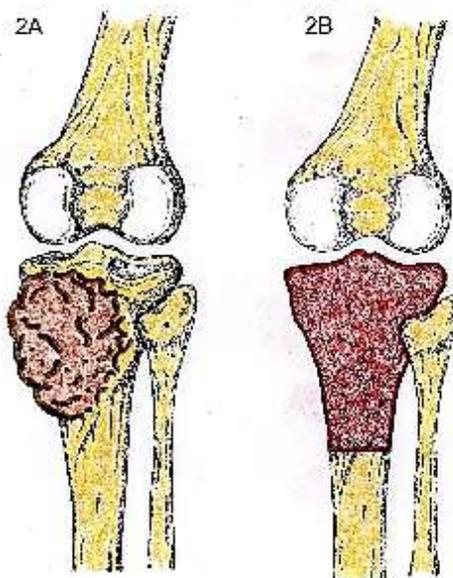


Fig. 2 Giant cell tumor of bone located in the proximal tibia [2A]. A representation of an en bloc resection of proximal tibia performed for the treatment of GCTB [2B].

En bloc resection: En bloc resection consists of removing the entire bone segment that contains the tumor, thus leaving a safety margin of healthy bone [Fig. 2]. After this treatment, although the tumor margins are free from a tumor, a bone defect [bone absence] is generated. So this procedure is usually followed by a reconstruction [regularly, a prosthesis]^[15].

This type of treatment is suggested: 1) when the tumor extends beyond the cortex and destroys it, by extending into the soft tissues; 2) in the presence of pathological fracture; 3) when the

articular surface has collapsed or it is impossible to preserve it; 4) after a previous ineffective surgery; or 5) when the GCTB has been diagnosed to be malignant after a histological diagnosis^[16].

Curettage:

This procedure is also known as intralesional excision and it is the most widely used surgical treatment for GCTB. It involves the creation of a bone window through which the intramedullary tumor is scraped to be removed [Fig. 3]. When the preservation of bone architecture or joint is

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

desired, intralesional excision, or curettage, is the most preferred procedure for this kind of tumor^[16]. However, tumor margins are unknown with this treatment and microscopic tumor can be left behind, which may lead to subsequent recurrences. After the tumor has been removed, the cavity can be left unfilled or it can be filled with cement or bone grafting.

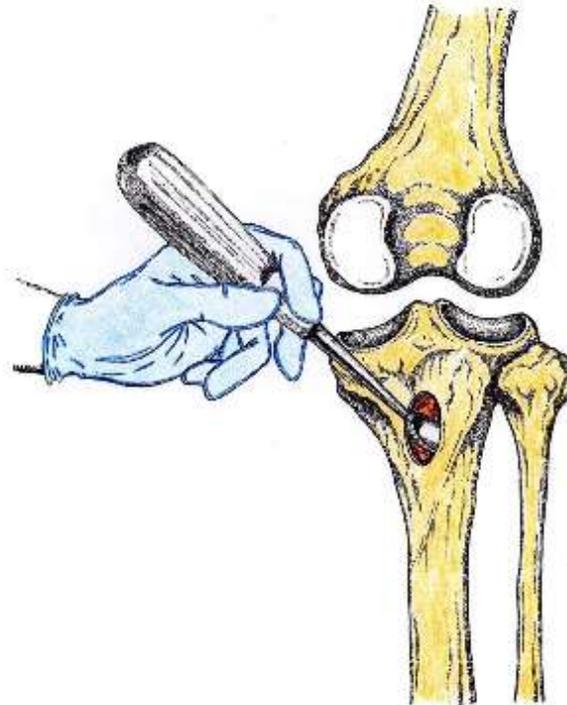


Fig. 3 In bone curettage a cortical hole is made, it is called a bone window. Through this, a curette is introduced in order to extract and remove all the visible tumor.

In order to reduce recurrences, curettage can be accompanied by adjuvants such as phenol, liquid nitrogen, high-speed burr, hydrogen peroxide, or methyl methacrylate. These adjuvants can be used individually or in combination^[17].

2) Complementary Therapies

Even though surgery remains the treatment of choice, carrying it out in certain locations such as spine, sacrum or pelvic bones, involves the risk of damaging nerve roots or nearby structures such as the bladder or colon. Due to the risk of these complications, non-surgical therapies are carried out, and include denosumab, selective arterial embolization, radiotherapy,

bisphosphonates, and interferon. Usually, these therapies are used as adjuvant treatment.

Denosumab

Denosumab, a human monoclonal antibody with an affinity for RANKL, blocks bone resorption by binding to RANKL, and preventing its interaction with RANK, a cell surface receptor on pre-osteoclasts and osteoclasts, thus inhibiting osteoclastogenesis^[18]. After the open-label, Phase 2 study reported by Thomas et al.,^[19] denosumab was approved as a therapy for GCTB.

Denosumab administration can modify the initial surgical treatment planned for GCTBs because it reduces the tumor size, and decreases the soft

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

tissue component. Patients that receive denosumab preoperatively, may not require an en-bloc resection of the tumor, and can be treated with curettage, which preserves the joint and articular surface^[20, 21]. Additionally, denosumab stops bone lysis, promotes tumor sclerosis, and peripheral new bone formation.

Current indications for the use of denosumab in GCTB include lesions in the spine, sacrum, pelvis, and challenging lesions in upper and lower-extremity locations^[22].

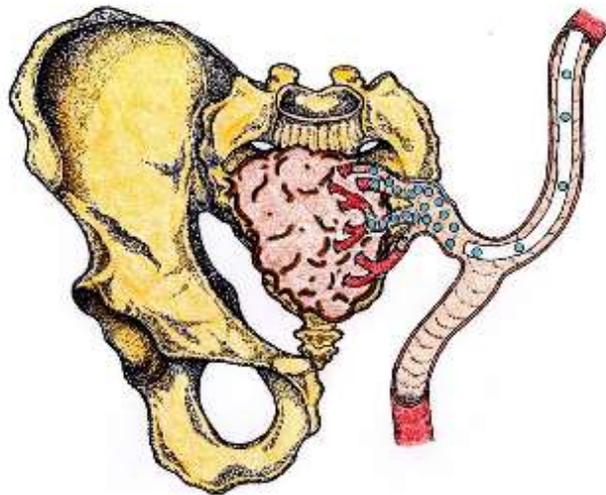


Fig. 4 This is an example of a GCTB located in the sacrum, in which SAE was the treatment of choice. In SAE, the blood supply of the tumor is obstructed embolizing the main arteries that feed the tumor.

Selective Arterial Embolization

For GCTB that are unresectable due to their location, such as sacrum, selective arterial embolization [SAE] can be used as the initial treatment. SAE has been used for the treatment of giant cell tumors of the sacrum since 1975 with positive results^[23]. In SAE the main arteries that feed the tumor are selectively embolized, after identifying and selecting the arteries with the help of angiography. The objective of SAE is to occlude the blood supply to the tumor, to stop its growth and allow, in case it is required or decided, a subsequent surgery with minimal bleeding [Fig. 4]. Generally, Gelfoam or morselized polyvinyl alcohol particles are used for peripheral occlusion and stainless steel coils for central

occlusion^[24]. Subsequent embolizations are performed until there is no evidence of collateral circulation^[25].

The observed and reported effects of SAE on GCTB are tumor size reduction, relief of symptoms [such as pain], and tumor ossification induction^[26]. SAE is usually used as a preoperative adjuvant treatment. However, there are case reports and case series of GCTB in the sacrum, in which SAE was the only therapy used^[27].

Radiotherapy

Of all the treatments available for GCTB, radiotherapy [RT] probably is the most controversial modality. This controversy has been existing for many years and originated with the publication

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

of cases with malignant transformation or severe osteoradionecrosis, and osteomyelitis after radiotherapy^[28]. Most of those published cases were from the '40s, in which generally orthovoltage of unknown intensity was used^[29]. As a result, radiotherapy was avoided in the past, for the treatment of GCTB. Nowadays megavoltage machines are used for RT that lead to the possibility of applying doses with less toxicity, along with sparing of healthy bone and vital structures^[30].

At present, radiotherapy [RT] has been used either postoperatively, or as a sole treatment in GCTBs, and is considered an alternative treatment in tumors with difficult surgical access, such as the spine^[31]. Radiation therapy has also proven to be an effective sole treatment especially for tumors smaller than 4 cm in diameter

and located in long bones, such as the femur, but not in larger tumors^[32].

Bisphosphonates

Bisphosphonates [BPs] have an affinity for hydroxiapatite crystals [HAP]. During bone resorption carried out by the osteoclast, the acidic pH in the resorption lacuna promotes dissociation of BPs from HAP. This is followed by endocytosis of BPs. In cytosol, nitrogen-containing BPs [N-BPs] inhibit the farnesyl pyrophosphate synthase [FPPS] and consequently the biosynthesis of cholesterol and other sterols. On the other hand, non-nitrogen-containing bisphosphonates [non-N-BPs] incorporate into analogs of adenosine triphosphate [aATP] affecting mitochondrial permeability and initiating caspase activation, causing apoptosis of osteoclasts [Fig. 5]^[33].

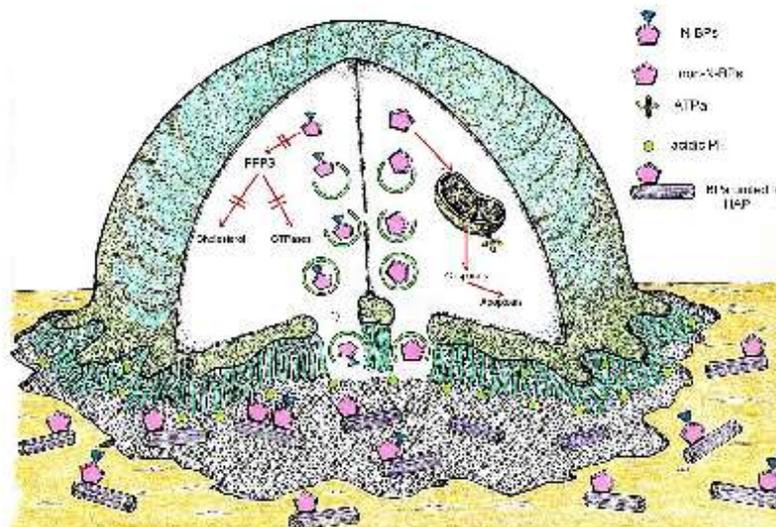


Fig. 5 Mechanism of action of the bisphosphonates in the osteoclast: endocytosis of the bisphosphonates by the osteoclast; N-BPs nitrogen containing bisphosphonates; Non-N-BPs non-nitrogen containing bisphosphonates; FPPS enzyme farnesyl pyrophosphate synthase; HAP hydroxyapatite crystals: ATPa analogs of adenosine triphosphate

Although bisphosphonates are still considered to be exploratory in GCTB therapy, their efficacy has been demonstrated *in vitro*^[34], *in vivo*^[35], and in patients^[36-38]. There are several reports regarding its use in GCTB, mainly as an adjuvant,

that demonstrate its effects from the clinical, radiological, and histological point of view. Pre-operative administration of BPs can reduce tumor size and prevent surgical dissemination.

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

The clinical response with BPs consists of a reduction of pain. The radiological changes consist of increased radiodensity within the lesion and in the periphery. BPs decrease the rate of tumor progression, and the rate of local bone destruction with no changes in tumor volume. Light microscopic examination performed after bisphosphonate therapy, shows an increase in apoptosis figures. Ultrastructural observations of specimens following bisphosphonates therapy, report pyknosis, nuclear fragmentation, and formation of blebs in the nuclear membrane^[39].

Interferon

Interferon-alpha 2a inhibits angiogenesis^[40]. Initially, it was reported to be effective in the case of generalized GCTB with pulmonary metastases^[41]. Later on, Interferon-alpha 2a was also reported as a stand-alone treatment in two cases of unresectable, recurrent, and metastatic giant cell tumors, originating from the spine^[42].

In the case of GCTB, interferon treatment is usually accepted as the last option for GCTB when other therapies such as SAE, surgery, and radiotherapy fail in treating the tumor^[41, 42].

It is not a standard therapeutic agent for GCTB.

3) Underexplored and novel therapies

Navigation guided En Bloc Resection is a novel technique. In this procedure, an osteotomy is carried out. Before performing the osteotomy, CT scans and MRI images are fused and used to determine tumor location, extension, and limits between tumor and uncompromised bone. With this technique, minimum healthy bone is removed along with the tumor and it is made sure that the surgical margins are free from any cancer cells^[43]. There is one study in which this procedure was used in GCTB^[44].

Bisphosphonate-loaded bone cement

There is a study in which the bone cement that was used to fill the osseous defect left by the curettage in GCTB, was loaded with bisphosphonate as adjuvant therapy for GCTB^[45]. The follow-up of this study was performed for 1 to 12 years and only one local recurrence was reported with this therapy. The authors mention in

their work that BP-loaded polymethylmethacrylate is a targeted local adjuvant therapy that is feasible, safe, and may reduce local recurrences while alleviating the risk of systemic side effects caused when BPs are administered systemically.

WHICH TREATMENT IS SAFEST FOR THE PATIENT?

The purposes of GCTB treatments are: 1] to eradicate the tumor, 2] to preserve function, and 3] to generate the least amount of secondary effects in the patient. However, these 3 objectives cannot be always achieved in the same proportion.

En bloc resection: Although low recurrence, and reoperation rates are associated with en bloc resection[oncologic outcome] as compared to intralesional excision^[46], this is not the first surgical option due to its functional limitations. With this type of treatment, depending on the location of the tumor, recurrences range from 0% to 5%. This treatment is followed by a major reconstruction procedure with complications related to the implant such as prosthetic subluxation, prosthetic loosening, necrosis, and infections associated with the extension of the surgery, which may lead to repeated surgery. Functional limitations with this type of treatment are greater as compared to curettage, according to studies reported by several authors^[47, 48].

Curettage: Curettage is the surgery of choice for GCTB. However, the recurrence rate with sole curettage is higher as compared to that observed in the case of en bloc resection and ranges from 40% to 65%^[49]. Curettage is the preferred surgical option because as compared to en bloc resection, it has fewer complications, better functional results, and preserves the joint. To reduce the recurrence rate, curettage can be accompanied by adjuvants such as phenol, liquid nitrogen, high-speed burr, hydrogen peroxide, or methyl methacrylate^[50]. However, there is no consensus about indications for the different adjuvants available^[51]. The local recurrence rate following curettage and high-speed burr is lower than that following sole curettage. The use of

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

high speed burring with another adjuvant also shows additional effects^[52]. Curettage when carried out in combination with phenol, shows a recurrence rate of 19%, with liquid nitrogen it shows a rate of 21%, with hydrogen peroxide the rate is evaluated to be 22%, with methyl methacrylate it exhibits a rate varying from 0-29%, and with phenol and methyl methacrylate the rate varies from 0-33%^[53, 54]. The lowest recurrence rate of 6% has been reported when liquid nitrogen and methyl methacrylate were used together^[55-57].

With the use of adjuvants, there is a significant decrease from 65% to 6% in the recurrence rate, as compared to when sole curettage was performed. Some adjuvants seem to be more efficient than others.

Denosumab:

There is controversy about the use of denosumab in GCTB because earlier studies reported an excellent clinical effect of denosumab on GCTB. However, a recent study shows that denosumab may increase the risk of local recurrence in patients treated with curettage, and in the histopathological evaluation of the samples viable tumor was observed^[58]. On the other hand, a systematic review that evaluated local recurrence rate, and development of lung metastasis in patients treated with denosumab, reported a neutral effect of denosumab on the metastatic rate of GCTB, and a recurrence rate similar to that observed after using extended curettage^[59]. Also, researchers have reported that 40% of patients discontinuing denosumab for GCTB have tumor progression after a median of 8 months^[60]. In addition, it is necessary to have a consensus regarding 1) the number of doses, and the treatment length, which may vary from 4 months to 55 months, and 2) the criteria for continuation or discontinuation of denosumab treatment. Furthermore, it is added the fact that there is a risk of malignant transformation^[61].

Selective arterial embolization

The complications reported after SAE are neurological such as unilateral weakness of ankle

dorsiflexion and transient numbness in the great toe.

A small amount of data has been published to date on the long-term follow-up of GCTB patients who have undergone selective arterial embolization. In the study conducted by Lin PP. et al., 65% of the patients did not show any evidence of progressive disease in the sacrum after 5 years of the treatment. After 10, 15, and 20 years, 57% of patients did not have any disease progression^[62].

For some authors, the number of embolizations sessions is based on clinical symptoms, radiographic response, and the vascularity of the tumor, therefore five embolizations are performed on an average. However, the SAE interval mentioned in related articles is not consistent and ranges from three to eight weeks. Standard guidelines are necessary for SAE in the case of GCTB regarding the number of embolizations, the interval between the sessions, and the proper time of stopping the treatment^[25].

Radiotherapy:

Malignant transformation continues to be a feared secondary effect, although recent studies do not report this complication^[63].

There are two studies that analyze patient cohorts undergoing treatment with RT for GCTB. The first study, reports that the cases undergoing irradiation for recurrent GCTB had worse prognosis than the primary GCTB cases^[64]. In the second report, it was found that the axial location showed a negative influence on local progression-free survival when compared with the GCTB cases of appendicular location^[31].

In the systematic review of Ma Y. et al, radiotherapy was evaluated in GCTB located in the spine. In this study, all patients received megavoltage and, exhibited a response to RT. In those patients who presented local failure within the two years after radiotherapy, the overall survival was 97.6 %, and the overall local control was 79%. In this systematic review, post-RT neurological complications were present in 9% of the patients. There were no cases with malignant

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

transformation. The difference between the effects of orthovoltage and megavoltage with respect to the local failure, as reported in previous studies was also discussed in this article, which varies from 7% to 30% with megavoltage and as high as 63% with orthovoltage^[65].

Bisphosphonates:

The secondary effects reported with BPs in patients with GCTB were a decrease in calcium levels, jaw osteonecrosis, fever and digestive upset.^[65] Apparently, the type of bisphosphonate and previous dental procedures, may act as precipitating factors for jaw osteonecrosis^[66].

BPs reduce the recurrence rate when administered after and before the surgery. The benefit reported when using BPs before surgical procedures [such as curettage] in extremities, is a decrease in recurrence rate as compared to the rate when sole surgical treatment is carried out, being 4.2% with BPs and 30% without BPs.^[37, 38] Apparently, there is no prognosis difference in patients who receive BPs before or after a surgical procedure, since both types of patients show positive outcomes to the treatment.

The studies that report atypical fractures are in patients receiving long-term [10 years] bisphosphonate therapy^[67]. BPs are not administered for so long in GCTB patients. In the case of jaw osteonecrosis, the length of exposure seems to be the most important risk factor for this complication^[68, 69], which has an average exposure time of 39 months.

If further research is conducted, routine use of bisphosphonates may become a standard for the adjuvant treatment of GCTB.

Navigation guided En Bloc Resection:

The use of this surgical alternative has not been proved accurately in GCTB. This technique results in more precise resections in order to obtain free margins, which are necessary to avoid local recurrences. In the bone tumor cases, treated with this modality, no recurrences have been reported^[44]. When compared with curettage, no differences are found in postoperative complications and functional scores, in the case

of both procedures. Patients undergoing this treatment might attain the benefit of a lower risk of recurrence without compromising the function. However, this procedure has been reported to increase surgical time and is expensive. Further studies are required to compare the cost-benefit of navigation-guided en bloc resection against repeated curettages or more extensive surgeries secondary to recurrences.

Bisphosphonate-loaded bone cement

This modality is novel and may be promising because bisphosphonates are administered only locally, in a lesser amount than when administered systemically, avoiding in this way the secondary and systemic effects^[45]. However, the indications for its application would be very specific, since it can only be used after curettage. Further studies are required as there is too little literature on the subject to discuss.

SUMMARY

The objectives of this review were to provide an overview of the existing treatments for GCTB, with its advantages, disadvantages, and indications, and also to mention possible therapeutic options that have been underutilized. During the conduct of this study, we found certain aspects of some treatments in which consensus is needed, and decided to mention them. At the end of this investigation, we can mention that although all the treatments have advantages, and disadvantages at the same time [Table 1], there is always a possibility of improving them. Thus, we conclude that we have not reached the endpoint of the process of exploring GCTB therapy.

Key Points

- GCTB is considered a tumor with an unpredictable behavior, with recurrences, pulmonary implants, and the possibility of primary malignancy.
- The treatments for GCTB were classified into three groups: 1] Surgical treatment, 2] Complementary therapies and, 3] Underexplored and novel therapies.

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

- All the GCTB treatments have advantages, and disadvantages at the same time, but it exists the possibility of improving them and develop new therapeutic strategies.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval for the study was not required, this article does not contain any studies performed on human participants, or animals, by any of the authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks David Quintero for the English language, grammar, punctuation, spelling and overall style, and Agustín Acosta Vargas for the figures design.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

We have read and understood Current Oncology's policy on disclosing conflicts of interest, and we declare that we have none.

AUTHOR AFFILIATIONS

[†]Pathology Service. National Institute of Rehabilitation, Mexico City, México. [‡]General management. National Cancer Institute, Mexico City, México. [§]Genetic service. National Institute of Rehabilitation, Mexico City, México. [¶]Bone Tumors Service. National Institute of Rehabilitation, Mexico City, México. ^{||}Arthroscopy Service. National Cancer Institute, Mexico City, México. [#]Postgraduate degree in Biological Sciences, National Autonomous University of Mexico, University City, Mexico City, Mexico. ^{**}Tissue Engineering and Cell Therapy Unit. National Institute of Rehabilitation, Mexico City, México.

Table 1 Treatment Modalities for Giant Cell Tumor of bone. Advantages and disadvantages

TREATMENT	ADVANTAGES	DISADVANTAGES	REFERENCES
En bloc resection	Surgical margins free 0-5% recurrences	Functional limitations	Jamshidi et al. [2018]
Curettage	Preserves the joint and good functional outcome	Tumor margins unknown and recurrence rate 40-60%	Wysocki et al. [2015]
Selective Arterial Embolization	An option for GCT difficult to access	Tissue necrosis of the affected region	Emori et al [2012]
Radiotherapy	An alternative for unresectable GCT	Neurological complications in 9% of the cases	Ma et al. [2015]
Biphosphonates	Reduce recurrence rate to 4.2%	Secondary effects: fever and digestive upset	Xu et al [2017]
Denosumab	Useful in unresectable GCT	Tumor progression in 40% of the cases after discontinuation	Palmerini et al [2017]
Interferon	An option for GCT in which other therapies have failed	No data reported	Wei et al [2010]

References

1. McCarthy EF. Giant-cell tumor of bone: an historical perspective. *Clin Orthop Relat Res.* 1980[153]:14-25.
2. Jo VY, Fletcher CD. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 [4th] edition. *Pathology.* 2014;46[2]:95-104. 10.1097/pat.0000000000000050
3. Roessner A, Smolle M, Haybäck J. [Giant cell tumor of bone : Morphology, molecular pathogenesis, and differential diagnosis]. *Pathologie.* 2020;41[2]:134-42. 10.1007/s00292-020-00780-5
4. Harrleson J. Bone tumors: general aspects and data on 6,221 cases. *Annals of Surgery.* 1980;191[4]:511.
5. Jain K, Sunila RR, Mruthyunjaya C, Gadiyar H, Manjunath G. Bone tumors in a tertiary care hospital of south India: A review 117 cases. *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology.* 2011;32[2]:82.

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

6. Liede A, Hernandez RK, Tang E-T, Li C, Bennett B, Wong SS, et al. Epidemiology of benign giant cell tumor of bone in the Chinese population. *Journal of bone oncology*. 2018;12:96-100.
7. Estrada-Villaseñor E, Linares-González L, Delgado-Cedillo E, González-Guzmán R, Rico-Martínez G. Prevalencia y características clínico-patológicas del tumor de células gigantes. *Acta ortopédica mexicana*. 2015;29[6]:295-8.
8. Niu X, Xu H, Inwards CY, Li Y, Ding Y, Letson GD, et al. Primary bone tumors: epidemiologic comparison of 9200 patients treated at Beijing Ji Shui Tan hospital, Beijing, China, with 10 165 patients at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2015;139[9]:1149-55.
9. Yang Y, Huang Z, Niu X, Xu H, Li Y, Liu W. Clinical characteristics and risk factors analysis of lung metastasis of benign giant cell tumor of bone. *J Bone Oncol*. 2017; 7: 23–8.
10. Klenke FM, Wenger DE, Inwards CY, Rose PS, Sim FH. Giant cell tumor of bone: risk factors for recurrence. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2011;469[2]:591-9.
11. Alberghini M, Kliskey K, Krenacs T, Picci P, Kindblom L, Forsyth R, et al. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Archiv*. 2010;456[1]:97-103.
12. Li D, Zhang J, Li Y, Xia J, Yang Y, Ren M, et al. Surgery methods and soft tissue extension are the potential risk factors of local recurrence in giant cell tumor of bone. *World journal of surgical oncology*. 2016;14[1]:114.
13. Cheng D-d, Hu T, Zhang H-z, Huang J, Yang Q-c. Factors affecting the recurrence of giant cell tumor of bone after surgery: a clinicopathological study of 80 cases from a single center. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;38[5]:1961-70.
14. Teixeira L, Vilela J, Miranda RH, Gomes AH, Costa FA, de Faria VC. Giant cell tumors of bone: nonsurgical factors associated with local recurrence. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2014;48[2]:136.
15. Rico-Martínez G, Linares-González L, Delgado-Cedillo E, Espejo-Sánchez G, Cerrada-Moreno L, Clara-Altamirano M. Long-term results of the treatment of a giant cell tumor with en-bloc resection and unconventional hip arthroplasty with ipsilateral knee arthrodesis. *Clinical case report and literature review. Acta Ortopédica Mexicana*. 2013;27[4]:250-5.
16. Saini R, Bali K, Bachhal V, Mootha AK, Dhillon MS, Gill SS. En bloc excision and autogenous fibular reconstruction for aggressive giant cell tumor of distal radius: a report of 12 cases and review of literature. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2011;6[1]:14.
17. Knochentumoren A. Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *JBJS*. 2008;90[5]:1060-7.
18. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96[7]:3540-5.
19. Thomas D, Henshaw R, Skubitz K, Chawla S, Staddon A, Blay J-Y, et al. Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: an open-label, phase 2 study. *The lancet oncology*. 2010;11[3]:275-80.
20. Rutkowski P, Ferrari S, Grimer RJ, Stalley PD, Dijkstra SP, Pienkowski A, et al. Surgical downstaging in an open-label phase II trial of denosumab in patients with giant cell tumor of bone. *Annals of surgical oncology*. 2015;22[9]:2860-8.
21. Traub F, Singh J, Dickson BC, Leung S, Mohankumar R, Blackstein ME, et al. Efficacy of denosumab in joint preservation for patients with giant cell tumour of the bone. *European Journal of Cancer*. 2016;59:1-12.
22. Thornley P, Habib A, Bozzo A, Evaniw N, Ghert M. The role of denosumab in the modern treatment of giant cell tumor of bone. *Jbjs Reviews*. 2017;5[4].
23. FELDMAN F, CASARELLA WJ, DICK HM, HOLLANDER BA. Selective intra-arterial embolization of bone tumors: a useful adjunct in the management of selected lesions. *American Journal of Roentgenology*. 1975;123[1]:130-9.
24. Nakanishi K, Osuga K, Hori S, Hamada K, Hashimoto N, Araki N, et al. Transarterial embolization [TAE] of sacral giant cell Tumor [GCT] using spherical permanent embolic material superabsorbant polymer microsphere [SAP-MS]. *Springerplus*. 2013;2[1]:666.
25. Hosalkar HS, Jones KJ, King JJ, Lackman RD. Serial arterial embolization for large sacral giant-cell tumors: mid-to long-term results. *Spine*. 2007;32[10]:1107-15.
26. He Sh, Xu W, Sun Zw, Liu Wb, Liu Yj, Wei Hf, et al. Selective arterial embolization for the treatment of sacral and pelvic giant cell tumor: a systematic review. *Orthopaedic Surgery*. 2017;9[2]:139-44.
27. Onishi H, Kaya M, Wada T, Nagoya S, Sasaki M, Yamashita T. Giant cell tumor of the sacrum treated with selective arterial embolization. *International journal of clinical oncology*. 2010;15[4]:416-9.
28. Stewart FW, Coley BL, Farrow JH. Malignant giant cell tumor of bone. *The American journal of pathology*. 1938;14[5]:515.

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

29. Ellis F. Treatment of osteoclastoma by radiation. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1949;31[2]:268-80.
30. Chakravarti A, Spiro IJ, Hug EB, Mankin HJ, Efrid JT, Suit HD. Megavoltage radiation therapy for axial and inoperable giant-cell tumor of bone. *JBJS*. 1999;81[11]:1568-73.
31. Ruka W, Rutkowski P, Morysiński T, Nowecki Z, Zdzienicki M, Makula D, et al. The megavoltage radiation therapy in treatment of patients with advanced or difficult giant cell tumors of bone. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2010;78[2]:494-8.
32. Miszczyk L, Wydmański J, Spindel J. Efficacy of radiotherapy for giant cell tumor of bone: given either postoperatively or as sole treatment. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2001;49[5]:1239-42.
33. Russell R, Watts N, Ebetino F, Rogers M. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international*. 2008;19[8]:733-59.
34. Chang SS, Suratwala SJ, Jung KM, Doppelt JD, Zhang HZ, Blaine TA, et al. Bisphosphonates may reduce recurrence in giant cell tumor by inducing apoptosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004;426:103-9.
35. Shibuya I, Takami M, Miyamoto A, Karakawa A, Dezawa A, Nakamura S, et al. In vitro study of the effects of denosumab on giant cell tumor of bone: comparison with zoledronic acid. *Pathology & Oncology Research*. 2019;25[1]:409-19.
36. Chaudhary P, Khadim H, Gajra A, Damron T, Shah C. Bisphosphonate therapy is effective in the treatment of sacral giant cell tumor. *Oncology Research and Treatment*. 2011;34[12]:702-4.
37. Tse LF, Wong KC, Kumta SM, Huang L, Chow TC, Griffith JF. Bisphosphonates reduce local recurrence in extremity giant cell tumor of bone: a case-control study. *Bone*. 2008;42[1]:68-73.
38. Xu W, Wang Y, Wang J, Yang X, Liu W, Zhou W, et al. Long-term administration of bisphosphonate to reduce local recurrence of sacral giant cell tumor after nerve-sparing surgery. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2017;26[6]:716-21.
39. Dubey S, Rastogi S, Sampath V, Khan SA, Kumar A. Role of intravenous zoledronic acid in management of giant cell tumor of bone-A prospective, randomized, clinical, radiological and electron microscopic analysis. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. 2019;10[6]:1021-6.
40. Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor-and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer research*. 1987;47[19]:5155-61.
41. Kaiser U, Neumann K, Havemann K. Generalised giant-cell tumour of bone: Successful treatment of pulmonary metastases with interferon α , a case report. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1993;119[5]:301-3.
42. Wei F, Liu X, Liu Z, Jiang L, Dang G, Ma Q, et al. Interferon alfa-2b for recurrent and metastatic giant cell tumor of the spine: report of two cases. *Spine*. 2010;35[24]:E1418-E22.
43. Young PS, Bell SW, Mahendra A. The evolving role of computer-assisted navigation in musculoskeletal oncology. *Bone Joint J*. 2015;97-b[2]:258-64. 10.1302/0301-620x.97b2.34461
44. Farfalli GL, Albergo JI, Piuze NS, Ayerza MA, Muscolo DL, Ritacco LE, et al. Is Navigation-guided En Bloc Resection Advantageous Compared With Intralesional Curettage for Locally Aggressive Bone Tumors? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2018;476[3]:511.
45. Greenberg DD, Lee FY. Bisphosphonate-loaded Bone Cement as a Local Adjuvant Therapy for Giant Cell Tumor of Bone. *American journal of clinical oncology*. 2019;42[3]:231-7.
46. Gitelis S, Mallin BA, Piasecki P, Turner F. Intralesional excision compared with en bloc resection for giant-cell tumors of bone. *The Journal of Bone and Joint surgery American Volume*. 1993;75[11]:1648-55.
47. Jamshidi K, Bahrabadi M, Bagherifard A, Mohamadpour M. Surgical treatment outcome of giant cell tumor of distal ulna: En bloc resection vs. curettage and bone graft. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2018;32:44.
48. Wysocki RW, Soni E, Virkus WW, Scarborough MT, Leurgans SE, Gitelis S. Is intralesional treatment of giant cell tumor of the distal radius comparable to resection with respect to local control and functional outcome? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2015;473[2]:706-15.
49. Errani C, Ruggieri P, Asenzio MAN, Toscano A, Colangeli S, Rimondi E, et al. Giant cell tumor of the extremity: a review of 349 cases from a single institution. *Cancer treatment reviews*. 2010;36[1]:1-7.
50. Errani C, Tsukamoto S, Ciani G, Donati DM. Present day controversies and consensus in curettage for giant cell tumor of bone. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. 2019;10[6]:1015-20.

Estrada-Villaseñor E. et al., AJCRR 2020, 4:13

51. Balke M, Schremper L, Gebert C, Ahrens H, Streitbuenger A, Koehler G, et al. Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2008;134[9]:969-78.
52. Dürr H, Maier M, Jansson V, Baur A, Refior H. Phenol as an adjuvant for local control in the treatment of giant cell tumour of the bone. *European Journal of Surgical Oncology*. 1999;25[6]:810-8.
53. Omlor GW, Lange J, Streit M, Gantz S, Merle C, Germann T, et al. Retrospective analysis of 51 intralesionally treated cases with progressed giant cell tumor of the bone: local adjuvant use of hydrogen peroxide reduces the risk for tumor recurrence. *World journal of surgical oncology*. 2019;17[1]:73.
54. Saiz P, Virkum W, Piasecki P, Templeton A, Shott S, Gitelis S. Results of giant cell tumor of bone treated with intralesional excision. *Clinical Orthopaedics and Related Research [1976-2007]*. 2004;424:221-6.
55. Abdelrahman M, Bassiony AA, Shalaby H, Assal MK. Cryosurgery and impaction subchondral bone graft for the treatment of giant cell tumor around the knee. *HSS journal*. 2009;5[2]:123-8.
56. Alkalay D, Kollender Y, Mozes M, Meller I. Giant cell tumors with intraarticular fracture Two-stage local excision, cryosurgery and cementation in 5 patients with distal femoral tumor followed for 2–4 years. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1996;67[3]:291-4.
57. Wittig JC, Simpson BM, Bickels J, Kellar-Graney KL, Malawer MM. Giant cell tumor of the hand: superior results with curettage, cryosurgery, and cementation. *The Journal of hand surgery*. 2001;26[3]:546-55.
58. Scoccianti G, Totti F, Scorianz M, Baldi G, Roselli G, Beltrami G, et al. Preoperative Denosumab with curettage and Cryotherapy in Giant cell tumor of bone: is there an increased risk of local recurrence? *Clinical orthopaedics and related research*. 2018;476[9]:1783.
59. Luengo-Alonso G, Mellado-Romero M, Shemesh S, Ramos-Pascua L, Pretell-Mazzini J. Denosumab treatment for giant-cell tumor of bone: a systematic review of the literature. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2019;139[10]:1339-49.
60. Palmerini E, Chawla N, Ferrari S, Sudan M, Picci P, Marchesi E, et al. Denosumab in advanced/unresectable giant-cell tumour of bone [GCTB]: for how long? *European Journal of Cancer*. 2017;76:118-24.
61. Broehm CJ, Garbrecht EL, Wood J, Bocklage T. Two cases of sarcoma arising in giant cell tumor of bone treated with denosumab. *Case reports in medicine*. 2015;2015.
62. Lin PP, Guzel VB, Moura MF, Wallace S, Benjamin RS, Weber KL, et al. Long-term follow-up of patients with giant cell tumor of the sacrum treated with selective arterial embolization. *Cancer*. 2002;95[6]:1317-25.
63. Caudell JJ, Ballo MT, Zagars GK, Lewis VO, Weber KL, Lin PP, et al. Radiotherapy in the management of giant cell tumor of bone. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2003;57[1]:158-65.
64. Ma Y, Xu W, Yin H, Huang Q, Liu T, Yang X, et al. Therapeutic radiotherapy for giant cell tumor of the spine: a systemic review. *European Spine Journal*. 2015;24[8]:1754-60.
65. Shi M, Chen L, Wang Y, Wang W, Zhang Y, Yan S. Effect of bisphosphonates on local recurrence of giant cell tumor of bone: a meta-analysis. *Cancer Management and Research*. 2019;11:889.
66. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *The Journal of the American Dental Association*. 2009;140[10]:1259-65.
67. Sellmeyer DE. Atypical fractures as a potential complication of long-term bisphosphonate therapy. *Jama*. 2010;304[13]:1480-4.
68. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol*. 2005;23[34]:8580-7.
69. Migliorati CA, Woo S-B, Hewson I, Barasch A, Elting LS, Spijkervet FK, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis [BON] in cancer. *Supportive care in cancer*. 2010;18[8]:1099-106.



Anexo 6. Artículo 2

Received: 5 February 2021 | Revised: 9 June 2021 | Accepted: 21 June 2021

DOI: 10.1002/elsc.202100020

Engineering

in Life Sciences

SHORT COMMUNICATION

A novel model to culture cells from giant cell tumor of bone using three-dimensional (3D) polycaprolactone scaffold

Eréndira Estrada-Villaseñor¹ | Margarita Valdés-Flores² |
 Abelardo Meneses-García³ | Phaedra Silva-Bermudez⁴ | Raul Pichardo-Bahena¹ |
 Pedro Ostoa-Saloma⁵ | Gabriela Mercado-Celis⁶ | Ernesto D. Delgado-Cedillo⁷ |
 Anell Olivos-Meza⁸ | Carlos Landa-Solis⁴ 

¹ Pathology Service, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico² Genetics Laboratory, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico³ Pathology Service, National Cancer Institute, Mexico City, Mexico⁴ Tissue Engineering and Cell Therapy Unit, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico⁵ Department of Immunology, Institute of Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico⁶ Laboratory of Clinical Genomics, Division of Graduate Studies and Research, Faculty of Odontology, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico⁷ Bone Tumors Service, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico⁸ Sports Orthopedics and Arthroscopy, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico

Correspondence

Carlos Landa Solis, Tissue Engineering and Cell Therapy Unit, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Calzada México-Xochimilco 289 CP 14389, Mexico City, Mexico.
 Email: clanda@inr.gob.mx

Abstract

Two-dimensional (2D) culture of cells from giant cell tumor of bone (GCTB) is affected by loss of the multinucleated giant cells in subsequent passages. Therefore, there is limited time to study GCTB with all its histological components in 2D culture. Here, we explored the possibility of culturing GCTB cells on a polycaprolactone (PCL)-printed scaffold. We also evaluated the viability of the cultured cells and their adherence to the PCL scaffold at day 14 days using immunofluorescence analysis with calcein, vinculin, and phalloidin. Using the histological technique with hematoxylin and eosin staining, we observed all the histological components of GCTB in this 3D model. Immunohistochemical assays with cathepsin K, p63, and receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) yielded positive results in this construct, which allowed us to confirm that the seeded cells maintained the expression of GCTB markers. Based on these findings, we concluded that the PCL scaffold is an efficient model to culture GCTB cells, and the cell viability and adherence to the scaffold can be preserved for up to 14 days. Moreover, this model can also be used in subsequent studies to

Abbreviations: GCTB, giant cell tumor of bone; 2D, two dimensional; 3D, three dimensional; PCL, polycaprolactone

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by Wiley-VCH GmbH

assess in vitro cell–cell interactions and antineoplastic efficacy of certain agents to establish a treatment against GCTB.

KEYWORDS

3D PCL scaffold, 3D tumor models, giant cell tumor of bone

Giant Cell Tumor of Bone (GCTB) is a primary bone tumor and is classified as an intermediate, locally aggressive, but rarely metastasizing tumor. GCTB comprises three types of cells: (1) multinucleated osteoclast-type giant cells, (2) mononuclear stromal cells, and (3) monocyte-like cells. Multinucleated giant cells of this tumor are capable of bone resorption and osteolysis. Stromal cells secrete cytokines and factors essential for osteoclast differentiation and also secrete cytokines that attract monocytes by chemotaxis [1,2]. Stromal cells are considered the proliferative and neoplastic component of GCTB, and multinucleated giant cells along with monocytes are considered the reactive components [2]. Therefore, GCTB is a tumor prototype wherein cell–cell interactions are essential for differentiation of its cellular components and consequently its progression.

Two-dimensional (2D) in vitro models have been used to clarify histogenesis, composition, and biological behavior of GCTB and to compare its therapeutic response of GCTB [3–5]. However, in 2D cultures, cells interact only with their adjacent cells as there are no other cells or extracellular matrix present above or below them. Another characteristic of 2D cultures is that cells are exposed homogeneously to nutrients and drugs in the medium.

Conversely, three-dimensional (3D) culture models more accurately recreate the in vivo microenvironment and cell behavior conditions than 2D models. 3D models show cell–cell interactions, access of cells to nutrients, and protein expression different from those observed in 2D models. Additionally, 3D-printed scaffolds which were initially used in tissue engineering to support bone regeneration, are now used to study the behavior and protein expression of tumor cells and to evaluate the efficacy of antineoplastic drugs [6]. Among these, polycaprolactone (PCL) scaffolds provide a surface that allows adherence and growth of neoplastic cells such as those from osteosarcoma, breast cancer, or Ewing sarcoma [7–9].

For GCTB, only 2D models have been used in vitro, which is limited by loss of multinucleated giant cells in subsequent passages. Once the primary culture becomes confluent and passaging is necessary, each passage leads to a gradual loss of multinucleated giant cells. With multiple passages, the end result is a monolayer of fibroblast-like cells, which are morphologically distinct from the original histological components observed in GCTB [3–5]. There-

fore, there is only a limited time frame to study a GCTB with all its histological components in 2D culture. This led us to explore a novel culture model for GCTB cells, using a 3D-printed PCL scaffold, wherein not only can all the histological components be observed but the 3D arrangement of neoplastic cells can also be recreated.

The main aims of this study were as follows: (1) to explore the possibility of culturing GCTB cells on a PCL scaffold, (2) to evaluate viability of the cultured cells and their adherence at day 14, (3) to determine whether it is possible to observe all the histological components of GCTB using this 3D model, and (4) to explore if this model can be used to study GCTB cell culture using other techniques.

The protocol used in this study was approved by the Research and Ethics Committee of our Institution. All patients provided informed consent to participate in this study. Tissue samples were collected from the patients upon diagnosis of GCTB during surgery but without previous treatment.

A sterile technique was employed to obtain the tumor tissue samples for culture it. We first determined the number of cells present in 5 mm³ of three tumor sample each and calculated the average number of cells; based on this, we assessed the number of cells seeded when using 5mm³ of tumor tissue. For this purpose, 5 mm³ of tumor tissue was mechanically segregated into small pieces using sterile scissors and a scalpel, and thereafter, enzymatically digested using 0.3% collagenase (Worthington) and shaken at 200 rpm for 2 h at 37°C. The cells were filtered through a 100 μ cell filter and subsequently quantified using the Neubauer chamber. The average number of cells in 5 mm³ of tumor tissue sample was 1,745,333.

We used the REGEMAT 3D Bioprinting system (Universidad de Granada, Spain) to prepare the scaffold using a pellet of PCL. The scaffold was printed with the following specifications: pore size of 850 μ, total of seven layers with strand thickness of 200 μm, flow rate of 1, without solid perimeter, printing angle of 90°, without a solid base, and forming a 5 × 5 mm³ cube on each face. For sterilization of the PCL scaffold, we were cautious that the melting temperature of PCL (58–60°C) should not be reached and used a SterradNx medical sterilizer. Scaffolds were subjected to one cycle of sterilization at 30°C. This is a chemical method

PRACTICAL APPLICATION

Three-dimensional (3D) polycaprolactone printed scaffolds can be used to culture and analyze cells from giant cell tumor of bone (GCTB), with the possibility of using immunohistochemistry. Future research using this model will allow the study of cell-cell interactions and cell-matrix interactions in GCTB. Additionally, comparative studies on cell proliferation and protein expression can be conducted between this 3D model and two-dimensional (2D) models along with drug tests to identify potential treatment candidates. The 3D disposition of the cells in this model would allow study differential protein expression in cells based on their tumor location (periphery or central portion), and mechanisms of growth and invasion to adjacent structures. This would further allow research of the type of cells that populate first the adjacent structures of the tumor and the underlying mechanisms by which the other histological components of the tumor arrive at the periphery.

of sterilization that uses plasma/hydrogen peroxide vapor. However, there are other chemical methods that can be used for this process, such as ethylene oxide [10].

For cell seeding, 5 mm³ of tumor tissue sample was used for each PCL scaffold. GCTB tissue was mechanically homogenized, using in addition to scissors and a scalpel, medium to preserve cell viability during this process. Once a smooth consistency was obtained, the suspension was collected in a 2 mL pipette. Next, the tip of the pipette was placed in direct contact with the scaffold, and its content was slowly and carefully released, yielding a construct (Figure 1A). The constructs were placed in six well culture plates with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. These were then stored in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide (CO₂) atmosphere. The medium was replaced every 3 days until day 14.

Two weeks after the GCTB cells were seeded in the PCL scaffold, the construct was stained with calcein (Cayman chemical) to determine the cell viability on the scaffold. For this, the construct was incubated in a six well plate (Corning) for 30 min with DMEM plus 0.2 mg/mL of calcein in an incubator at 37°C supplied with 5% CO₂. Thereafter, the culture medium with calcein was replaced with complete culture medium (DMEM, 10% serum and 1% antibiotic/antimycotic). Images were immediately recorded using an inverted microscope with

an ultraviolet (UV) lamp (Carl Zeiss; Axiovert 25; software image vision 4.8.2). The GCTB cells seeded on the PCL scaffold were found to be positive to calcein, which confirmed their viability (Figure 1B). Calcein positivity was observed in the cytoplasm of the cells attached to the PCL fibers as well as the cells that grew between the PCL fibers.

To determine the extent of cell adhesion on the scaffold, 2 weeks after the GCTB cells were seeded, the construct was stained using Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit (Merck Millipore). The construct was fixed, incubated with primary and secondary antibodies, and washed according to the manufacturer's instructions. The images were immediately recorded using a pyramidal microscope attached with a UV lamp (Carl Zeiss; Imager A1 AX10; software image vision 4.8.2). The cultured cells were positive for vinculin and phalloidin. Further, upon staining with DAPI, the nuclei in the fibers were observed to be arranged in groups and also present individually (Figure 1C). Based on these results, we confirmed cell adherence to the PCL fibers as well as occurrence of cell-cell and cell-matrix interactions.

Although fluorescence was observed in both the central and peripheral portions of the scaffold, the photomicrographs for cell viability (Figure 1B) and cell adhesion (Figure 1C), were captured in the periphery of the scaffold, owing to the high cell density in the central portion of the scaffold that did not allow to appreciate the fluorescence in a clear way on this zone. From the observations in Figures 1B and 1C, we concluded the following: (1) the cells that grew out from the original tumor were viable and could adhere to the PCL scaffold, and (2) most of the cells that predominate in this peripheral area of the scaffold at 14 days were mononucleated and most likely correspond to the stromal cells or monocytes of the GCTB. These findings are important for future research using this 3D model as they would allow further investigation of how the tumor grows and invades adjacent tissues. Finally, with this 3D model, we could assess the type of cells that primarily populate adjacent tissues of the tumor and the underlying mechanisms through which the other histological components of the tumor arrive at the periphery.

For hematoxylin and eosin staining, the constructs were fixed using 10% neutral-buffered formalin for 1 h, followed by dehydration in graded alcohol solutions. Thereafter, they were placed in 50% alcohol-50% xylene for 30 min, followed by two changes of liquid paraffin (1 h each) at 55°C. Finally, they were embedded in paraffin blocks. A microtome (model RM2165, Leica Microsystems) was used to cut the paraffin blocks into 5- μ m thick sections. The slides were deparaffinized and hydrated in water, stained with hematoxylin for 5 min and eosin for 1 min, dehydrated in graded alcohol solutions, cleared with xylene, and then mounted. Histological analysis of the constructs using hematoxylin and eosin staining revealed

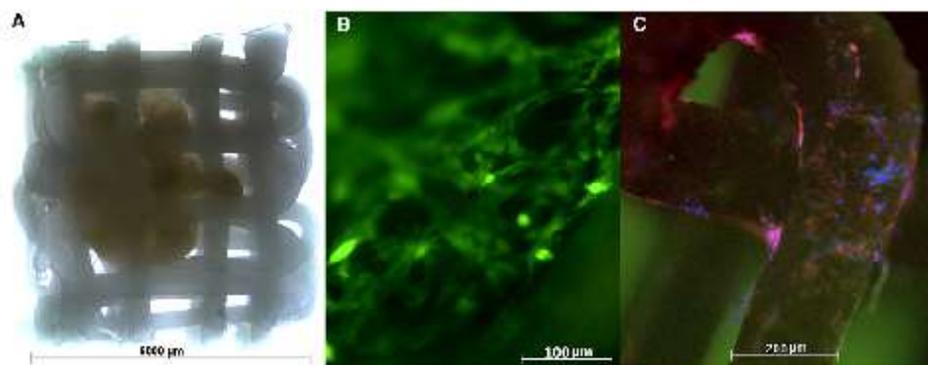


FIGURE 1 (A) Photomicrograph with stereoscopic microscope of initially giant cell tumor of bone (GCTB) seeded cells on polycaprolactone (PCL) scaffold. (B) Immunofluorescence for calcein in the periphery of PCL scaffolds with GCTB cells after 14 d of culture. Viable cells are marked in green (40x). (C) Immunofluorescence for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), vinculin, and phalloidin in the periphery of the PCL scaffolds with GCTB cells after 14 d of culture. The nuclei are arranged in groups and individually. Cells are positive for vinculin and phalloidin (20x)

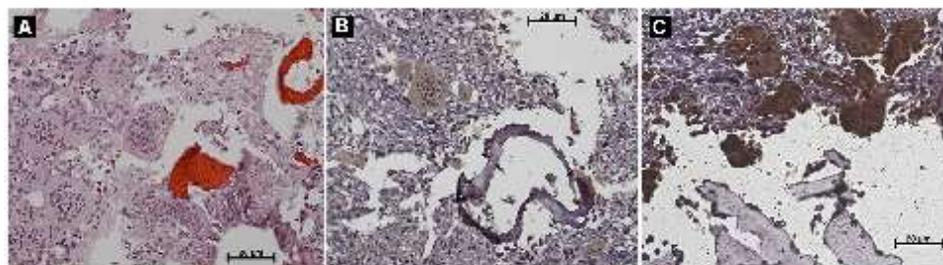


FIGURE 2 (A) Hematoxylin and eosin staining of polycaprolactone (PCL) scaffolds with giant cell tumor of bone (GCTB) cells (40x). The PCL fibers are shown in reddish-orange color. The PCL fibers are alternating with multinucleated giant cells, stromal cells, and monocytes Polycaprolactone fibers, multinucleated giant cells. (B) Immunostaining for p63 showing positivity in the nuclei of some stromal cells (40x). (C) Immunostaining for cathepsin K showing intense positivity in the cytoplasm of multinucleated giant cells (40x)

the presence of viable neoplastic cells and all histological components of GCTB in the scaffolds, including the multinucleated osteoclast-type giant cells, stromal cells with spindled nuclei, and monocytes. With this technique, we observed morphological preservation and verified that there was no loss of multinucleated giant cells, typically observed in 2D cultures during subsequent passaging (Figure 2A). A possible explanation for the absence of multinucleated giant cell loss could be that in the PCL scaffold, 3D arrangement of the cells allows greater interaction among cells, accompanied by stronger and longer-lasting effect of the cytokines and differentiating factors secreted by stromal cells, which are essential for osteoclast differentiation. It could also be possible that in this 3D model, the cytokines remain localized in the scaffold microenvironment, thereby favoring the differentiation and permanence of multinucleated giant cells

instead of being dispersed as could happen in 2D cultures.

We next performed immunohistochemistry analysis to determine whether this model could be useful to study GCTB cell culture with other techniques and confirmed that the observed cells were not only morphologically GCTB cells but also expressed typical GCTB markers, such as p63, cathepsin K and RANKL [11–13]. The primary antibodies used included mouse monoclonal anti-p63 (1:200, Sta Cruz Biotechnology) mouse monoclonal anti-RANKL (1:150 Sta Cruz Biotechnology), and mouse monoclonal anti-cathepsin K (1:200 Sta Cruz Biotechnology). The Mouse/Rabbit ImmunoDetector DAB Detection System (Bio SB) was used. Instructions were followed according to the manufacturer. The positive control included sections of GCTB from the archives of the Anatomic Pathology service. The immunohistochemistry assays for p63 and RANKL yielded positive results in stromal cells, whereas

the assay for cathepsin K yielded positive result in the cytoplasm of multinucleated giant cells (Figure 2B and Figure 2C). We therefore confirmed the cultivation of GCTB cells in the PCL scaffold and also the possibility of using other techniques, such as immunohistochemistry, in the study of GCTB cultured cells, in the PCL scaffold.

The results of this study demonstrate that the GCTB cells can be cultured in 3D printed scaffolds of PCL for 14 days, conserving their viability and adherence and without the loss of multinucleated giant cell, which is typically observed in conventional 2D culture systems. Further, this model offers the possibility of using other techniques, such as immunohistochemistry, to investigate GCTB cells. However, although PCL scaffolds can simulate bone porosity and stiffness, a more bone-like environment can be achieved using 3D PCL scaffolds coated with calcium phosphate/hydroxyapatite material or printed with type I collagen materials. This way, the extracellular matrix that would be interacting with the seeded cells on the scaffold would be more like the bone. Therefore, further studies could be done using these coated scaffolds to elucidate cell-cell and cell-extracellular matrix interactions in a more representative microenvironment.

In conclusion, to the best of our knowledge, this study demonstrated for the first time that 3D printed PCL scaffolds can be used for culturing GCTB cells, as they preserve the viability, adherence, morphology, and all the histological components of this tumor. This model also facilitates the use of techniques such as immunohistochemistry in the study of GCTB cells. Therefore, this model could be a better option than 2D models to study GCTB cells, to learn about cell-cell interactions and to test new therapeutic drugs against GCTB.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is a part of the doctoral thesis of Estrada-Villaseñor E., student of the Doctoral Program in Medical Sciences at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). We thank Enrique Gómez Orozco, Naxielly Reyes Medina, and Bertha Vargas for the technical support in the histological techniques, paraffin embedding PCL scaffolds, and hematoxylin and eosin staining.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Carlos Landa-Solis  <https://orcid.org/0000-0002-0680-8516>

REFERENCES

1. Wulling, M., Engels, C., Jesse, N., Werner, M., et al., The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127, 467–474.
2. Cowan, R.W., Singh, G. Giant cell tumor of bone: a basic science perspective. *Bone.* 2013, 52, 238–246.
3. Burmester, G.R., Winchester, R.J., Dimitriu-Bona A., Klein M., et al., Delineation of four cell types comprising the giant cell tumor of bone. Expression of Ia and monocyte-macrophage lineage antigens. *J Clin Invest.* 1983, 71, 1633–1648.
4. Komlya, S., Sasaguri, Y., Inoue, A., Nakashima, M., et al., Characterization of cells cultured from human giant-cell tumors of bone. Phenotypic relationship to the monocyte-macrophage and osteoclast. *Clin Orthop Relat Res.* 1990, 258, 304–309.
5. Lau, C.P.Y., Huang L., Wong, K.C., Kumta, S.M. Comparison of the anti-tumor effects of denosumab and zoledronic acid on the neoplastic stromal cells of giant cell tumor of bone. *Connect Tissue Res.* 2013, 54, 439–449.
6. Xu, X., Farach-Carson, M.C., Jia, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv.* 2014, 32, 1256–1268.
7. Müller, W. E., Toiba, E., Schröder, H. C., Diehl-Seifert, B., et al. Biosilica-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers mats provide a morphogenetically active surface scaffold for the growth and mineralization of the osteoclast-related SaOS-2 cells. *Biotechnol J.* 2014, 9, 1312–1321.
8. Rijal, G., Bathua, C. h., Li, W. Application of synthetic polymeric scaffolds in breast cancer 3D tissue cultures and animal tumor models. *Int J Biomater.* 2017;2017:8074890.
9. Fong, E. L., Lamhamed-Cherradi, S. E., Burdett, E., Ramamoorthy, V., et al., Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110, 6500–6505.
10. Chobetra, R., Phillips, C., Dectercq, H., Cools, P., et al., Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioreponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. *Biomed Mater.* 2017;12(1):015017.
11. Lee, C. H., Espinosa, I., Jensen, K. C., Subramanian, S., et al., Gene expression profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. *Mod Pathol.* 2008, 21, 531–539.
12. Lindeman, J. H. N., Hanemaaijer, R., Mulder, A., Dijkstra, P. D. S., et al. Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. *Am J Pathol.* 2004, 165, 593–600.
13. Wang, T., Yin, H., Wang, J., Li, Z., et al. MicroRNA-106b inhibits osteoclastogenesis and osteolysis by targeting RANKL in giant cell tumor of bone. *Oncotarget.* 2015, 6, 18980–18996.

How to cite this article: Estrada-Villaseñor E., Valdés-Flores M., Meneses-García A., Silva-Bermudez P., Pichardo-Bahena R., Ostoa-Saloma P., et al. A novel model to culture cells from giant cell tumor of bone using three-dimensional (3D) polycaprolactone scaffold. *Eng. Life Sci.* 2021, 21, 539–543. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100020>

Anexo 7. Artículo 3



Ultrastructural Pathology

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iusp20>

Ultrastructural changes in giant cell tumor of bone cultured cells exposed to quercetin

Eréndira Estrada-Villaseñor, Andres Delgado-Cedillo, Alma Hernández-Pérez, Abelardo Meneses, Anell Olivos Meza, Alberto Bravo Hidalgo, Mónica Santamaría & Carlos Landa Solís

To cite this article: Eréndira Estrada-Villaseñor, Andres Delgado-Cedillo, Alma Hernández-Pérez, Abelardo Meneses, Anell Olivos Meza, Alberto Bravo Hidalgo, Mónica Santamaría & Carlos Landa Solís (2021): Ultrastructural changes in giant cell tumor of bone cultured cells exposed to quercetin, *Ultrastructural Pathology*, DOI: [10.1080/01913123.2021.1979704](https://doi.org/10.1080/01913123.2021.1979704)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01913123.2021.1979704>



Published online: 08 Oct 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 32



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iusp20>

Ultrastructural changes in giant cell tumor of bone cultured cells exposed to quercetin

Eréndira Estrada-Villaseñor^a, Andres Delgado-Cedillo^b, Alma Hernández-Pérez^c, Abelardo Meneses^d, Anell Olivos Meza^e, Alberto Bravo Hidalgo^f, Mónica Santamaría^g, and Carlos Landa Solís^h

^aPathology Service, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra Ibarra, México City, México; ^bBone Tumors Service, National Institute of Rehabilitation, Mexico City, Mexico; ^cElectronic Microscopy Laboratory, National Institute of Rehabilitation, Mexico City, Mexico; ^dPathology Service, National Cancer Institute, Mexico City, Mexico; ^eArthroscopy Service, National Institute of Rehabilitation, Mexico City, Mexico; ^fGenetic Laboratory, National Institute of Rehabilitation Luis Guillermo Ibarra, México City, México; ^gTissue Engineering and Cell Therapy Unit, National Institute of Rehabilitation, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Giant cell tumor of bone (GCTB) is a primary bone tumor that affects skeletally mature people and whose main treatment is surgical. Because there are few pharmacological alternatives for the treatment of this tumor to find other molecules or compounds that could be potential therapeutic agents is desirable. Quercetin is a flavonoid with described antitumoral effect in different types of cancer cell lines that could be a possible option in GCTB treatment. However, there is no literature about the effect of quercetin on GCTB. In the present paper, we reported the ultrastructural changes in GCTB cells exposed to quercetin and also determined the expression of RIP1K, Caspase 3 and Caspase 8 on the exposed cells. For this purpose, GCTB sample was obtained from one patient and cultured. Quercetin affected all the histological components of the GCTB. The ultrastructural changes consisted mainly in necroptosis, autophagocytosis and secondary necrosis. This is the first report about quercetin effects on giant cell tumor of bone cultured cells. Further studies in other models could be done to support the use of quercetin as a complementary treatment in giant cell tumor of bone.

Abbreviations: Giant cell tumor of bone (GCTB); transmission electron microscopy (TEM); reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR); receptor interacting protein kinase 1 (RIP1K); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).

ARTICLE HISTORY

Received 19 July 2021
Revised 20 August 2021
Accepted 8 September 2021

KEYWORDS

Giant cell tumor of bone;
culture; quercetin;
ultrastructure; necroptosis

Introduction

Giant cell tumor of bone (GCTB) is a primary bone tumor that affects most common people between 20 and 50 years. The epiphysis of long bones is its principal location; however, GCTB can affect other bones such as sacrum that are sites of difficult surgical access. The treatment for GCTB is mainly surgical, with limitations in case of inaccessible locations and with some disadvantages.¹ There are few complementary and pharmacological alternatives for the treatment of this tumor: denosumab and bisphosphonates. Both, with the possibility of secondary effects such as mandibular osteonecrosis and atypical fractures with bisphosphonates or malignant transformation with denosumab.^{2,3} Therefore, to find other molecules or compounds that could be potential therapeutic

agents and whose administration has no secondary effects is desirable in order to offer a better outcome to the patients. Quercetin could be a potential therapeutic agent for GCTB.

Quercetin is a flavonoid present in the human diet with anticancer properties. Its main dietary sources are fruits and vegetables such as apples, onions, berries and broccoli.⁴ The anticancer properties of Quercetin have been described recently in several studies that explain its effect in different types of cancer cell lines such as prostate, breast, liver, leukemia, lung, pancreas and colon cancer.^{5–10} Among the anticancer properties described of Quercetin are its anti-proliferative and pro-apoptotic effects. The anti-proliferative effect of Quercetin is by causing cell cycle arrest at certain checkpoints, specifically in G1 or G2/M

phase.¹¹ Whereas the apoptotic effect is by mediating both the intrinsic and the extrinsic pathways.¹²

Based on these findings, we hypothesized that quercetin might have an antitumoral effect on cultured cells from GCTB.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the ultrastructural changes in GCTB cultured cells exposed 24 h to quercetin and to determine with RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) the expression of Caspase-3, Caspase 8 and RIP1K (receptor interacting protein kinase 1) in these cells, as markers of apoptosis and necroptosis.

Material and methods

Prior authorization for the protocol from the Research and Ethics committees of the Institution, as well as the informed consent from the patient, GCTB tissue was collected during surgery.

MTT assay

Since there was no previous literature about at what concentration quercetin has an effect on cultured GCTB cells, Quercetin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using MTT colorimetric assay. The 96-well culture plates were used, and in each well 1.5×10^4 cells were seeded. Quercetin was added to the treatment group for 4 hours at concentrations ranging from 20 to 150 μ M. The control group was incubated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) without quercetin. Cytotoxicity was determined by adding 1 ml MTT solution to each well, and the mixture was incubated for 4 hours at 37°C in a CO₂ incubator. Subsequently, the supernatant was removed and 100 μ L of isopropanol was added. The absorbance reading was performed in a spectrophotometer (Model 680 Microplate Reader) at a wavelength of 540 nm. The giant cell tumor of bone culture viability of the treated samples was then compared with the control samples. It was found that with a concentration of 120 μ M 50% of the cultured cells were viable and 50% of the cultured cells died. Therefore, once

determined that the IC₅₀ for GCTB was 120 μ M, for the next experiment, a quercetin concentration of 120 μ M was used.

Cell culture and exposition to quercetin

Fresh tissue from GCTB was mechanically disaggregated into small pieces using sterile scissors and also a scalpel. Once the tissue had a homogeneous and semi-liquid consistency, it was placed in 162 cm² Cell Culture Flasks with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. The Flasks were kept in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide (CO₂) atmosphere. The medium was replaced every 3 days until the cultures were 80% confluent. Quercetin was subsequently added at a concentration of 120 μ M on the experimental cells. Control cells were cultured under identical conditions, but without the addition of quercetin. After 24 hours the cells were harvested with a cell scraper.

Transmission electron microscopy

Collected cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. After two washes of 10 minutes in sucrose-phosphonate buffer, cells were post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO₄) for 30 min under a hood, at room temperature. Then, cells were embedded in Epon 812 resin mixture. Half-micron sections were stained with toluidine blue and examined in the light microscope for orientation. Selected areas were thin-sectioned, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Phillips Tecnai 10 electron microscope at the Department of Electron Microscopy.

Quantitative real-time PCR analysis

To determine the expression level of RIP1K, Caspase 3 and Caspase 8, SYBR green-based quantitative real-time PCR was performed using a StepOnePlus Real-Time PCR thermal cycler (Applied Biosystems™) and the Applied Biosystems Software version 1.3. The collected cells previously frozen at -80°C were defrosted and the total RNA was extracted using TRIzol*

Table 1. Sequences of primers that were used in the RT-PCR.

Gene	Sense	Antisense
HPLR27	CTGGGAAGGTGGTCTTGT	TAGCGGTCAATCCAGCCAC
Rip1k	TGGGCGTCATCATAGAGGAAG	CGCCTTTCCATGTAGTAGCA
Caspase 8	ATTGCGCTGTATGCCCGAGC	CCTGAGTGAGTCTGATCCACAC
Caspase 3	AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC	ACAGTCCAGTCTGTACCAGC

reagents (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized using the QuantiTect[®] ReverseTranscription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. Real-time quantitative RT-PCR was performed using the Sybr green premix kit (BioRad). The sequences of primers that were used in this assay are shown in Table 1:

One cycle of reverse transcription was carried out for 15 min at 42°C and one cycle of denaturation for 3 min at 95°C. The PCR conditions were as following: 40 cycles of denaturation for 15 s at 95°C, followed by annealing and elongation for 30 s at 58–61°C (depending on the primer's melting temperature). All reactions were performed in triplicate. Relative mRNA quantification was performed using the $\Delta\Delta CT$ method and the results were normalized to the

expression of the housekeeping gene (HPLR27) and presented as a fold difference relative to a calibrator sample (untreated cells).

Statistical analysis

To analyze mRNA expression a statistical analysis was performed using the SPSS for Windows, V. 15.0 software. The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to compare the differences between control and treatment groups. The significance level was set to $p < .05$. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD).

Results

Transmission electron microscopy

We evaluated by TEM two types of cells: unexposed cells to quercetin (control group) and exposed cells to quercetin (experimental group):

Control multinucleated giant cells

In the control group, we observed multinucleated giant cells that were ovoid with a varying number of nuclei and with a nuclear chromatin finely dispersed. In some cells, nucleoli was present. Round-

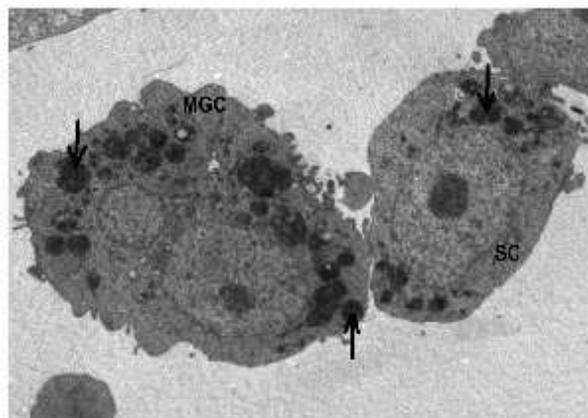


Figure 1. Transmission electron microscopy image showing cultured cells from giant cell tumor of bone unexposed to quercetin. There is a multinucleated giant cell (MGC) with two nuclei and a stromal cell (SC). Both have cytoplasmic inclusions (arrows).

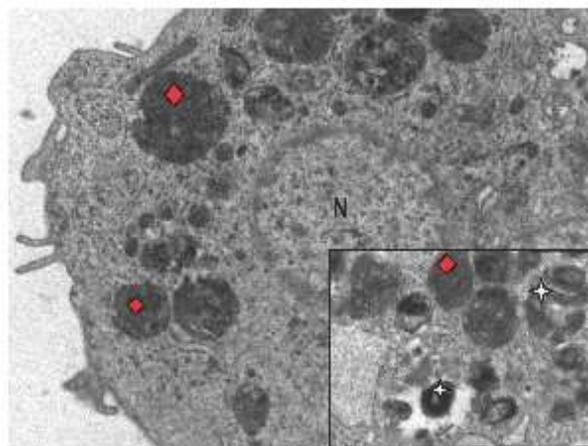


Figure 2. Transmission electron microscopy image showing a portion of a multinucleated giant cell with inclusions in the cytoplasm, of different sizes. N: nuclei. Inset shows high resolution of these cytoplasmic inclusions. The structures considered residual bodies are labeled with . The structures considered dense bodies are labeled with .

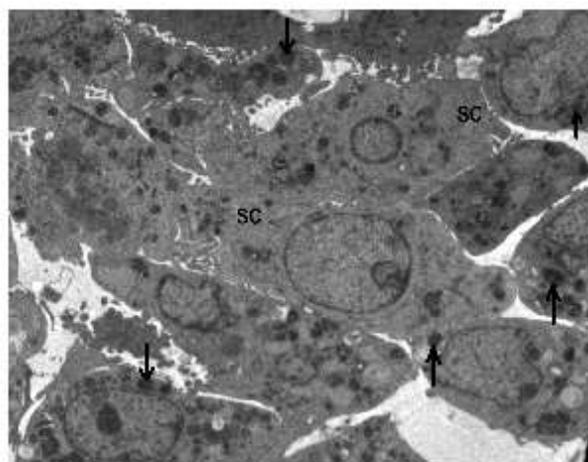


Figure 3. Transmission electron microscopy image of control group, showing closely apposed mononuclear stromal cells (SC) with membrane microvilli and nucleus with finely dispersed chromatin. The cytoplasm contains numerous dense bodies (arrows).

shaped cytoplasmic inclusions were observed (Figure 1). With higher magnification, we observed that some of these cytoplasmic inclusions contained membranous material (residual bodies), while others contained dense material (dense bodies) (Figure 2).

Control stromal cells

In the control group, the stromal cells were elongated and contained one nucleus. Their cell membranes had microvilli. The nucleus, mitochondria and RER presented no alterations. Numerous dense bodies were observed in the cytoplasm (Figure 3).

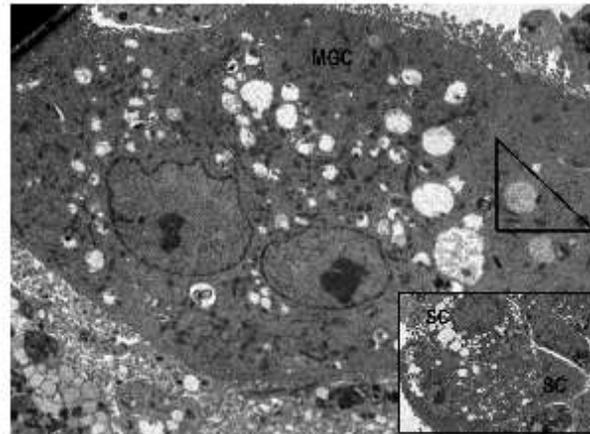


Figure 4. Transmission electron microscopy showing a multinucleated giant cell (MGC) with multiple clear vacuoles as well as autophagolysosomes. The rectangle shows two mononuclear stromal cells (SC) with vacuoles of different sizes in their cytoplasm.

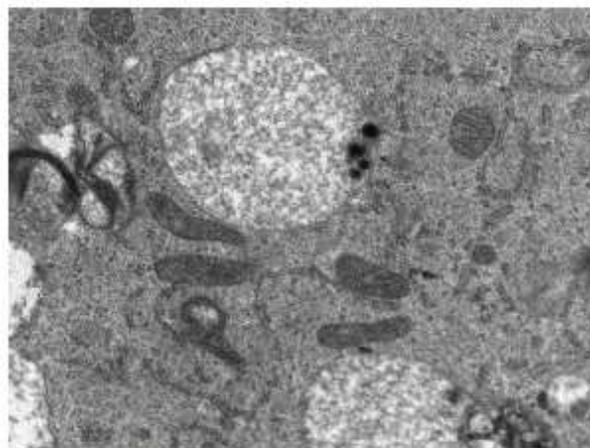


Figure 5. Magnification of the triangle in Figure 4. The image shows a spherical structure with membrane and with cytoplasmic material inside (autophagolysosome).

Multinucleated giant cells (experimental group)

Cells treated with quercetin showed multiple changes. Multinucleated giant cells showed numerous vacuoles in the cytoplasm (Figure 4) and a moderate amount of autophagolysosomes (Figure 5).

Stromal cells (experimental group)

Stromal cells showed in the membrane microvilli decrease with flattening. In the cytoplasm RER dilatation and swollen mitochondria with cristae disorganization and electron dense deposits and in the nuclei chromatin condensation

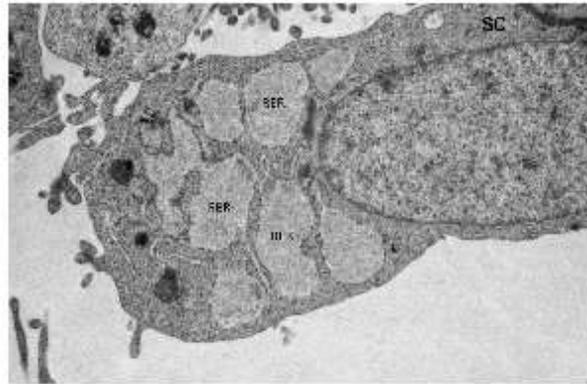


Figure 6. Transmission electron microscopy image showing a stromal cell exposed to quercetin with flattening of the cell membrane and RER dilatation.

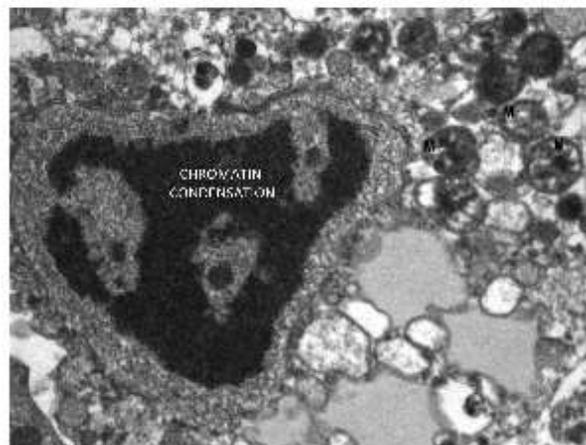


Figure 7. Transmission electron microscopy image showing a nucleus with chromatin condensation. The mitochondria (M) present cristae disorganization and dense deposits.

(Figure 6 and Figure 7). Some cells showed dilatation of the perinuclear space (Figure 8 and Figure 9).

In most of the cells exposed to quercetin there was secondary necrosis: loss of membrane integrity with loss of intracellular contents and the intracellular organelles were not discernible. Nuclear fragments corresponding to condensed chromatin were observed (Figure 10).

The ultrastructural changes observed in the GCTB exposed cells to quercetin are summarized in Table 2.

RT-PCR

There were differences in the expression of Caspase 3, Caspase 8 and RIP1K between the treated cells and the control cells. We observed that the gene with the

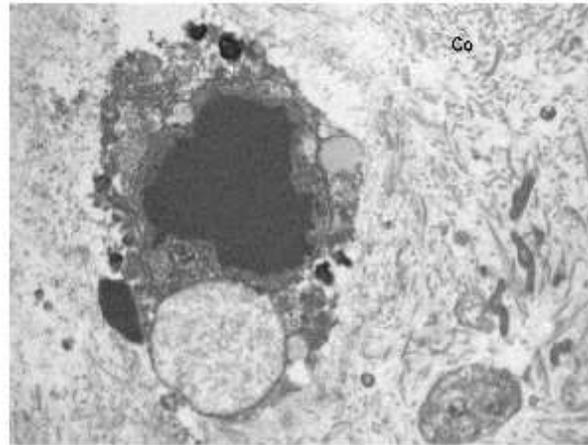


Figure 8. Transmission electron microscopy image showing a nucleus with dilatation of the perinuclear space. There is collagen-like material in the extracellular space (Co).

highest expression in cells exposed to quercetin was Caspase 8, being expressed 11.5 times more compared to control cells ($p = .014$) (Figure 11). On the other hand, Caspase 3 was expressed 1.7 times more in the treated cells compared to the control cells ($p = .435$) (Figure 12). Finally, the gene with the lowest expression in the treated cells was RIP1K with a 0.5 fold expression compared with control cells ($p = .629$) (Figure 13).

Discussion

The objective of our study was to evaluate the ultrastructural changes in GCTB cultured cells exposed 24 h to quercetin, and to determine with RT-PCR the expression of Caspase-3, Caspase-8 and RIP1K.

We found that quercetin affected both multinucleated giant cells and stromal cells, and that the ultrastructural changes consisted in

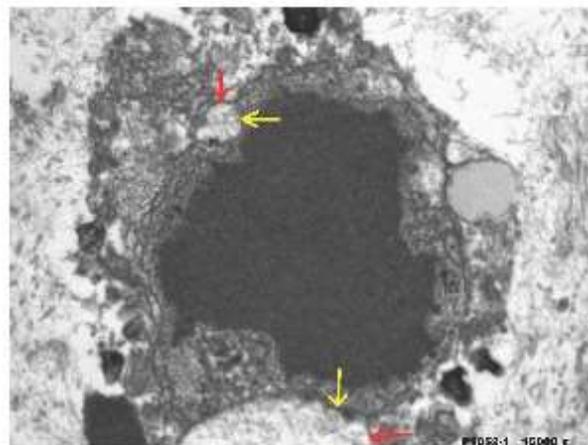


Figure 9. Higher magnification of Figure 8. The yellow arrow points to the inner nuclear membrane and the red arrow points to the outer nuclear membrane.

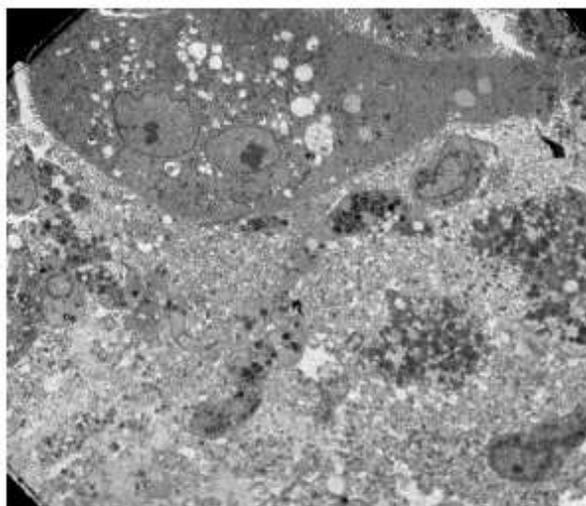


Figure 10. Transmission electron microscopy image showing in most of the observed cells, secondary necrosis. At the top of the photograph is a cell viable cell with vacuoles in the cytoplasm.

Table 2. Ultrastructural findings of GCTB cultured cells exposed to quercetin.

	Blebbing of plasma membrane	RER dilatation	Cytoplasm vacuoles	Perinuclear space dilatation	Chromatin condensation	Secondary necrosis
Control cells	-	-	-	-	-	-
Exposed cells	+	+	++	+	++	+++

membrane microvilli decrease, RER dilatation, swollen mitochondria with cristae disorganization, nuclei with chromatin condensation and dilatation of the perinuclear space. In most of the cells exposed to quercetin there was secondary necrosis. Table 2.

There was a higher expression of Caspase 3, Caspase 8 and RIP1K in the exposed cells compared to control cells. Although without being statistically significant in our study, the overexpression of RIP1K in tumoral cells undergoing necroptosis has been only recently described.¹³

Besides apoptosis, there are other forms of programmed cell death, such as necroptosis.¹⁴ It has been described that Quercetin, in addition to apoptosis, can also induce necroptosis in tumoral cells.¹⁵ In our study, most of the ultrastructural features mentioned, with the

exception of autophagocytosis, have been previously observed in cells undergoing necroptosis. According to Miyake S et al, dilatation of the perinuclear space is the hallmark of necroptosis.¹⁶ Yoon S and Zhang T mention in their study that cytoplasmic membrane damage gives rise to cytoplasmic vacuoles and that nuclear membrane damage gives rise to dilatation of the perinuclear space.^{17,18}

On the other hand, it has been described in recent studies that autophagy can regulate programmed cell death, including apoptosis and necroptosis, and that there is also an overlap between autophagy, necroptosis and apoptosis.^{19,20} Other reports describe that Quercetin induces overexpression of caspase-8, and also that it is a potent autophagy inducer in cancer cells.²¹ Our results coincide with these previous studies by observing a statistically

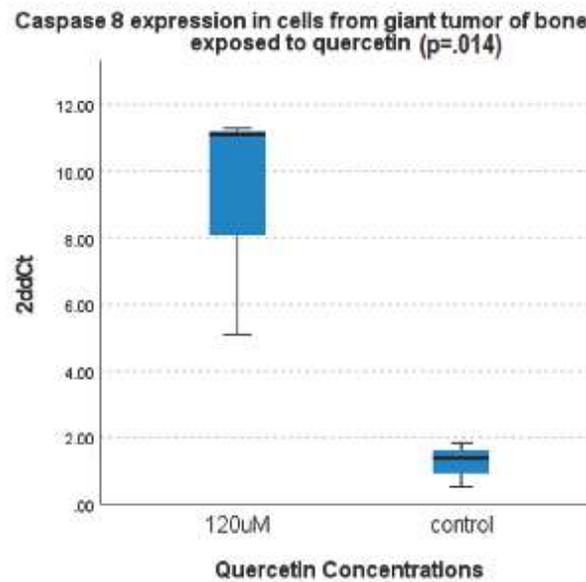


Figure 11. Caspase 8 expression in control cells and in cells exposed 24 h to 120 μ M Quercetin.

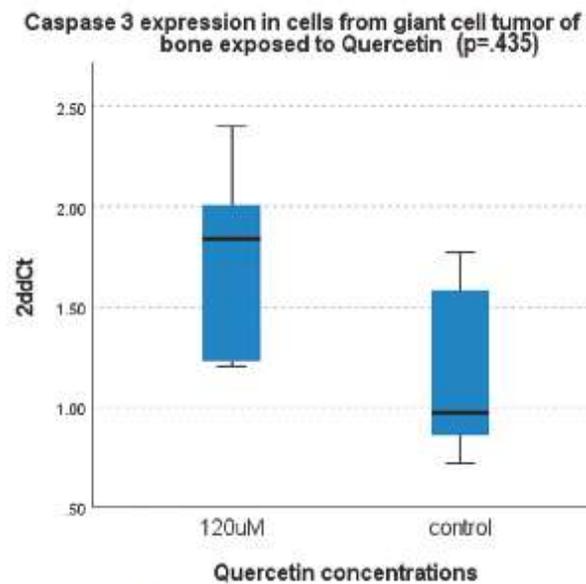


Figure 12. Caspase 3 expression in control cells and in cells exposed 24 h to 120 μ M Quercetin.

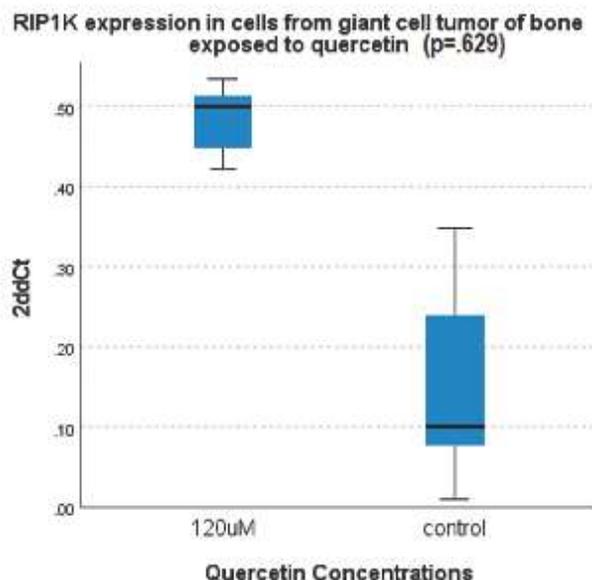


Figure 13. RIP1K expression in control cells and in cells exposed 24 h to 120 µM Quercetin.

significant overexpression of Caspase 8 in the exposed cells and by obtaining ultrastructural evidence of the autophagy process.

We consider of great importance to mention that unlike the drugs available for the treatment of GCTB, like bisphosphonates and denosumab, in which the absence of multinucleated giant cells and persistence of stromal cells after treatment has been observed histologically,²² the ultrastructural changes observed in this study were observed in both the multinucleated giant cells and the stromal cells, which means that quercetin affected all the histological components of the GCTB.

Our study has two limitations. One limitation is that the time of observation was 24 h after the quercetin exposure. This could be the reason why the predominant observed ultrastructural change was secondary necrosis, and why earlier changes, as for example the transition between the RER-dilatation, vacuole formation and cytoplasmic vacuolization were not observed. The other limitation is the statistical significance. We consider that with larger number of samples evaluated a statistical significance in the RT-PCR could be achieved.

However, this is the first study that reports quercetin effects on cultured cells from GCTB and that provides ultrastructural evidence of its necroptotic and autophagic effect on these cells.

Further, *in vitro* and *in vivo* studies could analyze other aspects of the effect of quercetin on GCTB.

Conclusion

The ultrastructural changes observed in GCTB cells were observed in both the multinucleated giant cells and the stromal cells. The ultrastructural changes in giant cell tumor of bone cultured cells exposed 24 h to quercetin corresponded mainly to secondary necrosis, necroptosis and also autophagocytosis.

Acknowledgments

This research is part of the doctorate of Estrada-Villaseñor E.

We want to thank the academic program "Programa de maestría y doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud" of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Disclosure

This study was not sponsored by any pharmaceutical company or foundation.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

Eréndira Estrada-Villaseñor  <http://orcid.org/0000-0002-6349-8956>

Anell Olivos Meza  <http://orcid.org/0000-0002-7008-0945>

Alberto Bravo Hidalgo  <http://orcid.org/0000-0003-2506-8784>

Mónica Santamaría  <http://orcid.org/0000-0003-4100-9346>

Carlos Landa Solís  <http://orcid.org/0000-0002-0680-8516>

References

- Estrada-Villaseñor E, Meneses A, Valdés-Flores M, et al. Giant cell tumor of bone, current treatments, and potential therapeutic alternatives. *Am J Cancer Res Rev.* 2020;4:1-13.
- Arbolea L, Alperi M, Alonso S. Efectos adversos de los bisfosfonatos. *Reumatol Clín.* 2011;7(3):189-197. doi:10.1016/j.reuma.2010.10.005.
- Alaqaili SI, Abduljabbar AM, Altaho AJ, Khan AA, Alherabi JA. Malignant sarcomatous transformation of benign giant cell tumor of bone after treatment with denosumab therapy: a literature review of reported cases. *Cureus.* 2018 Dec 28;10(12):e3792. doi:10.7759/cureus.3792.
- Escamilla Jiménez CI, Cuevas Martínez EY, Fonseca JG. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 2009;52:73-75.
- Rauf A, Imran M, Ali Khan I, et al. Anticancer potential of quercetin: a comprehensive review. *Phytother Res.* 2018;32:1-22.
- Seo HS, Ku JM, Choi HS, et al. Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2016;36:31-42.
- Guan X, Gao M, Xu H, et al. Quercetin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles for the targeted treatment of liver cancer. *Drug Deliv.* 2016;23:3307-3318.
- Shi H, Li XY, Chen Y, et al. Quercetin induces apoptosis via downregulation of vascular endothelial growth factor/Akt signaling pathway in acute myeloid leukemia cells. *Front Pharmacol.* 2020Dec10; 11: 534171. doi:10.3389/fphar.2020.534171. eCollection 2020
- Xingyu Z, Peijie M, Dan P, et al. Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting aurora B kinase. *Cancer Med.* 2016 Nov;5(11):3156-3165. doi:10.1002/cam4.891.
- Pang B, Xu X, Lu Y, et al. Prediction of new targets and mechanisms for quercetin in the treatment of pancreatic cancer, colon cancer, and rectal cancer. *Food Funct.* 2019 Sep 1;10(9):5339-5349. doi:10.1039/c9fo01168d.
- Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem.* 2009;106:73-82.
- Hashemzadei M, Delarami Far A, Yari A, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2017 Aug;38(2):819-828. doi:10.3892/or.2017.5766.
- Gong Y, Fan Z, Luo G, et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer.* 2019;18:100. doi:10.1186/s12943-019-1029-8.
- Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22:263-268.
- Khorsandi L, Orazizadeh M, Niazvand F, Abbaspour MR, Mansouri E, Khodadadi A. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118(2):123-128. doi:10.4149/BLL_2017_025.
- Miyake S, Murai S, Kakuta S, Uchiyama Y, Nakano H. Identification of the hallmarks of necroptosis and ferroptosis by transmission electron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jun 30;527(3):839-844. doi:10.1016/j.bbrc.2020.04.127.
- Yoon S, Bogdanov K, Kovalenko A, Wallach D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ.* 2016;23:253e260. doi:10.1038/cdd.2015.92.
- Zhang T, Yin C, Boyd DF, et al. Influenza virus Z-RNAs induce ZBP1-mediated necroptosis. *Cell.* 2020;180:1115e1129. doi:10.1016/j.cell.2020.02.050.
- Mizumura K, Maruoka S, Shimizu T, Gon Y. Autophagy, selective autophagy, and necroptosis in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018 Oct 9;13:3165-3172. OPD.S175830. eCollection 2018.
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137
- Tomas-Hernández S, Blanco J, Rojas C, et al. Resveratrol potently counteracts quercetin starvation-induced autophagy and sensitizes hepg2 cancer cells to apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* Mar 2018;62(5). doi:10.1002/mnfr.201700610.
- Ud Din N, Umer M, Park YK. Histomorphometric analysis of pre- and post-denosumab-treated giant cell tumor of bone. *Int J Surg Pathol.* 2020 Dec;28(8):859-867. doi:10.1177/1066896920920716. Epub 2020 May 19.