

Expresión génica de marcadores de estrés neuroquímico y protumorales en osteosarcoma, tejido adyacente y hueso sano

Cindy Bandala,^{1*} Adrián Sánchez-Rojas,¹ Jazmín Carro-Rodríguez,¹ Valentín Martínez-López,² Eréndira Estrada-Villaseñor³ y Modesto Gómez-López⁴

¹Laboratorio de Neurociencia Traslacional Aplicada a Enfermedades Crónicas y Emergentes, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional; ²Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra; ³Servicio de Patología, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra; ⁴Laboratorio de Biología Molecular del Proceso Inflamatorio, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México

Resumen

Antecedentes: El osteosarcoma (OS) es una neoplasia ósea maligna con alta recurrencia. Actualmente, la delimitación de los bordes libres de tumor se realiza mediante estudio histopatológico. La expresión de genes relacionados con la proliferación, la angiogénesis, la metástasis y el estrés neuroquímico podría constituir un marcador temprano de transformación en tejido considerado «libre de tumor». **Objetivo:** Comparar la expresión génica de los receptores β -adrenérgicos 1 y 2 (ADRB1 y ADRB2), del receptor dopaminérgico D2 (DR2), del receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular 2 (VEGFR2), de Ki-67, de fibronectina (Fn) y de las metaloproteinasas 2, 9 y 14 (MMP-2, MMP-9 y MMP-14) en tejido de OS, tejido adyacente y hueso no oncológico (control). **Material y métodos:** Se incluyeron 10 muestras por grupo (OS, adyacente y control) de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Cada muestra se procesó para cultivo primario y análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa. **Resultados:** El tejido y el cultivo primario del OS mostraron una menor expresión de DR2 y una mayor expresión de ADRB1, ADRB2, Ki-67, VEGFR2, MMP-2, MMP-9 y MMP-14, en comparación con el tejido adyacente y el control ($p < 0.05$). El tejido adyacente presentó una expresión aumentada de Ki-67 y reducida de DR2 y Fn en comparación con el control ($p < 0.05$). En el cultivo primario, la expresión de MMP-9 y MMP-14 fue mayor en el tejido adyacente respecto al control ($p < 0.05$). **Conclusiones:** La expresión génica de DR2, Fn, Ki-67, MMP-9 y MMP-14 podría constituir un indicador temprano de transformación tumoral en el tejido adyacente al OS, representando un hallazgo complementario al estudio histopatológico para la delimitación precisa del borde libre de tumor.

PALABRAS CLAVE: Osteosarcoma. Expresión génica. Receptor adrenérgico beta-1. Receptor adrenérgico beta-2. Receptor de dopamina D2. Marcadores protumorales. Borde libre de tumor.

Gene expression of neurochemical stress and protumor markers in osteosarcoma, adjacent tissue, and healthy bone

Abstract

Background: Osteosarcoma (OS) is a malignant bone neoplasm with a high recurrence rate. Currently, tumor-free margins are determined through histopathological analysis. The expression of genes related to proliferation, angiogenesis, metastasis, and neurochemical stress may represent early markers of transformation in tissue considered “tumor-free”. **Objective:** To compare the gene expression of β -adrenergic receptors 1 and 2 (ADRB1 and ADRB2), dopamine receptor D2 (DR2), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), Ki-67, fibronectin (Fn), and matrix metalloproteinases 2, 9, and 14

*Correspondencia:

Cindy Bandala

E-mail: crodriguezba@ipn.mx

Fecha de recepción: 01-06-2025

Fecha de aceptación: 15-10-2026

DOI: 10.24875/GMM.25000210

Gac Med Mex. 2026;162:279-288

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2026 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(MMP-2, MMP-9 and MMP-14) in OS tissue, adjacent tissue, and non oncological bone (control). **Materials and methods:** Ten samples per group (OS, adjacent, and control) were obtained from patients treated at the Luis Guillermo Ibarra Ibarra National Institute of Rehabilitation. Each sample was processed for primary culture and gene expression analysis via polymerase chain reaction. **Results:** OS tissues and primary cultures presented lower expression of DR2 and higher expression of ADRB1, ADRB2, Ki-67, VEGFR2, MMP-2, MMP-9, and MMP-14 than adjacent and control tissues did ($p < 0.05$). Compared with control tissues, adjacent tissues presented greater expression of Ki-67 and lower expression of DR2 and Fn compared with control ($p < 0.05$). In primary cultures, MMP-9 and MMP-14 expression was greater in adjacent tissues than in control ($p < 0.05$). **Conclusions:** The gene expression of DR2, Fn, Ki-67, MMP-9, and MMP-14 may serve as early indicators of tumor transformation in tissues adjacent to OS, representing a complementary finding to histopathological evaluation for the accurate definition of tumor-free margins.

KEYWORDS: Osteosarcoma. Gene expression. Beta-1 adrenergic receptor. Beta-2 adrenergic receptor. Dopamine D2 receptor. Protumoral markers. Tumor-free margins.

Introducción

El osteosarcoma (OS) es una neoplasia ósea maligna de etiología multifactorial. En México y en otros países se ha demostrado que es más frecuente en los varones, con picos de incidencia en los adultos jóvenes y los adultos mayores¹⁻⁴. El tratamiento principal consiste en la resección quirúrgica de la zona afectada, delimitada mediante el estudio histopatológico de los bordes libres de tumor⁵. Sin embargo, la recurrencia representa una causa importante de mortalidad, con una frecuencia del 30-40% en todo el mundo^{6,7}.

Diversos estudios han demostrado que la mayoría de los pacientes con OS experimentan ansiedad y estrés crónico, condiciones que activan respuestas neuroquímicas relacionadas con la señalización adrenérgica⁸⁻¹¹. Los receptores beta adrenérgicos (ADRB1 y ADRB2) al unirse a la noradrenalina y adrenalina, se han vinculado con mecanismos protumorales en diversas neoplasias¹²⁻¹⁵, mientras que el receptor dopaminérgico D2 (DR2) al unirse a la dopamina ha mostrado función antiangiogénica¹⁶. En el cáncer de mama, el uso de betabloqueadores no selectivos se ha asociado con menor proliferación y metástasis en el momento del diagnóstico^{15,17}. En el hueso sano, estos receptores se expresan en osteoblastos y osteoclastos, donde regulan la homeostasis ósea^{17,18}.

El OS se caracteriza por un incremento en la proliferación celular, la invasión tisular y la angiogénesis. La proliferación se asocia con la expresión de Ki-67¹⁹, la angiogénesis con el receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular 2 (VEGFR2)^{16,20,21} y la fibronectina (Fn) se considera una molécula proangiogénica y prometastásica²². La capacidad metastásica del OS está relacionada con la degradación de la matriz extracelular mediada por las metaloproteinasas

MMP-2, MMP-9 y MMP-14²³⁻²⁵. En particular, MMP-2 y MMP-9 participan en la destrucción focalizada de la membrana basal, mientras que MMP-14 se localiza en los invadopodios mediante procesos de reciclaje endocítico y exocitosis que involucran proteínas como Rab8, Sec8, cortactina, VAMP7 y Tks4²⁶.

En un estudio previo²⁷ demostramos diferencias en la expresión génica de los receptores asociados al estrés neuroquímico y de Ki-67 entre tejidos humanos de OS, tejido adyacente y hueso no oncológico. Por ello, decidimos ampliar la investigación evaluando estos marcadores no solo en tejidos, sino también en cultivos primarios, además de incorporar otros marcadores protumorales implicados en la fisiopatología del OS.

La identificación de estos marcadores representa un complemento potencial al estudio histopatológico convencional, al permitir una delimitación más precisa de los márgenes tumorales y reducir el riesgo de recurrencia. Por ello, el objetivo de este estudio fue comparar la expresión génica de ADRB1, ADRB2, DR2, Ki-67, VEGFR2, Fn, MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en OS, tejido adyacente y hueso no oncológico. Asimismo, la implementación del cultivo primario constituye una herramienta fundamental para estudios futuros orientados al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas y al análisis de los mecanismos moleculares implicados en la progresión del OS.

Material y métodos

Características de las muestras biológicas

Se obtuvieron 30 tejidos en fresco agrupados en OS ($n = 10$), adyacente ($n = 10$) y hueso no oncológico ($n = 10$) de pacientes adultos jóvenes atendidos en el

Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (LGII), de ambos sexos, con diagnóstico histopatológico de OS de tipo osteoblástico, en estadio IIB, tratados con un ciclo de cisplatino previo a la resección. Todos los tejidos se recolectaron en el servicio de patología bajo la supervisión de la especialista en tumores óseos. El hueso no oncológico (control) se obtuvo de fracturas conminutas, siguiendo el mismo criterio de edad, sexo y zona anatómicas características del OS (fémur distal y tibia proximal), tomando remanente óseo no requerido en la reconstrucción de las fracturas. Para los procedimientos se recolectaron 3 cm² de tejido tanto cortical como fibroso en una relación 1:3 aproximadamente. Para la extracción de ARN se consideraron muestras de 50 mg para 1 ml de TRIzol® en todos los casos. Para los cultivos primarios se consideró 1 cm² con un peso aproximado de 200 mg en todos los grupos, depositado en tubos cónicos con medio DMEM-F12 (*Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con antibiótico al 10%.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. El protocolo se efectuó cumpliendo las recomendaciones establecidas en la NOM-EM-003-SSA-1994 y en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII con número 72/16. La identificación de los pacientes se realizó a través de folios.

Obtención del cultivo primario

En condiciones de esterilidad se realizaron dos lavados con PBS 1X y antibiótico-antimicótico al 10% (Gibco), y posteriormente las muestras se fraccionaron. En el caso de tejido fibroso, se llevó a cabo una digestión enzimática utilizando colagenasa al 0.3% y antibiótico-antimicótico al 1% en medio DMEM-F12 (Gibco), con agitación constante durante 3-5 horas, y luego se contabilizaron las células obtenidas. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm², a una densidad de 10,000 a 20,000 células/cm². En el caso de hueso cortical, se cultivó como explante en la caja Petri (56 × 42 × 30) y a continuación las células aisladas y los explantes se mantuvieron en medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco), con un 10% de suero bovino fetal (Gibco) y antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco) a 37 °C con CO₂ al 5%. A los cultivos se les cambió el medio cada 3 días. Para obtener las curvas de proliferación y las pruebas de viabilidad se realizaron subcultivos hasta el segundo pase, y las

células se desprendieron con Versene (Gibco) y Accutase (Sigma-Aldrich).

Obtención de la confluencia celular y la curva de proliferación

Las células en segundo pase (derivadas de hueso cortical y fibroso) de OS, adyacente y control se sembraron a una densidad de 3000 células por pozo en una placa de 96 pozos con medio DMEM y suero bovino fetal al 10%, y se fijaron con glutaraldehído al 1.1% a los diferentes tiempos de evaluación (24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas). Después, se tiñeron con cristal violeta al 1% y se lavaron con agua Milli-Q. Posteriormente, se observaron y capturaron las imágenes en un microscopio invertido de campo claro con un aumento de 10× (Axiovert 20, Carl Zeiss). Por último, a todas las muestras secas se les añadieron 100 µl de ácido acético al 1% para extraer el colorante y se dejaron 20 minutos en agitación. La placa fue leída en un espectrofotómetro Synergy HTX *multi-mode reader* a 570 nm de absorbancia. Se realizó una regresión logística para determinar el índice de proliferación a los diferentes tiempos de cultivo y tejidos.

Expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)

Para la extracción de ARN total de los tejidos se consideraron muestras de 50 mg para 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en todos los casos. Para los cultivos primarios se utilizaron aproximadamente 1x10⁵ células por 1 ml de TRIzol® Reagent siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA aislado se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Genesys serie 10 (Thermo Scientific, EE. UU.), estableciendo una relación 260/280 para determinar la pureza de los ácidos nucleicos. A continuación, las muestras de ARN se colocaron en un gel de agarosa al 1.5% para determinar la integridad mediante electroforesis. Las muestras de ARN total se trataron con DNasa I de grado de amplificación (Invitrogen™) antes de la transcripción reversa. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C en dietilpírofosfato. Se utilizó 0.5 µg del ARN total para la síntesis de cDNA utilizando Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) con 10 minutos a 65 °C, 50 minutos a 35 °C y 5 minutos a 75 °C en 20 µl de volumen de reacción en un

Tabla 1. Descripción de los *primers* usados en la RT-PCR, diseño basado en la librería de sondas humanas

Gen	Secuencia examinada	Primer izquierda 5'-3'	Primer derecha 5'-3'	Amplicón (pb)	Eficiencia (%)
<i>DR2</i>	NM_000795.3	GCAGCCAGCAGATGATGA	AGACCATGAGCCGTAGGAAG	442	99.30
<i>ADRB1</i>	NM_000684.2	GAGCCACGATGATCGATTTTA	GTGGAAGATGGGTGGGTTAG	79	99.00
<i>ADRB2</i>	NM_000024.5	CCCAGGACGATGAGAGACAT	TTCTTGCTGGCACCCAATA	65	100.02
<i>Ki67</i>	NM_002417.4	TGCACTGAAGAACACATTTCT	CAAGGAAGTATTGAGGAGAAGA	3255	99.65
<i>MMP2</i>	NM_001127891.2	CTTCAGCACAAACAGGTTGC	GAGGTAATCTTAGGTGCTTACCTAGC	659	99.44
<i>MMP9</i>	NM_004994.2	GCCACCCGAGTGTAACCATA	GAACCAATCTCACCGACAGG	706	98.76
<i>MMP14</i>	NM_004895.3	AGGGGTCACTGGAATGCTC	CTGTCAGGAATGAGGATCTGAA	581	99.78
<i>VEGFR2</i>	NM_001025366.2	TCTCCGCTCTGAGCAAGG	TGCCCGCTGCTGTCTAAT	411	99.43
<i>Fn</i>	NM_001306129.1	TCCATTACCAAGACACACACAT	GGGAGAATAAGCTGTACCATCG	2474	99.56
<i>18S</i>	NT_146152.1	GAGAGGGAGCCTGAGAAACG	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	187	98.80
<i>TBP</i>	NM_003194.5	GAACCACGGCACTGATTTTC	GTTCTTCACTCTGGCTCCTGT	132	98.90

La temperatura fue de 60°C para todos los casos.

termociclador punto final Eppendorf Mastercycler (Eppendorf México). El cDNA amplificado se cuantificó en un espectrofotómetro a 260/280 nm. Las reacciones se llevaron a cabo usando sondas tipo Taqman de la Human Probeflibrary (Roche Diagnostics). La secuencia para cada gen se muestra en la tabla 1. Los oligos se diseñaron en la plataforma <https://primers.neoformit.com/>. Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Diagnostics, GmbH Mannheim, Alemania) usando 1 µl de cDNA, 0.5 µl de cada oligo, 4 µl de Taq polimerasa, 0.1 µl de sonda para cada reacción y 3.9 µl de agua Milli-Q o grado molecular. La amplificación se realizó en capilares de borosilicato (Diagnostics, GmbH Mannheim, Alemania) con el instrumento LightCycler 2.0. Para la amplificación, las muestras se sometieron a una desnaturalización inicialmente durante 10 minutos a 95 °C seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C y 5 segundos a 72 °C por 40 ciclos. El ensayo de PCR incluyó una curva estándar de cuatro puntos de dilución en serie para cada gen, y los niveles de ARNm se calcularon usando el método de parámetro comparativo de ciclo umbral (*Ct-Cycle threshold*) y se normalizó al ARNr 18S de control endógeno. Los resultados se calcularon como porcentaje del nivel medio encontrado en la muestra de control utilizando el método $\Delta\Delta CT$. Para cada muestra se incluyó un control NRT (*No Reverse Transcriptase*), procesado en las mismas

condiciones, pero sin la enzima transcriptasa reversa. Cada gen se normalizó frente al control interno (TBP).

Análisis estadístico

Se determinaron las medias y las desviaciones estándar. Se aplicaron las pruebas t de Student, ANOVA y HSD de Tukey. El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Se tomó como significancia estadística un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Caracterización de la población donante de muestra biológicas

Del total de las muestras analizadas, el 50% correspondieron a hombres y el 50% a mujeres, tanto para el grupo con OS como para el grupo de donantes de hueso no oncológico (control). El promedio de edad fue de 25.8 ± 3.4 años para el grupo de OS y de 27.3 ± 8.9 años para el grupo control ($p > 0.05$).

Confluencia y curva de proliferación celular

Los cultivos primarios derivados de los tejidos de OS y adyacentes mostraron una mayor velocidad de proliferación en comparación con los cultivos del

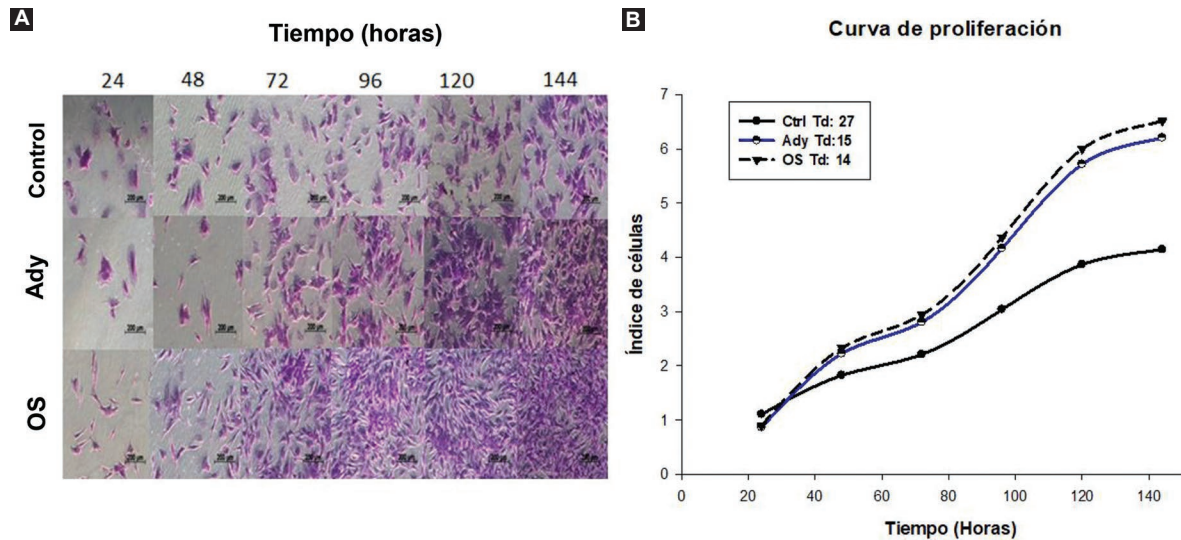


Figura 1. A: determinación de la confluencia celular de los cultivos primarios a partir de tejido de osteosarcoma (OS), adyacente (Ady) y hueso no oncológico (control), a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de cultivo. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% y se fotografiaron en un microscopio invertido en campo claro a 10x en los diferentes tiempos. **B:** curva de proliferación de los cultivos primarios a partir de tejido de OS, Ady y control a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de cultivo. Se extrajo el colorante y se realizó la lectura a una absorbancia de 570. Td: tiempo de duplicación.

tejido control. A las 72 horas, las células de OS y de tejido adyacente alcanzaron una confluencia superior al 80%, mientras que las células del grupo control no alcanzaron dicho nivel sino hasta después de 120 horas (Fig. 1A).

De acuerdo con el modelo logístico ajustado, el parámetro de dispersión (σ) fue de 14 horas para el OS, 15 horas para el grupo adyacente y 27 horas para el grupo control, lo que indica que las células del tejido control presentan un tiempo de duplicación aproximadamente dos veces mayor que las derivadas del tejido adyacente y del OS. Estos resultados sugieren que el tejido adyacente presenta un comportamiento proliferativo intermedio, con características moleculares y cinéticas más próximas al tejido tumoral que al control (Fig. 1B).

En la figura 2 A, B, D y E se observa que la expresión génica de ADRB1 y ADRB2 está incrementada tanto en el tejido como el cultivo primario de OS, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con las muestras control y adyacentes, pero sin diferencias entre estas dos últimas ($p > 0.05$). En la figura 2 C y F también se ve un incremento significativo en la expresión de Ki67 en comparación con el control tanto en el tejido como en el cultivo primario; sin embargo, en el tejido se encontró una diferencia significativa entre el OS y el adyacente ($p < 0.05$), mientras que en el cultivo primario la diferencia significativa se encontró entre el adyacente y el control ($p < 0.05$).

En la figura 3 se muestra la expresión génica de DR2, VEGFR2 y Fn tanto en tejido (Fig. 3 A-C) como en cultivo primario (Fig. 3 D-F). Se puede ver que la expresión génica de DR2 en el tejido y en el cultivo primario está incrementada en el control, con diferencias significativas con el adyacente y el OS ($p < 0.05$), sin observar diferencia entre estos dos últimos ($p > 0.05$), tanto en tejidos como en células ($p > 0.05$). En la figura 3 B y E se muestra que la expresión génica de VEGFR2 está incrementada en el OS tanto en el tejido como en el cultivo primario, con diferencias significativas con el adyacente y el control ($p < 0.05$), pero sin mostrar diferencias entre estos dos últimos ($p > 0.05$). Finalmente, en la figura 3C y F se determina la expresión génica de la Fn tanto en tejido como en cultivo primario, mostrando un incremento significativo ($p < 0.05$) en tejido y cultivo primario de OS en comparación con el tejido adyacente, y una disminución significativa en el tejido adyacente comparado con el tejido control ($p < 0.05$).

En la figura 4 se muestra la expresión génica de MMP, tanto en tejido (Figs. 4 A-C) como en cultivo primario (Figs. 4 D-F). Se observó que la expresión génica de MMP-2, MMP-9 y MMP-14 está incrementada en el OS, tanto en tejido como en las células del cultivo primario, con diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el adyacente y el control, determinado solo en los tejidos, mientras que en el cultivo primario se encontró una diferencia significativa

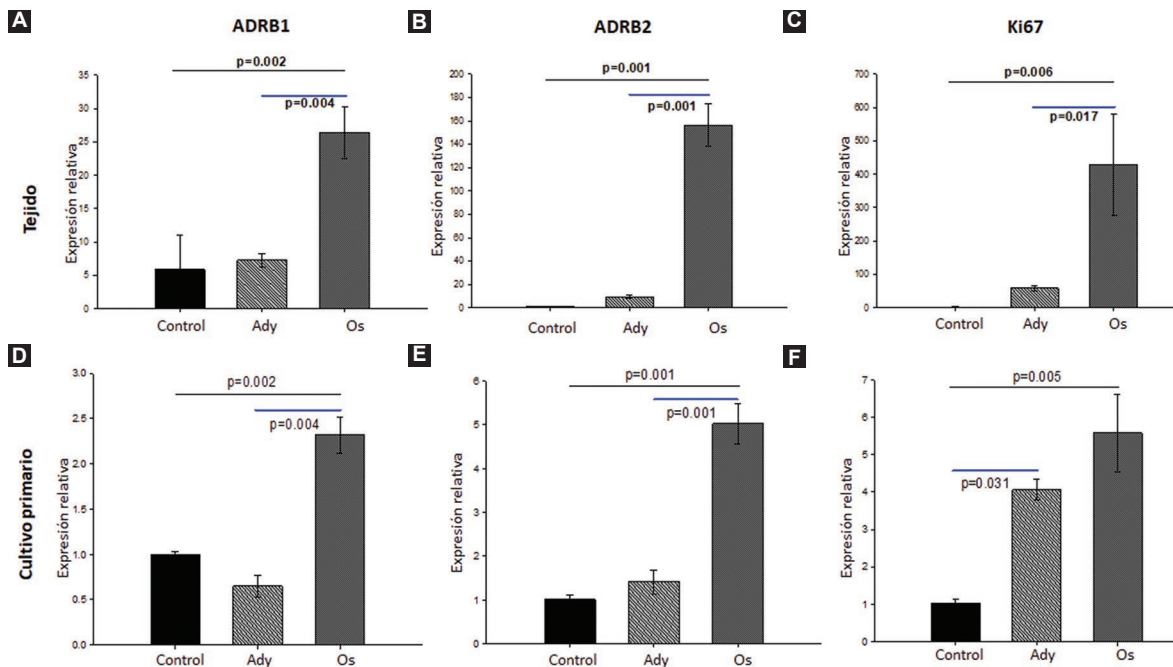


Figura 2. Expresión génica de los receptores ADRB1, ADRB2 y Ki67. **A, B y C:** en tejido de pacientes con osteosarcoma (OS), adyacente al tumor (Ady) y hueso no oncológico (Control). **D, E y F:** en cultivos primarios de su respectivo tejido.

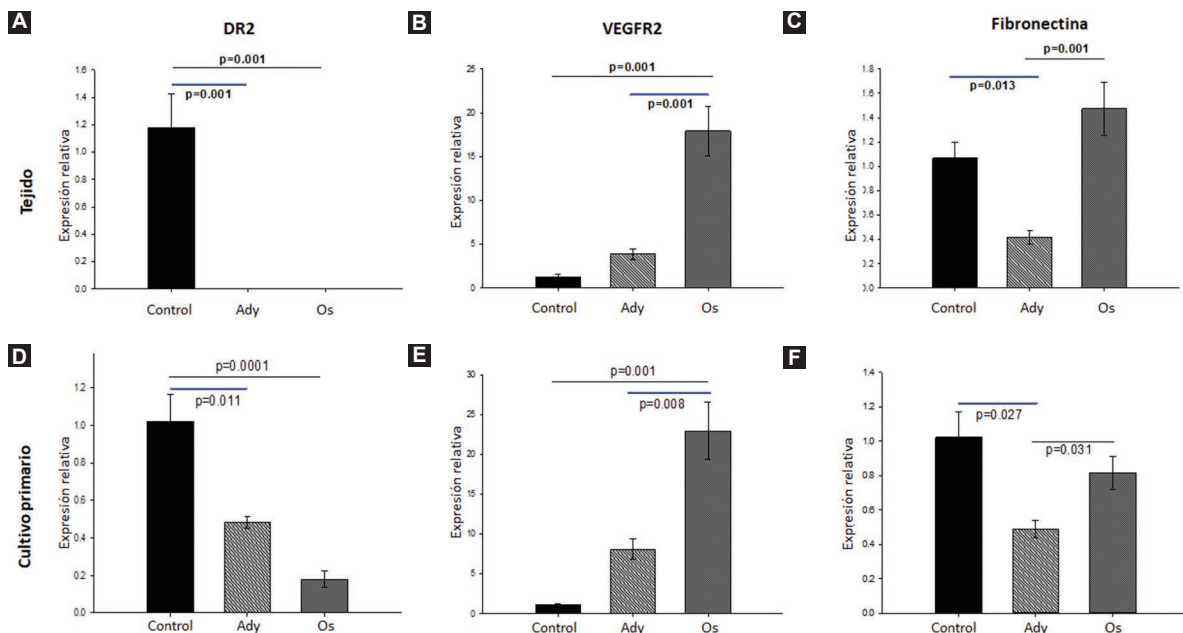


Figura 3. Expresión génica de los receptores DR2, VEGFR2 y de la fibronectina. **A, B y C:** en tejido de pacientes con osteosarcoma (OS), adyacente al tumor (Ady) y hueso no oncológico (Control). **D, E y F:** en cultivos primarios de su respectivo tejido.

($p < 0.05$) entre el OS y el control, y en el caso de la MMP-9 y MMP-14 se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la comparación de adyacente con control.

Discusión

Nuestros resultados muestran que, en los cultivos primarios, las células derivadas de tejido de OS y

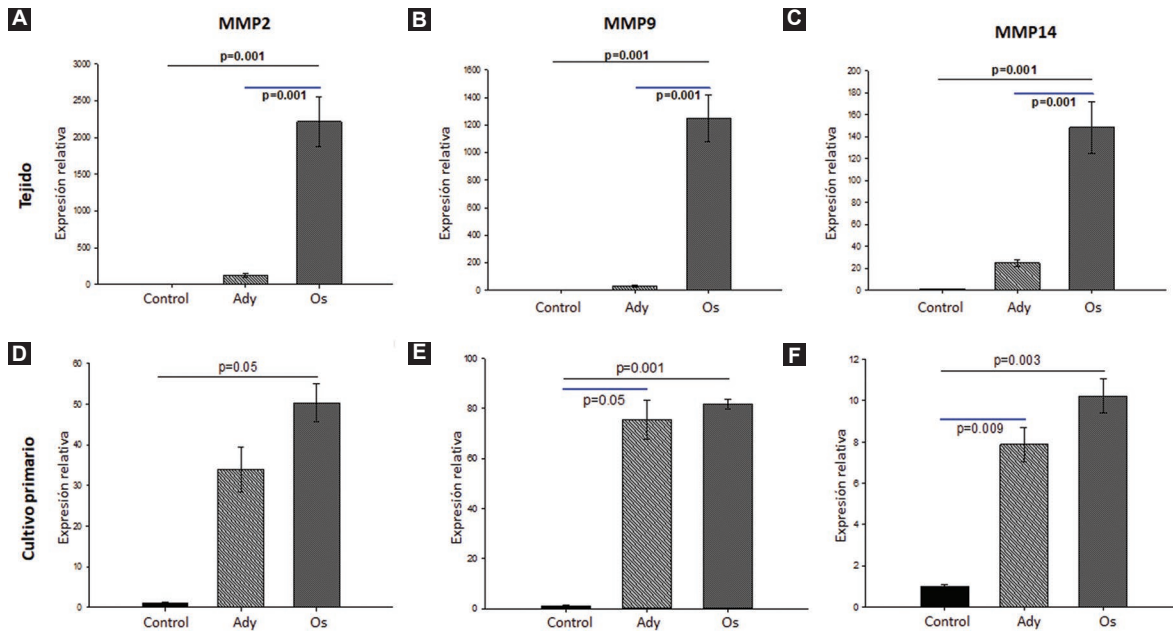


Figura 4. Expresión génica de MMP2, MMP9 y MMP14. **A, B y C:** en tejido de pacientes con osteosarcoma (OS), adyacente al tumor (Ady) y hueso no oncológico (Control). **D, E y F:** en cultivos primarios de su respectivo tejido.

adyacente presentan una mayor capacidad proliferativa en comparación con las células provenientes del tejido control (hueso no oncológico). Este hallazgo se evidencia por el menor tiempo de duplicación en los grupos OS y adyacente, en contraste con el grupo control, lo que sugiere una mayor tasa de crecimiento y de replicación celular asociada al fenotipo tumoral²⁸. La cinética de proliferación del tejido adyacente mostró un comportamiento que se aproxima al observado en el tejido tumoral, lo cual podría indicar la presencia de cambios moleculares tempranos en microambientes histológicamente normales, pero expuestos a señales tumorales a distancia. Estos resultados concuerdan con reportes previos que describen la existencia de efectos de campo tumoral (*field cancerization*), donde las células aledañas al núcleo tumoral presentan alteraciones en la expresión génica y en la regulación del ciclo celular que predisponen a la transformación neoplásica^{29,30}. La mayor velocidad de proliferación en OS y adyacente podría explicarse por la activación de vías de señalización relacionadas con factores de crecimiento, catecolaminas o proteínas de la matriz extracelular, que favorecen la progresión tumoral³¹. En este contexto, los resultados del presente estudio respaldan la hipótesis de que el tejido adyacente al tumor no es completamente normal, sino que podría encontrarse en un estado de activación preproliferativa, modulada por el microambiente tumoral a distancia.

El Ki67 es uno de los marcadores de proliferación más estudiado histopatológicamente en el OS³², pero se desconoce su expresión en el tejido adyacente. En nuestros resultados observamos que el Ki67 está incrementado en el OS en comparación con el tejido control; sin embargo, en el cultivo primario, el tejido adyacente no tuvo diferencia significativa en comparación con el OS, pero sí con el tejido control, lo que sugiere que la proliferación celular en el tejido adyacente se asemeja más al OS que al hueso no oncológico, mostrando un indicio temprano de posible transformación tumoral³³. Las células del tejido adyacente tienen una proliferación similar al OS y diferente al control, indicando que la expresión de genes y proteínas relacionadas con el ciclo celular ya está modificada en el tejido declarado libre de tumor por estudios de histopatología. Este hallazgo se ha demostrado en estudios de transcriptoma de diferentes tumores, evidenciando una mayor similitud del adyacente con el tejido tumoral que con el tejido no oncológico³³.

La población con neoplasias como el OS suele experimentar ansiedad y estrés crónico^{9,10}, condiciones que producen un incremento de noradrenalina y adrenalina, una disminución de dopamina y cambios en la expresión de sus receptores, como ADRB1, ADRB2 y DR2, denotando un efecto protumoral^{11,34,35}. El ADRB2 se ha relacionado con mayor resistencia a

la quimioterapia, evasión de la apoptosis, angiogénesis, metástasis e inhibición de citocinas antitumorales en otros tipos de cáncer³⁵, por lo que el uso de betabloqueadores no selectivos ha demostrado en modelos preclínicos menor progresión y menos agresividad tumoral³⁶, mientras que el DR2, como receptor de la dopamina y de derivados dopaminérgicos, se ha relacionado con una disminución de la angiogénesis^{16,37}. Por ello, resulta importante su estudio tanto en el OS como en el tejido adyacente, así como en el hueso no oncológico. ADRB1 y ADRB2 mostraron un incremento en su expresión en el OS en comparación con el tejido adyacente y el control, pero sin mostrar diferencias significativas entre estos dos últimos. Si bien ambos receptores, al unirse a noradrenalina y adrenalina, se han relacionado con mecanismos protumorales y supresión de la respuesta antitumoral³⁸, no muestran cambios en el tejido adyacente. Sin embargo, dada la importancia protumoral de los ADRB en diferentes tipos de neoplasias, el tratamiento con betabloqueadores como el propranolol podría considerarse una opción adyuvante al manejo convencional en el OS^{36,39}. Respecto al DR2, este receptor muestra una disminución significativa en el OS en comparación con el control, lo cual se ha observado en otras neoplasias y se ha demostrado que los derivados dopaminérgicos, al unirse al DR2, tienen efecto antiangiogénico al promover la endocitosis del VEGFR2 y de esta manera evitar su unión con el factor de crecimiento del endotelio vascular, además de inactivar a MAPK, fosforilar a FAK y disminuir la disponibilidad del plasminógeno-1, mejorando la fibrinólisis, lo que en consecuencia disminuye la angiogénesis¹⁶. Considerando nuestras observaciones, la determinación de DR2 en tejido adyacente puede ser un indicador temprano de transformación tumoral. Respecto a la expresión génica de VEGFR2, esta fue mayor en el OS en comparación con el adyacente y el control. Esto puede ser similar a lo reportado en otras neoplasias^{40,41}. La Fn también está incrementada en el OS y se observó una disminución en el tejido adyacente, lo cual probablemente se explique porque la Fn participa en diversos procesos tumorales, como la proliferación, la angiogénesis y la migración celular⁴². Además, las células adyacentes disminuyen su expresión debido a la migración de los fibroblastos al núcleo tumoral^{43,44}, lo cual también se ha visto con respecto a fibroblastos asociados al cáncer que secretan fibronectina/integrina para adquirir fuerza migratoria⁴⁵.

La MMP-2, la MMP-9 y la MMP-14 mostraron un incremento en su expresión en el OS, con diferencias significativas con los tejidos adyacente y control. Se ha demostrado que la MMP-2 y la MMP-9 están incrementadas en el OS y esto se ha relacionado con metástasis y menor sobrevida^{25,46}. En este tenor, la relación MMP-2/MMP-9 se ha vinculado a una menor respuesta a la quimioterapia⁴⁷, mientras que la MMP-14 se ha demostrado que puede ser un blanco importante para la inmunoterapia⁴⁸. En el cultivo primario se observó que las tres MMP incrementan su expresión en el tejido adyacente, con diferencias significativas con el control para la MMP-9 y la MMP-14 que se relacionan con el desarrollo del invadopodio, un proceso clave en la metástasis. Probablemente, en cultivo encuentran las condiciones óptimas y libres de respuesta antitumoral para poder incrementar su invasividad, o modifican su expresión génica debido al estrés mecánico y la exposición a medios de cultivo enriquecidos⁴⁹.

Comparando nuestros hallazgos respecto a la expresión génica de ADRB1, ADRB2, DR2 y Ki67 con un estudio que realizamos previamente²⁷, observamos diferencias en la expresión de ADRB2 y DR2. Estas discrepancias podrían atribuirse a que en el presente trabajo se incluyó una población más joven, se analizó exclusivamente el subtipo osteoblástico de OS y el tejido control se obtuvo de remanentes óseos de fracturas en lugar de muestras provenientes de artroplastias, como en el estudio anterior.

Nuestra investigación presenta limitaciones, como su diseño unicéntrico y la focalización en el análisis de la expresión génica de marcadores que pueden ser inducibles ante distintos estímulos, incluyendo factores psicoemocionales, inflamatorios o farmacológicos. No obstante, desde una perspectiva clínica, estos hallazgos adquieren relevancia para la delimitación del borde quirúrgico y la evaluación de tejido aparentemente libre de tumor, ya que el tejido adyacente puede mostrar alteraciones en la expresión génica antes de evidenciar cambios en la expresión proteica, lo que sugiere una fase temprana de activación molecular con potencial valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico futuro.

Conclusiones

Los cultivos primarios de OS y de tejido adyacente mostraron una mayor capacidad proliferativa en comparación con las células derivadas del tejido control, lo que sugiere que el tejido adyacente presenta

características funcionales similares a las del tejido tumoral.

Se observó que DR2 presentó una menor expresión génica, mientras que ADRB1, ADRB2, Ki-67, VEGFR2, MMP-2, MMP-9 y MMP-14 mostraron una expresión aumentada en el OS respecto al tejido adyacente y al hueso no oncológico. En el tejido y el cultivo primario de células adyacentes, la expresión de DR2, Fn, Ki-67 y MMP sugiere la presencia de cambios moleculares tempranos asociados con transformación tumoral, lo que podría tener implicaciones clínicas en la delimitación de los bordes libres de tumor. Estos hallazgos subrayan la necesidad de integrar técnicas complementarias de análisis génico y proteico para mejorar la precisión diagnóstica e intraoperatoria.

Finalmente, destacamos que los cultivos primarios constituyen una herramienta valiosa para investigaciones traslacionales, orientadas al reposicionamiento de betabloqueadores no selectivos y moduladores dopaminérgicos como parte de una estrategia multidisciplinaria dirigida a reducir los mecanismos protumorales y la resistencia a la quimioterapia asociados al estrés crónico en los pacientes con OS.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Rehabilitación LGII y al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. Durante la realización de este trabajo, el M. en C. Adrián Sánchez Rojas fue beneficiario de una beca de posgrado del CONACYT.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética. Los autores han seguido los protocolos de su centro sanitario/institución para acceder a los datos de las historias clínicas. Se ha obtenido el consentimiento informado de los pacientes y se

cuenta con la aprobación del Comité de Ética. Se han seguido las recomendaciones de las guías SAGER.

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial. Los autores declaran que no se utilizó ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción ni la creación de contenido de este manuscrito.

Referencias

1. Czarnecka AM, Synoradzki K, Firlej W, Bartnik E, Sobczuk P, Fiedorowicz M, et al. Molecular biology of osteosarcoma. *Cancers*. 2020;12:2130. doi: 10.3390/cancers12082130
2. De la Garza-Montano P, Estrada-Villaseñor E, Domínguez Rubio R, Martínez-López V, Ávila-Luna A, Alfaro-Rodríguez A, et al. Epidemiological aspects of osteosarcoma, giant cell tumor and chondrosarcoma musculoskeletal tumors — experience of the National Rehabilitation Institute, Mexico City. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:6451-5. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.15.6451.
3. Biazzo A, De Paolis M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma. *Acta Orthop Belg*. 2016;82:690-8.
4. Beird HC, Bielack SS, Flanagan AM, Gill J, Heymann D, Janeway KA, et al. Osteosarcoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2022;8:1-19. doi: 10.1038/s41572-022-00409-y.
5. Ferguson JL, Turner SP. Bone cancer: diagnosis and treatment principles. *Am Fam Physician*. 2018;98:205-13.
6. Berner K, Johannesen TB, Berner A, Haugland HK, Bjerkehagen B, Böhler PJ, et al. Time-trends on incidence and survival in a nationwide and unselected cohort of patients with skeletal osteosarcoma. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2014;54:25. doi: 10.3109/0284186X.2014.923934.
7. Poudel RR, Kumar VS, Bakhshi S, Gamanagatti S, Rastogi S, Khan SA. High tumor volume and local recurrence following surgery in osteosarcoma: a retrospective study. *Indian J Orthop*. 2014;48:285. doi: 10.4103/0019-5413.132520.
8. Franzoi IG, Granieri A, Sauta MD, Agnesone M, Gonella M, Grimaldi C, et al. The psychological impact of sarcoma on affected patients. *Psychooncology*. 2023;32:1787-97. doi: 10.1002/pon.6240.
9. American Cancer Society. Living as an osteosarcoma survivor. (Consultado el 01-03-2025.) Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/osteosarcoma/after-treatment/follow-up.html>.
10. Meng J, Wu J, Zhang X, Guo L, Li H. A longitudinal evaluation on 3-year change of anxiety and depression, and their risk factors among parents of childhood and adolescence patients with resectable osteosarcoma: a cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101:e30981. doi: 10.1097/MD.00000000000030981.
11. Yan J, Chen Y, Luo M, Hu X, Li H, Liu Q, et al. Chronic stress in solid tumor development: from mechanisms to interventions. *J Biomed Sci*. 2023;30:8. doi: 10.1186/s12929-023-00903-9.
12. Cai X, Yin W, Tang C, Lu Y, He Y. Molecular mechanism of microRNAs regulating apoptosis in osteosarcoma. *Mol Biol Rep*. 2022;49:6945-56. doi: 10.1007/s11033-022-07344-x.
13. Bandala C, Ávila-Luna A, Gómez-López M, Estrada-Villaseñor E, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, et al. Catecholamine levels and gene expression of their receptors in tissues of adults with osteosarcoma. *Arch Physiol Biochem*. 2021;127:337-43. doi: 10.1080/13813455.2019.1638942.
14. Ma Y, Nyman JS, Tao H, Moss HH, Yang X, Eleftheriou F. β 2-adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology*. 2011;152:1412-22. Doi: 10.1210/en.2010-0881.
15. Montoya A, Amaya CN, Belmont A, Diab N, Trevino R, Villanueva G, et al. Use of non-selective β -blockers is associated with decreased tumor proliferative indices in early stage breast cancer. *Oncotarget*. 2016;8:6446-60. doi: 10.18632/oncotarget.14119.
16. Mendoza-Torreblanca JG, Cárdenas-Rodríguez N, Carro-Rodríguez J, Contreras-García IJ, Garcíadiego-Cázares D, Ortega-Cuellar D, et al. Antiangiogenic effect of dopamine and dopaminergic agonists as an adjuvant therapeutic option in the treatment of cancer, endometriosis, and osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2023;24:10199. doi: 10.3390/ijms241210199.
17. Mejía-Barradas CM, Amador-Martínez A, Lara-Padilla E, Cárdenas-Rodríguez N, Ignacio-Mejía I, Martínez-López V, et al. Effects of selective and nonselective beta blockers on bone mineral density in Mexican patients with breast cancer. *Cancers*. 2024;16:2891. doi: 10.3390/cancers16162891.
18. Zhong X-P, Xia W-F. Regulation of bone metabolism mediated by β -adrenergic receptor and its clinical application. *World J Clin Cases*. 2021;9:8967-73. doi: 10.12998/wjcc.v9.i30.8967.
19. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2018;20:570-5. doi: 10.1007/s12094-017-1774-3.

20. Li Y-S, Liu Q, Tian J, He H-B, Luo W. Angiogenesis process in osteosarcoma: an updated perspective of pathophysiology and therapeutics. *Am J Med Sci*. 2019;357:280-8. doi: 10.1016/j.amjms.2018.12.004.
21. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2020;77:1745-70. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
22. Shi K, Wang S, Shen B, Yu F, Weng D, Lin J. Clinicopathological and prognostic values of fibronectin and integrin $\alpha\beta 3$ expression in primary osteosarcoma. *World J Surg Oncol*. 2019;17:23. doi: 10.1186/s12957-019-1566-z.
23. Gong C, Sun K, Xiong H-H, Sneh T, Zhang J, Zhou X, et al. Expression of CXCR4 and MMP-2 is associated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Histol Histopathol*. 2020;35:863-70. doi: 10.14670/HH-18-219.
24. Wang X, Zhao X, Yi Z, Ma B, Wang H, Pu Y, et al. WNT5A promotes migration and invasion of human osteosarcoma cells via SRC/ERK/MMP-14 pathway. *Cell Biol Int*. 2018;42:598-607. doi: 10.1002/cbin.10936.
25. Zhang M, Zhang X. Association of MMP-2 expression and prognosis in osteosarcoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:14965-70.
26. Jacob A, Prekeris R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:4. doi: 10.3389/fcell.2015.00004.
27. Bandala C, Ávila-Luna A, Gómez-López M, Estrada-Villaseñor E, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, et al. Catecholamine levels and gene expression of their receptors in tissues of adults with osteosarcoma. *Arch Physiol Biochem*. 2021;127:337-43. doi: 10.1080/13813455.2019.1638942.
28. Gallaher JA, Brown JS, Anderson ARA. The impact of proliferation-migration tradeoffs on phenotypic evolution in cancer. *Sci Rep*. 2019;9:2425. doi: 10.1038/s41598-019-39636-x.
29. Kim J, Kim H, Lee MS, Lee H, Kim YJ, Lee WY, et al. Transcriptomes of the tumor-adjacent normal tissues are more informative than tumors in predicting recurrence in colorectal cancer patients. *J Transl Med*. 2023;21:209. doi: 10.1186/s12967-023-04053-2.
30. Yates J, Schaufelberger H, Steinacher R, Schär P, Truninger K, Boeva V. DNA-methylation variability in normal mucosa: a field cancerization marker in patients with adenomatous polyps. *J Natl Cancer Inst*. 2024;116:974-82. doi: 10.1093/jnci/djae016.
31. Nishida A, Andoh A. The role of inflammation in cancer: mechanisms of tumor initiation, progression, and metastasis. *Cells*. 2025;14:488. doi: 10.3390/cells14070488.
32. Zeng M, Zhou J, Wen L, Zhu Y, Luo Y, Wang W. The relationship between the expression of Ki-67 and the prognosis of osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2021;21:210. doi: 10.1186/s12885-021-07880-y.
33. Aran D, Camarda R, Odegaard J, Paik H, Oskotsky B, Krings G, et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun*. 2017;8:1077. doi: 10.1038/s41467-017-01027-z.
34. Tian W, Liu Y, Cao C, Zeng Y, Pan Y, Liu X, et al. Chronic stress: impacts on tumor microenvironment and implications for anti-cancer treatments. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:777018. doi: 10.3389/fcell.2021.777018.
35. Zhang H, Yang Y, Cao Y, Guan J. Effects of chronic stress on cancer development and the therapeutic prospects of adrenergic signaling regulation. *Biomed Pharmacother*. 2024;175:116609. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116609.
36. Solernó LM, Sobol NT, Gottardo MF, Capobianco CS, Ferrero MR, Vázquez L, et al. Propranolol blocks osteosarcoma cell cycle progression, inhibits angiogenesis and slows xenograft growth in combination with cisplatin-based chemotherapy. *Sci Rep*. 2022;12:15058. doi: 10.1038/s41598-022-18324-3.
37. Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the dopamine D2 receptor: a pharmacological perspective. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370:111-26. doi: 10.1124/jpet.119.256818.
38. Mravec B, Horvathova L, Hunakova L. Neurobiology of cancer: the role of β -adrenergic receptor signaling in various tumor environments. *Int J Mol Sci*. 2020;21:7958. doi: 10.3390/ijms21217958.
39. IBioBA – MPSP. Popular antihypertensive drug inhibits tumor growth of osteosarcoma. IBioBA; 2022. (Consultado el 03-03-2025.) Disponible en: <https://ibioba-mpsp-conicet.gov.ar/index.php/en/2022/09/19/popular-anti-hypertensive-drug-inhibits-tumor-growth-of-osteosarcoma/>.
40. Guo S, Colbert LS, McGlothen TZ, González-Pérez RR, Guo S, Colbert LS, et al. Regulation of angiogenesis in human cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2). En: Ran S, editor. *Tumor angiogenesis*. InTech; 2012. Doi: 10.5772/1336.
41. Modi SJ, Kulkarni VM. Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2)/KDR inhibitors: medicinal chemistry perspective. *Med Drug Discov*. 2019;2:100009. doi: 10.1007/s10822-015-9859-y.
42. Efthymiou G, Saint A, Ruff M, Rekad Z, Clais D, Van Obberghen-Schilling E. Shaping up the tumor microenvironment with cellular fibronectin. *Front Oncol*. 2020;10:641. doi: 10.3389/fonc.2020.00641.
43. Attieh Y, Clark AG, Grass C, Richon S, Pocard M, Mariani P, et al. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta 3$ -dependent fibronectin assembly. *J Cell Biol*. 2017;216:3509-20. doi: 10.1083/jcb.201702033.
44. Miyazaki K, Oyanagi J, Hoshino D, Togo S, Kumagai H, Miyagi Y. Cancer cell migration on elongate protrusions of fibroblasts in collagen matrix. *Sci Rep*. 2019;9:292. doi: 10.1038/s41598-018-36646-z.
45. Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016;95:493-502. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.07.004.
46. Zhou J, Liu T, Wang W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:e13051. doi: 10.1097/MD.00000000000013051.
47. Kunz P, Sähr H, Lehner B, Fischer C, Seebach E, Fellenberg J. Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2016;16:223.
48. Wang Y, Zhang Z, Zhang W, Xu Z, Zhou X, Roth M, et al. Abstract 5405: Integrative surfaceome profiling identifies MMP14, MRC2 and CD276 as candidate immunotherapeutic target in osteosarcomas. *Cancer Res*. 2020;80:5405. doi: 10.1158/1538-7445.AM2020-5405.
49. Esparza-López J, Martínez-Aguilar JF, Ibarra-Sánchez MJ. Deriving primary cancer cell cultures for personalized therapy. *Rev Invest Clin*. 2019;71:369-80. doi: 10.24875/RIC.19002832.