

Tesis Doctoral

Rol de la proteína SPARC en los mecanismos de angiogénesis

Salvatierra Colussi, Edgardo Enrique

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Salvatierra Colussi, Edgardo Enrique. (2010). Rol de la proteína SPARC en los mecanismos de angiogénesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Salvatierra Colussi, Edgardo Enrique. "Rol de la proteína SPARC en los mecanismos de angiogénesis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular

Rol de la proteína SPARC en los mecanismos de angiogénesis

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Edgardo Enrique Salvatierra Colussi

Director de tesis: Dr. Osvaldo L. Podhajcer

Consejero de Estudios: Dr. Israel Algranati

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas, F. Instituto Leloir

Buenos Aires, 2010

Resumen

La Proteína Secretada Acídica y Rica en Cisteínas (SPARC en Inglés) ha sido asociada con efectos pro- y anti-angiogénicos. En esta tesis inicialmente se ensayó la actividad de la proteína SPARC de diferentes fuentes y todas fueron capaces de inhibir la proliferación, adhesión y migración de células endoteliales. SPARC obtenida de melanoma produjo un efecto bifásico en la proliferación de fibroblastos, aunque sobre las células tumorales no demostró efectos detectables. Por otro lado, SPARC fue capaz de modular la migración de células endoteliales inducida por factores angiogénicos como VEGF y PDGF.

A bajas concentraciones SPARC estimuló la migración de las células endoteliales y a altas la inhibió. En esta última condición dicho efecto estuvo acompañado por el incremento en la capacidad de inducir la diferenciación de las células endoteliales, independientemente de los factores presentes en el medio. Además, encontramos que los niveles de SPARC disminuyen en hipoxia sugiriendo que la modulación de los niveles de SPARC por la tensión de oxígeno sería responsable de los efectos moduladores de la angiogénesis tumoral.

Nuestros datos demuestran que SPARC puede actuar como un factor pro-angiogénico o anti-angiogénico en función de su concentración y los factores con los que interactúa. Hemos demostrado que tiene un rol único en la modulación de la angiogénesis tumoral actuando sobre la diferenciación, migración y proliferación de las células endoteliales.

Palabras claves

Angiogénesis tumoral, SPARC, matriz extracelular, VEGF, FGFb.

Abstract

The Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC in English) has been associated with pro- and anti-angiogenic effects. Here we evaluated the activity of SPARC obtained from different sources and established that each one of them was able to inhibit the proliferation, adhesion and migration of endothelial cells. SPARC obtained from melanoma cells exhibited a biphasic effect on fibroblasts proliferation but has no detectable effects on tumor cells. However, it was able to modulate endothelial cell migration induced by different angiogenic factors such as VEGF and PDGF. At low concentrations SPARC stimulates the migration of endothelial cells but while at higher concentrations SPARC inhibited endothelial cell migration induced by the proangiogenic factors. High SPARC concentrations induced endothelial cell differentiation, regardless of the factors in the environment. Interestingly, SPARC production is down regulated under hypoxia which in turns promotes endothelial migration. Thus, it appears that the modulation of SPARC levels by oxygen tension could be responsible for the pro or anti-angiogenic effects of SPARC.

Our data show that SPARC may act as a pro-angiogenic factor or anti-angiogenic depending on the tumor oxygen levels and factors encountered in tumor environment. We have shown that it has a unique role in the modulation of tumor angiogenesis by acting on the differentiation, migration and proliferation of endothelial cells.

A Napoleón y Raquel

Sin ellos no estaría

A José Luis, Carlos, Diego y Eli

Mis hermanos de la sangre

A Diego y Gabi

Mis hermanos del alma

Agradecimientos

En Campomar, FIL y en la Ciencia:

- A Osvaldo por guiarme en esta etapa, por posibilitar, por darme la oportunidad casi de la nada, por empujarme y por todos los consejos dentro y fuera del lab.
- A la Fundación I. Leloir. Por permitirme utilizar todo, probar y experimentar. Por casi inventariarme como un aparato más.
- A CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por la posibilidad.
- A Fede Prada y Mariano Álvarez, que me enseñaron todo lo que sabían y más.
- A Andrea Llera, con la cual compartí muchas horas de discusión, por sus respuestas y sus consejos siempre acertados.
- A Vanesa Gottifredi, que aunque sin quererlo me impulso en más de un momento con sus palabras.
- A Cynthia, Pipi, que me empujó en muchos momentos y a la que debo muchos experimentos.
- Cronológicamente, a todos la gente del ex103, Mariana, Caro, Vicky, Soraya, Ale; a todos del 107, Ceci, Sole, Romi, Lore, Flor, Vero, Lucia, Mariela, Diego, Caffé, Marcela, Santiago, Leo, Eduardo y todos los que me faltan.
- Especialmente a todos integrantes presentes y pasados por los laboratorios de los Drs. Pitossi, Wappner, Boccacio, Quesada, Prat Gay con los cuales hubieron discusiones, pedidos, ayudas y mucho compartido.
- A Pancho, Ana, Huguito por permitir que todos los días sigamos para adelante. A toda la gente de mantenimiento.
- A la gente de biblioteca por permitir que sea más rápido y fácil conseguir la todo lo necesario para no repetir los mismos aciertos y errores.
- A la gente de Administración por ayudar a que cada uno haga su trabajo.

Más allá del Lab:

- A Claudia por permitir y aguantar todo. Por los infinitos.
- A Diego, por los momentos compartidos. Por el fernet y las largas charlas.
- A Gabi, por ser la voz en carne y hueso de mí conciencia. Por los aguantes.
- A Nico, por agregar un momento deportivo semanal con todo y su dolor muscular incluido.

Parte del trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha sido publicado en revistas internacionales con referato:

- SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int J Cancer*. 2008 Apr1;122(7):1465-75. Erratum in: *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):245. Helene, Sage E [corrected to Sage, E Helene]. PubMed PMID: 18059024. Haber CL, Gottifredi V, Llera AS, Salvatierra E, Prada F, Alonso L, Sage EH, Podhajcer OL.

- The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Dec;27(4):691-705. Review. PubMed. PMID: 18542844. Podhajcer OL, Benedetti LG, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS.

Trabajo en preparación:

“SPARC expression modulated by oxygen tension levels and melanoma-induced angiogenesis”. Edgardo Salvatierra, Cynthia Lopez Haber, Claudia Leishman, Vanesa Gottifredi, Osvaldo L. Podhajcer.

Publicaciones no relacionadas con la tesis durante el periodo:

- Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics*. 2007 Nov;7(22):4123-34. PubMed PMID:17994631. Sosa MS, Girotti MR, Salvatierra E, Prada F, de Olmo JA, Gallango SJ, Albar JP, Podhajcer OL, Llera AS.

- Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res*. 2005 Jun15;65(12):5123-32. PubMed PMID: 15958556. Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, Pitossi FJ, Chuluyan HE, Podhajcer OL.

- Adenovirus-mediated inhibition of SPARC attenuates liver fibrosis in rats. *J Gene Med*. 2008 Sep;10(9):993-1004. PubMed PMID: 18615449. Camino AM, Atorrasagasti C, Maccio D, Prada F, Salvatierra E, Rizzo M, Alaniz L, Aquino JB, Podhajcer OL, Silva M, Mazzolini G.

- Croci DO, Cogno IS, Vittar NB, Salvatierra E, Trajtenberg F, Podhajcer OL, Osinaga E, Rabinovich GA, Rivarola VA. Silencing survivin gene expression promotes apoptosis of human breast cancer cells through a caspase-independent pathway. J Cell Biochem. 2008 Oct 1;105(2):381-90. PubMed PMID: 18553460.

Publicaciones en evaluación no relacionadas:

“Multi-gene expression analysis by means of reduced linear mixed models residuals”
Fernandez, Elmer *, Balzarini Monica, Salvatierra Edgardo, Gidekel Manuel, Bizama Carolina, Benavente Felipe, Espinoza Jaime, Ana Gutierrez and Podhajcer Osvaldo L.
Bioinformatics, Dic 2010.

Tabla de contenido

Introducción	2
Célula maligna y Entorno tumoral.....	2
TEM.....	3
Interacción tumor-estroma.....	3
Matriz extracelular	4
Inflamación.....	5
Angiogénesis	6
Desarrollo de un vaso sanguíneo. Vasculogénesis, angiogénesis.....	8
Los inicios de la angiogénesis	10
Proliferación y migración de las células endoteliales	12
Factores Pro- y Anti-angiogénicos.....	14
Factor de crecimiento endotelial- vascular.....	17
Factor de crecimiento fibroblástico básico	19
Angiogénesis tumoral.....	19
Angiogénesis en melanoma humano.....	23
SPARC.....	24
Filogenia	25
Regulación de la expresión de SPARC	26
Estructura del gen	26
Expresión de SPARC.....	29
Estructura y propiedades bioquímicas de SPARC	31
Las moléculas que interactúan con SPARC	34
SPARC y cáncer.....	38
Origen de SPARC: epitelio-estroma	39

TEM y SPARC	39
SPARC anti-tumoral	40
SPARC, rol pro-tumoral	41
SPARC e Inflamación	41
SPARC y angiogénesis.....	42
Objetivo General.....	47
Objetivos específico 1	47
Objetivos específico 2	47
Objetivos específico 3	47
Resultados	49
Capítulo 1: Caracterización de SPARC <i>in vitro</i>	49
Caracterización de SPARC secretada por células derivadas de melanoma humano .	49
SPARC modula la proliferación endotelial independientemente de la fuente de obtención de la proteína.....	51
SPARC inhibe la proliferación de células endoteliales tanto normales como transformadas	56
SPARC induce una modulación bifásica de la proliferación de fibroblastos.....	58
SPARC no afecta la proliferación de células malignas.	58
La regulación de la expresión endógena de SPARC sensibiliza a las células de melanoma frente al agregado de SPARC exógeno.	61
Capitulo 2: SPARC regula la modulación la migración y la diferenciación endotelial. ...	68
SPARC a diferentes concentraciones, aumenta o inhibe la migración endotelial dependiente de bFGF.....	68
SPARC produce un efecto bifásico en la migración hacia bFGF.....	69
La máxima inhibición, pero no el efecto estimulador, es dependiente de la matriz extracelular donde ocurre la migración.....	70
SPARC aumenta la migración endotelial dependiente de VEGF.....	71

SPARC bloquea la actividad de VEGF.	72
SPARC induce la diferenciación de las células endoteliales	74
Capítulo 3: Efectos de SPARC secretado sobre células endoteliales.....	76
SPARC es la única proteína secretada por las células de melanoma que afecta la migración de células endoteliales hacia factores quimiotácticos	76
Diferentes niveles de tensión de oxígeno regulan la expresión y secreción de la proteína SPARC por las células de melanoma.	81
Los niveles de tensión de oxígeno modulan la expresión de SPARC y por ende, la migración de células endoteliales.....	84
Inducción de la diferenciación endotelial con medios condicionados por células de melanoma.	86
Expresión de VEGF en medio condicionado.....	88
Bloqueo de VEGF/SPARC.....	89
Discusión.....	92
SPARC y efectos sobre células del estroma.	92
SPARC y resistencia a quimioterapéuticos en células tumorales	94
SPARC y sus efectos en la migración en células de melanoma.....	97
SPARC como modulador de la migración y diferenciación de células endoteliales... ..	99
SPARC y migración endotelial.	99
SPARC y diferenciación endotelial	101
SPARC secretada por células de melanoma y su efecto sobre las células endoteliales	102
Modulación de SPARC en hipoxia	103
Terapia Antiangiogénica.....	104
Conclusión.....	107
Material y reactivos	111
Técnicas de cultivo celular eucariota y ensayos funcionales.....	111

Ensayos de migración/invasión in vitro.....	115
Producción y purificación de SPARC humana recombinante.....	119
Preparación de medio condicionado por células de melanoma	120
Dot-blot semicuantitativo	122

Introducción

Introducción

Célula maligna y Entorno tumoral

La tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas que en conjunto producen la transformación progresiva de células normales en células malignas. Cada etapa es el producto de la sumatoria de alteraciones genéticas de distinto tipo que van desde mutaciones puntuales a cambios a nivel cromosómico y epigenéticos (Kinzler and Vogelstein 1996). Cuando observamos la progresión tumoral en modelos animales o en pacientes esta puede analizarse como un proceso análogo a la evolución Darwiniana, donde una serie de cambios genéticos, que confieren alguna ventaja proliferativa a las células, culminan con la conversión progresiva de células normales en células cancerosas (Nowell 1976). Este proceso posee diferentes hitos que pueden ser agrupados como capacidades que una o un grupo de células debe adquirir durante el desarrollo de la enfermedad. Hanahan y Weinberg han sugerido que estas capacidades pueden ser agrupadas en siete hitos fisiológicos discretos por los cuales las células normales deben transcurrir para convertirse en células tumorales malignas y se produzca la progresión de la enfermedad (Figura 1).

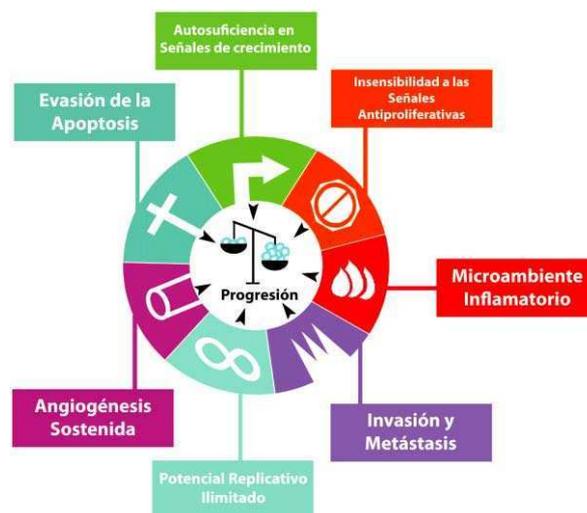


Figura 1 CAPACIDADES ADQUIRIDAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES QUE TODOS LOS TUMORES TIENEN QUE ADQUIRIR POR DIVERSOS MECANISMOS PARA EL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD. ADAPTADO DE(COLOTTA, ALLAVENA ET AL. 2009).

Cada uno de estos hitos son parte de eventos fisiológicos mayores, como la transición epitelio-mesenquimal y la interacción tumor-estroma que involucran tres compartimientos diferentes: el parénquima tumoral conformado por las células malignas, la matriz extracelular (MEC) secretada y las células del estroma como fibroblastos, endotelio y células del sistema inmune asociadas al tumor propiamente dicho.

TEM

El proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un programa del desarrollo embrionario caracterizado por la pérdida de adhesión, represión de la expresión de cadherina-E y aumento de la movilidad celular de las células epiteliales. En este proceso, las células pierden su polaridad y desarrollan un fenotipo mesenquimal altamente plástico e invasivo. Aunque ocurre normalmente en el desarrollo, se ha propuesto que este proceso podría ocurrir en las células tumorales con el objetivo de adquirir un fenotipo invasivo y metastásico (Thiery 2002).

Además, durante la TEM se observa una disminución de la expresión de marcadores epiteliales como las citoqueratinas acompañado por un aumento de marcadores mesenquimales como la vimentina, lo cual conlleva a la adquisición de un fenotipo fibroblastoide invasivo. El factor de transcripción Snail y otros miembros de la misma familia, han sido implicados en la promoción de la TEM, actuando como represores epiteliales y activadores de genes mesenquimales (Cano, Perez-Moreno et al. 2000; De Craene, van Roy et al. 2005; Moreno-Bueno, Cubillo et al. 2006).

Interacción tumor-estroma

Durante las últimas décadas la investigación en el área oncológica estuvo enfocada principalmente en las alteraciones genéticas de células tumorales propiamente dichas. De esta manera se han descrito docenas de oncogenes y genes supresores de tumor con roles muy relevantes en la biología y progresión tumoral (Hanahan and Weinberg 2000). Sin embargo, debemos tener en cuenta que los tumores son muy heterogéneos en cuanto a los tipos celulares que lo componen y que la progresión de la enfermedad es el resultado de la interacción recíproca y concertada entre ellos. Las células malignas necesitan reclutar componentes

endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune para crecer más allá de un determinado tamaño, y lo hacen mediante la secreción de factores de crecimiento, quimoquinas y citoquinas que alcanzan al estroma circundante(Liotta and Kohn 2001). De esta manera podemos pensar al estroma, no como un andamiaje para el crecimiento de las células malignas, sino como componente funcionalmente activo involucrado en el crecimiento tumoral.

Matriz extracelular

Históricamente la investigación en el área del cáncer se ha enfocado en los eventos genéticos y en el comportamiento autónomo de las células malignas. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a enfatizar relevancia que posee la interacción entre las células tumorales y el microambiente, donde se desarrollan eventos esenciales que contribuyen con la transformación maligna, el crecimiento del tumor primario, el proceso metastásico, la tolerancia inmune y la respuesta terapéutica (Wernert 1997; Liotta and Kohn 2001; Desmouliere, Guyot et al. 2004; Lorusso and Ruegg 2008; Whiteside 2008; Joyce and Pollard 2009; Kumar and Weaver 2009).

En esta interacción las células tumorales se comunican y provocan respuestas del microambiente en cada estadio de la progresión maligna, interacción tomada en cuenta durante casi un siglo. Rudolf Virchow en 1863 reporto por primera vez la presencia de leucocitos en el tejido tumoral, proponiendo que el tumor se desarrolla en sitios de inflamación crónica (Balkwill and Mantovani 2001).

En este contexto definimos al tumor como un órgano compuesto de células tumorales, matriz extracelular, células endoteliales y sus precursores, pericitos, células de músculo liso, fibroblastos, mioblastos y células del sistema inmune como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, linfocitos T, B y NK así como células presentadoras de antígenos como macrófagos y células dendríticas(Coussens and Werb 2002; Jung, Ahmad et al. 2002; Farrow, Albo et al. 2008); encontramos vasta evidencia de que cada uno de estos componentes poseen roles activos en el crecimiento y en la progresión tumoral.

En particular el componente no celular del tumor, la MEC, no es solo el soporte estructural que determina la arquitectura tisular sino también es una red en constante remodelación que regula la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. La MEC es capaz de dirigir estos eventos celulares mediante la interacción de sus componentes con los receptores específicos presentes en la membrana celular.

Los componentes principales de la MEC son las glicoproteínas, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina y colágenos, los cuales participan en el ensamblado de la matriz e interaccionan con las células promoviendo funciones celulares específicas mediante las uniones célula-célula y célula-matriz, las cuales son esenciales para el crecimiento y proliferación celular, el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento tisular durante el desarrollo y la cicatrización de heridas (Zamir, Katz et al. 1999).

Las células tumorales interaccionan con la MEC a través de una familia de receptores de transmembrana denominados integrinas. Estas conectan estructuralmente la MEC con el citoesqueleto mediando la adhesión celular hacia y sobre los componentes de la MEC que constituyen el espacio intercelular y en las membranas basales (Lorusso and Ruegg 2008).

Inflamación

A pesar de que la relación entre cáncer e inflamación había sido descrita a comienzo del siglo 19 esta percepción no fue tomada en cuenta hasta hace pocos años donde distintas líneas de investigación llevaron a re-instalar el rol de la inflamación en la progresión tumoral, incluyéndola como el séptimo hito en la escala de Hanahan y Weinberg (Mantovani, Allavena et al. 2008; Colotta, Allavena et al. 2009). Existe amplia evidencia que une el un estado inflamatorio crónico con el desarrollo tumoral así como la modificación del ambiente por el tumor, que recluta células de tipo inflamatorio hacia el entorno tumoral, donde secretan proteasas, factores pro-angiogénicos, quimoquinas y citoquinas las cuales generan un ambiente favorable que promueve la progresión de la enfermedad.

Las características principales de la inflamación relacionada al cáncer incluyen el infiltrado de células blancas, principalmente macrófagos asociados al tumor; la presencia de polipéptidos mensajeros, como citoquinas (TNF, IL1, IL6, etc.), quimocinas (CCL2, CXCL8) y la ocurrencia de remodelación tisular y angiogénesis(Coussens and Werb 2002).

Estos componentes aparecen en el entorno tumoral, mediante dos vías principales. La vía intrínseca, originada a partir de los eventos genéticos asociados con el origen de la neoplasia (Balkwill and Mantovani 2001) está dirigida por oncogenes que poseen la capacidad de orquestar una respuesta pro-inflamatoria. Por otro lado, existe la vía extrínseca donde las condiciones inflamatorias facilitan el desarrollo tumoral. En este sentido tenemos las condiciones inflamatorias crónicas, como las generadas por infecciones (*H. pylori* en cáncer gástrico), enfermedades autoinmunes (Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer de colon) y en condiciones de origen desconocido como la prostatitis en el cáncer de próstata.(Colotta, Allavena et al. 2009).

Angiogénesis

Casi todos los tejidos dependen del aporte sanguíneo para el suministro tanto del oxígeno como de los nutrientes que son esenciales para el funcionamiento y supervivencia celular de los mismos. Este aporte se sostiene gracias a una compleja red de vasos sanguíneos de características dinámicas constituido por células endoteliales. Si las mismas no se extendieran y remodelaran, el crecimiento y la reparación de los tejidos resultarían imposibles.

En 1995, Folkman describió que para sobrevivir virtualmente todas las células están obligadas a residir a menos de 200um de distancia de un capilar sanguíneo en cualquier tejido. Durante la organogénesis, esta cercanía está asegurada mediante el crecimiento coordinado de los vasos y el parénquima. Una vez que el tejido se ha formado, el crecimiento de los nuevos vasos (angiogénesis) es fuertemente regulada de manera transitoria. En este sentido, una característica interesante es que las células endoteliales en proliferación carecen de capacidad intrínseca de

promover la angiogénesis, lo que coarta su posibilidad de expansión (Auerbach and Auerbach 1994; Bouck, Stellmach et al. 1996).

El sistema vascular adulto está constituido por vasos sanguíneos de calibre mayor, las arterias y las venas, que poseen una gruesa y resistente pared de tejido conectivo y de musculatura lisa. La pared interna está revestida por una única capa, muy fina, de células endoteliales separadas de las capas externas por una lámina basal. La cantidad de tejido conectivo y de musculatura lisa de la pared del vaso varía según su diámetro y función, aunque el revestimiento endotelial siempre se encuentra presente. En las ramas más finas del árbol vascular, constituidas por capilares y los sinusoides, las paredes están formadas exclusivamente por una sola capa de células endoteliales y por una lámina basal. De esta forma las células endoteliales revisten todo el sistema vascular, desde el corazón hasta los más finos capilares, controlando el paso de materiales y células hacia el interior y el exterior de la corriente sanguínea.

El proceso de angiogénesis comienza con la extensión de un pseudópodo a partir de una célula endotelial que crece desde la pared de un vaso. Inicialmente, las células forman un brote macizo que luego se vacía hasta formar un tubo. Este proceso continúa hasta que este brote se encuentra con otro capilar, con el cual se conecta permitiendo el flujo sanguíneo. Este proceso se replica in vitro donde los cultivos de células endoteliales con diferentes factores pro-angiogénicos son capaces de formar espontáneamente tubos capilares incluso en ausencia de otros tipos celulares. Inicialmente, aparece en una célula una vacuola alargada rodeada de citoplasma. Las células contiguas desarrollan vacuolas similares y al final, distribuyen sus vacuolas de tal modo que se alinean de manera continua de una célula a otra formando un capilar. Este proceso está estrechamente relacionado con la matriz extracelular en el entorno de las células. Varios componentes de la matriz extracelular, como la laminina, son capaces de activar la formación de capilares y a su vez estos componentes pueden ser secretados por las células endoteliales.

Desarrollo de un vaso sanguíneo. Vasculogénesis, angiogénesis

El componente esencial de los vasos sanguíneos son las células endoteliales. Cada vaso, desde la aorta hacia los capilares más pequeños, consiste en una monocapa de células endoteliales (“el endotelio”), que pavimentan un lumen central en el cual puede fluir la sangre. El endotelio controla el pasaje de nutrientes, células blancas y otros materiales entre el flujo sanguíneo y los tejidos (Bruce Alberts 2002).

El endotelio sano presenta una población celular altamente estable, las uniones célula-célula son muy fuertes y el recambio celular puede medirse en meses o años (Otrock, Mahfouz et al. 2007). Por fuera del endotelio existe un revestimiento denominado membrana basal, que separa a las células endoteliales del tejido conectivo circundante. Esta membrana está compuesta de proteínas fibrilares constituidas principalmente de laminina y colágeno (Bruce Alberts 2002) y células peri-endoteliales de soporte. Estas células se denominan pericitos en la microvasculatura (capilares) y células de músculo liso en los grandes vasos. La membrana basal sirve de armazón sobre el cual las células endoteliales se apoyan y permanecen en quiescencia (Paweletz and Knierim 1989). Los contactos célula-célula y célula-membrana basal mediados por las moléculas de adhesión como las cadherinas e integrinas, son muy importantes y la pérdida de uno u otro tipo de contacto puede llevar a la desestabilización local del endotelio y a la apoptosis de las células endoteliales (Liotta, Steeg et al. 1991).

Por otro lado, los grandes vasos poseen una pared de mayor grosor con células musculares lisas por fuera de la membrana, mientras que los capilares consisten solo de endotelio, membrana basal y pericitos.

La formación de vasos sanguíneos puede separarse en dos grandes procesos. La vasculogénesis, es decir la diferenciación in situ de células endoteliales a partir de células precursoras, hemangioblastos, y su subsecuente organización en una red vascular primitiva. Este procesos está confinado al desarrollo temprano del embrión y es la responsable de la formación de la vasculatura primaria incluyendo los vasos principales del corazón y pulmonares (Patan 2004).

A partir de esta red se generan por angiogénesis todos los vasos siguientes. La angiogénesis es la gemación (sprouting), división (splitting) y remodelación de vasos existentes (Risau 1997).

La angiogénesis extiende la circulación hacia las regiones avasculares mediante un proceso que consiste en una serie de eventos secuenciales e interdependiente (Figura 2):

1. Desestabilización del vaso/activación del endotelio.
2. Aumento de la permeabilidad/Degradación de la matriz extracelular.
3. Extensión del endotelio/proliferación endotelial.
4. Migración de las células endoteliales.
5. Formación del endotelio/Adhesión célula-célula.
6. Formación del túbulo "tubulogénesis".
7. Migración de células mesenquimales hacia el nuevo vaso.
8. Diferenciación de los pericitos.
9. Estabilización del vaso.

La angiogénesis fisiológica es un proceso esencial para el desarrollo del embrión, el crecimiento de los tejidos y la reparación tisular luego de una injuria. Es un proceso altamente restringido en el tejido adulto sano, confinado mayoritariamente al ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, la generación de nuevos vasos puede ser inducida bajo ciertas condiciones patológicas, como la artritis reumatoidea (Walsh 1999), la cicatrización de heridas (Hunt, Knighton et al. 1984), la retinopatía diabética (Sharp 1995) y el crecimiento de tumores sólidos (Folkman 1971).

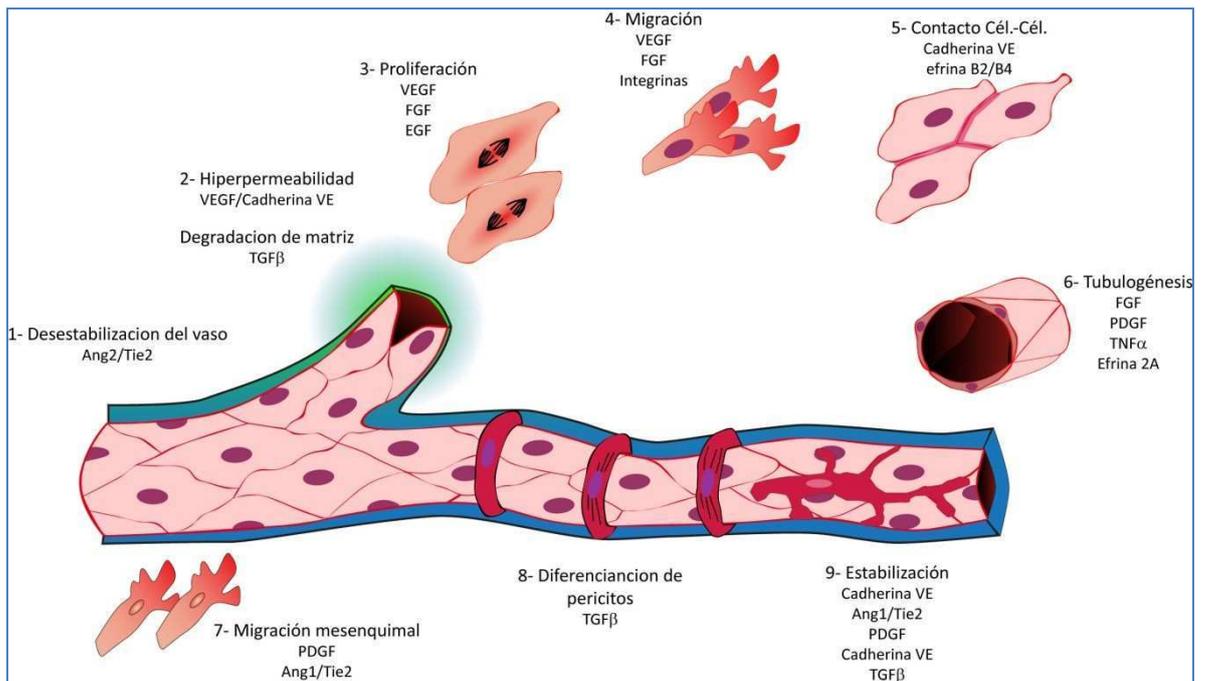


Figura 2 ANGIOGÉNESIS NORMAL. LA ANGIOGÉNESIS NORMAL ESTÁ BASADA EN LA COORDINACIÓN DE VARIOS PROCESOS INDEPENDIENTES. (1) LA REMOCIÓN DE LOS PERICITOS DEL ENDOTELIO Y LA DESESTABILIZACIÓN DE LOS VASOS POR LA ANGIOPEPTINA-2 (ANG2) CAMBIA A LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE UN ESTADO BASAL, FRENADAS EN EL CICLO CELULAR HACIA UN FENOTIPO PLÁSTICO, PROLIFERATIVO. (2) LA HÍPER-PERMEABILIDAD INDUCIDA POR VEGF PERMITE LA EXTRAVASACIÓN LOCAL DE PROTEASAS Y COMPONENTES DE LA MATRIZ DESDE EL FLUJO SANGUÍNEO. (3) LAS CÉLULAS ENDOTELIALES PROLIFERAN Y MIGRAN (4) A TRAVÉS DE LA MEC REMODELADA (5), Y LUEGO FORMAN TÚBULOS (6) A TRAVÉS DE LOS CUALES LA SANGRE PUEDE FLUIR. LAS CÉLULAS MESENQUIMALES PROLIFERAN Y MIGRAN A LO LARGO DE LOS NUEVOS VASOS (7) Y SE DIFERENCIAN EN PERICITOS MADUROS (8). EL ESTABLECIMIENTO DE LA QUIESCENCIA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES, EL REFORZAMIENTO DE LOS CONTACTOS CÉLULA-CÉLULA Y LA ELABORACIÓN DE UNA NUEVA MEC, ESTABILIZA LOS NUEVOS VASOS (9). TGFβ, FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-β; FGF, FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS; EGF, FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO; PDGF, FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS; TNFα, FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α.

El proceso angiogénico posee una gran complejidad que está gobernada por numerosos factores pro- y anti-angiogénicos de diferentes orígenes y mecanismos de acción generados por diversos estímulos. Además, interactúan unos con otros, con las células endoteliales, tumorales y del sistema inmune así como con la MEC para inducir una formación ordenada de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso aún no está comprendido en su totalidad y en ese contexto este trabajo está direccionado a agregar luz sobre los efectos de un componente presente en la MEC que está presente en la mayoría de los tumores sólidos.

Los inicios de la angiogénesis

Al recibir un estímulo netamente angiogénico, las células endoteliales se activan. En esta activación hay disminución de la cantidad y fuerza de las uniones adherentes entre las células adyacentes (Papetti and Herman 2002) y se secretan proteasas que

degradan la MEC circundante (Pepper, Belin et al. 1990). Estas proteasas pueden agruparse en grandes clases, las metaloproteasas de matriz (MMPs), las del sistema plasmina/activador de plasminógeno o serín proteasas (PA) y las catepsinas (Pepper 2001; Bellon, Martiny et al. 2004; van Hinsbergh, Engelse et al. 2006). Muchas de ellas no solo aumentan su expresión sino que también se encuentran asociadas a la membrana celular y el estímulo angiogénico las moviliza y activa hacia el frente de avance celular del endotelio activado (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006).

Las MMPs son capaces de degradar un amplio rango de sustratos y por lo tanto pueden clasificarse como colagenasas, gelatinasas, matrilisinas y unidas a membrana (MT-MMPs) según sus sustrato característico y su ubicación (van Hinsbergh, Engelse et al. 2006). . Por su parte, el plasminógeno es ampliamente expresado y al ser activado por AP se transforma en una proteasa de amplio rango denominada plasmina (Folkman 2002). Resulta interesante que ambas familias de proteasas se encuentran asociadas con distintas clases de inhibidores. Las MMPs son inhibidas por las inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) (Jiang, Goldberg et al. 2002); mientras que el activador del plasminógeno es inhibido por el inhibidor del activador del plasminógeno (IAP), el cual es expresado también por fibroblastos y células endoteliales activadas (Tkachuk, Plekhanova et al. 2009).

Uno de los primeros blancos de estas proteasas producidas por las células endoteliales es la membrana basal, a la cual degradan comenzando a avanzar hacia la MEC circundante. Este proceso es iniciado por una o dos células, las cuales son seguidas por otras hacia el foco pro-angiogénico (Paweletz and Knierim 1989).

Por lo tanto la primer función de los factores de crecimiento pro-angiogénicos, es la estimulación de la producción de proteasas en las células endoteliales (Paweletz and Knierim 1989). Este es un paso clave del en la cascada angiogénica debido a que en ausencia de actividad proteolítica, las células endoteliales se encuentran encerradas dentro de la membrana basal y su movimiento se encuentra impedido (Pepper 2001).

Proliferación y migración de las células endoteliales

Seguido a la extravasación, las células endoteliales continúan secretando enzimas proteolíticas que también degradan la MEC. Esto es necesario para crear un camino sobre el cual las células se puedan mover (Pepper 2001) así como para liberar los factores pro-angiogénicos que se encuentran secuestrados en la matriz, aumentando la intensidad de la señal angiogénica (Hirschi and D'Amore 1996). Al mismo tiempo, las células endoteliales migran desde el vaso parental hacia el tumor (Ausprunk, Falterman et al. 1978) formando pequeñas gemaciones. A medida que más células endoteliales son reclutadas, el nuevo brote crece. Estas gemaciones inicialmente crecen como hebras sólidas de células, formando eventualmente un lumen central. De esta manera se crea la estructura necesaria para un nuevo vaso sanguíneo (Pepper 2001).

Sumado al balance angiogénico entre los factores de crecimiento y los inhibidores, existe un balance proteolítico entre las proteasas y sus inhibidores (Pepper 2001). Una cierta cantidad de proteólisis es necesaria para degradar la membrana basal y la MEC, permitiendo a las células endoteliales salirse del vaso parental facilitando la migración hacia el foco de factores pro-angiogénicos. Sin embargo, la proteólisis excesiva es incompatible con la angiogénesis debido a que la migración endotelial y la formación de túbulos son dependientes de la capacidad celular de adherirse al sustrato subyacente (Pepper 2001). Por lo tanto la secreción de proteasas debe estar precisamente regulada. El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) juega un rol importante en la prevención de la degradación excesiva de la MEC.

La haptotaxis es el movimiento celular en respuesta a un gradiente adhesivo y también es parte del proceso. Sin embargo su efecto es muy complicado aún y no se ha entendido completamente debido a que las células endoteliales están modificando las propiedades adhesivas de su microambiente mediante proteólisis (Pepper 2001) y síntesis de nuevos componentes de la MEC (McCormick and Zetter 1992).

Se ha descrito que uno de los principales componentes involucrados en la interacción célula-MEC es la Fibronectina. Los ensayos in vitro han demostrado que

esta puede promover la migración de las células endoteliales quimio-cinéticamente (Nicosia, Bonanno et al. 1993), y puede inducir la migración direccional de las células endoteliales siguiendo un gradiente de concentración (Bowersox and Sorgente 1982). Sin embargo, in vivo la situación es más complicada dado que es necesaria la degradación de la MEC para facilitar la migración, de este modo las células endoteliales podrían moverse preferentemente hacia el gradiente de fibronectina en concentraciones relativamente bajas, pero luego su progreso se vería impedido a medida que las concentraciones se volvieran muy altas. Por otra parte, es posible que los productos secundarios de la proteólisis de la fibronectina actúen como quimioattractantes, estimulando efectivamente la migración hacia regiones de baja concentración de fibronectina(Nicosia, Bonanno et al. 1993).

Por lo tanto, los efectos de la haptotaxis son poco claros y difíciles de explicar. Una posibilidad es que a altas concentraciones las células endoteliales migrarán bajo un gradiente de fibronectina permisiva para la migración en la MEC mientras que a bajas concentraciones, las células exhibirán su tendencia natural a migrar hacia concentraciones mayores de fibronectina donde existe una mejor interacción célula-MEC.

Se ha reportado que en el endotelio quiescente, el recambio de las células endoteliales es muy bajo, usualmente se puede medir en meses y años(Risau 1997). En el periodo posterior a la extravasación, continúan los niveles bajos de mitosis: la respuesta inicial es completamente migratoria y no proliferativa(Ausprunk, Falterman et al. 1978). No obstante, luego de este período inicial de migración comienza una rápida proliferación de las células endoteliales a corta distancia detrás de las puntas que avanzan aumentando la elongación de las nuevas ramas de la red de vasos sanguíneos (Paweletz and Knierim 1989). En estudios experimentales utilizando células endoteliales irradiadas, incapaces de dividirse, expuestas a un estímulo angiogénico se produce una respuesta inicial normal y se forma una red primitiva de capilares, pero el crecimiento se detiene a los pocos días y la angiogénesis no se completa (Sholley, Ferguson et al. 1984). La proliferación endotelial es por lo tanto necesaria para que la vascularización ocurra y su estímulo

es por lo tanto la tercera función clave de los factores de crecimiento angiogénicos (Otrock, Mahfouz et al. 2007).

Las pequeñas puntas que geman desde los vasos parentales se ramifican aumentando el número de puntas migrantes. Estas gemas se inician creciendo de manera paralela unas a otras pero a cierta distancia de los vasos parentales, comienzan a inclinarse unas hacia otras. Esto lleva a la formación de círculos cerrados (anastomosis), que son necesarias para que comience la circulación dentro de los nuevos vasos generados (Paweletz and Knierim 1989). Aunque aún no se conoce cuáles son los estímulos que llevan al cambio de dirección en el crecimiento y el proceso de anastomosis propiamente dicho es un evento crucial para el desarrollo funcional de la nueva vasculatura. Factores Pro- y Anti-angiogénicos.

Factores Pro- y Antiangiogénicos

Cuando Judah Folkman sugirió por primera vez que el crecimiento del tumor más allá de un diámetro mayor a 2mm era dependiente de su capacidad de reclutar nuevos vasos sanguíneos, no se conocía como podría ocurrir este proceso ni como el tumor era capaz de inducirlo.

Inicialmente se postuló que el tumor debía secretar alguna sustancia difusible que se denominó factor angiogénico tumoral, que debería estimular el crecimiento de nuevos capilares (Folkman, Merler et al. 1971). Los trabajos de Shing describiendo el factor básico derivado de fibroblastos (FGFb) como una molécula capaz de producir una fuerte respuesta angiogénica in Vitro se convirtieron en la primera evidencia directa para la hipótesis de Folkman (Shing, Folkman et al. 1984). Con el devenir del tiempo se fueron descubriendo muchos otros factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Leung, Cachianes et al. 1989), llamado inicialmente factor de permeabilidad vascular, que actúa específicamente sobre las células endoteliales y frecuentemente se encuentra aumentado en los tumores (Cao 2005).

Esto convirtió al factor angiogénico tumoral de la hipótesis de Folkman en un amplio abanico de diferentes factores que actúan directamente sobre el endotelio, los pericitos y/o el estroma subyacente a los vasos sanguíneos.

Como hemos descrito anteriormente el endotelio normal es altamente estable de manera que no es sorprendente que también se hayan descubierto factores inhibitorios de la angiogénesis tales como el interferón- α/β (Dvorak and Gresser 1989), trombospondina-1 (Iruela-Arispe, Bornstein et al. 1991), angiostatina (Cao, Chen et al. 1995) y endostatina (Folkman 2002). Siendo la búsqueda de nuevos inhibidores uno de los campos más activos en la lucha contra el cáncer. Otro grupo de moléculas activas en la inhibición de la angiogénesis son las angiopietinas-1 (Davis, Aldrich et al. 1996) y 2 (Maisonpierre, Suri et al. 1997). El balance entre ambas gobierna la transición entre la quiescencia y el crecimiento angiogénico.

Existen un amplio número de factores pro- y anti-angiogénicos involucrados en el switch angiogénico. La Tabla 1 contiene un resumen de los más importantes activadores e inhibidores.

Como se puede observar en la tabla es interesante notar que existen factores que deben ser colocados en ambas lista debido a que actúan como facilitadores o inhibidores de la angiogénesis dependiendo de su concentración local. Estos factores fueron identificados con un asterisco en la Tabla 1.

Tabla 1 Activadores e inhibidores naturales de la angiogénesis

Activadores	Inhibidores
Angiogenina	Angiostatina (Fragmento de plasminógeno)
Angiopietina-1	Anti-angiogenic anti-trombina III
AC133	Canstatin
Quimoquinas*	Inhibidor derivado del cartílago (CDI)
Del-1	CD59 (fragmento del complemento)

β -estradiol	Endostatina (fragmento de colágeno XIII)
Efrinas	Fragmentos de Fibronectina
FGF- $\alpha\beta$	Fragmento de SPARC
FGF	Heparinasas
Folistatina	HCG
HGF	IFN- $\alpha\beta\gamma$
Id1/Id3	Proteína inducible por interferón (IP-10)
Integrinas, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$	IL4, IL12, IL18
IL8	2-metoxiestradiol
Leptina	Maspina
MCP-1	Kringle-5 (fragmento de plasminógeno)
MMPs	Fragmento de Osteopontina
NOS	Ribonucleasa inhibitoria de placenta
PLGF	Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)
PDGF-BB	PEDF (Factor revidado del epitelio pigmentado)
Pleiotrofina (PTN)	PF4
Factor de crecimiento para células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF)	Fragmento de 16kDa de la prolactina
P1GF	Retinoides

Proliferina	Inhibidor tisular de MMPs (TIMPs)
TGF- $\alpha\beta$ *	TSP-1
TNF- α	Vasculostatina
VE cadherina	
VEGF	

*Pueden tener efectos pro- o anti-angiogénicos.

AC133, marcador de células madres hematopoyéticas; Del-1, locus 1 regulado en el desarrollo; FGF, Factor de crecimiento fibroblástico; HGF, Factor de crecimiento de hepatocito; IL8, interleukina 8; MCP-1, Proteína quimioattractante de macrófagos; MMPs, Metaloproteasas de matriz; NOS, Sintasa de óxido nítrico; PLGF, Factor de crecimiento de placenta; PDGF-BB, Factor de crecimiento derivado de plaqueta -BB; HCG, Gonadotropina coriónica humana; IFN, interferón; TGF, Factor de crecimiento transformante; TNF, Factor de necrosis tumoral; VE cadherina, Cadherina Vascular Endotelial; VEGF, Factor de crecimiento vascular-endotelial; PF4, Factor de plaqueta 4; TSP-1, trombospondina-1.

A continuación se discuten la acción de los factores más importantes para esta tesis.

Factor de crecimiento endotelial- vascular

El factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF (del Ingles), es el principal factor pro-angiogénico caracterizado (Leung, Cachianes et al. 1989), siendo el principal responsable tanto de la formación de neovasos sanguíneos en general como de la angiogénesis tumoral en particular (Karamysheva 2008). Los tres pasos claves de las células endoteliales en el proceso angiogénico son la secreción de proteasas, la migración y la proliferación (ver sección anterior). El VEGF interviene en la inducción de los tres pasos (Leung, Cachianes et al. 1989; Papetti and Herman 2002; Karamysheva 2008) y su acción es casi exclusivamente sobre las células endoteliales (Patan 2004) actuando, además, como un factor de supervivencia ya que inhibe la apoptosis en estas células (Liu, Ahmad et al. 2000).

La regulación de los genes del VEGF, o sus receptores (Flt-1 y Flk-1) causa una alteración severa de la vasculogénesis (Patan 2004). Produciendo una ausencia completa de vasculatura y letalidad temprana del embrión (Carmeliet and Jain

2000). La inactivación post-natal temprana de VEGF resulta también letal, aunque se ha observado que su inactivación en el adulto es menos perjudicial. Esto sugiere que VEGF es un factor crítico durante el desarrollo, pero no es esencial para el mantenimiento de la vasculatura adulta (Yancopoulos, Davis et al. 2000). En pacientes portadores de distintos tipos de cáncer la expresión de altos niveles de VEGF y genes asociados correlaciona con un mal pronóstico que puede incluir un perfil de metástasis aumentado (Hu, Fan et al. 2009).

El VEGF fue inicialmente denominado factor de permeabilidad vascular dado que induce la pérdida de los contactos células, causando pérdida de líquido en los vasos (Patan 2004). Esto se produce debido a la disminución de la expresión de moléculas de adhesión celular, como la VE-cadherina, además de aumentar la expresión de moléculas de adhesión al sustrato como las integrinas, modificando el balance adhesivo célula-célula (característico de un tejido quiescente) forzando una adhesión célula-matriz (característico de un fenotipo invasivo) (Vernon and Sage 1999).

Debido a que el VEGF es un potente factor activador de la angiogénesis su expresión debe ser estrictamente controlada tanto espacial como temporalmente para que el proceso ocurra correctamente. La sobre-expresión produce una red vascular muy fusionada con formación de vasos en áreas usualmente avasculares (Patan 2004; Karamysheva 2008).

Se ha descrito que las células hipóxicas expresan grandes cantidades de VEGF (Shweiki, Itin et al. 1992). Adicionalmente, la presencia de células tumorales puede estimular, directa o indirectamente, la producción de VEGF por las células del huésped, tales como los macrófagos (Bingle, Brown et al. 2002). En este sentido, cabe destacar que en contraste con la expresión altamente regulada que ocurre durante la vasculogénesis y la angiogénesis fisiológica, la neovascularización inducida por el tumor está caracterizada por un exceso en la producción de VEGF de manera indefinida. Esta es la principal razón por la cual la neovascularización asociada al tumor a menudo es tortuosa, discontinua e hiperfusionada (Hashizume, Baluk et al. 2000).

Factor de crecimiento fibroblástico básico

Al contrario que el VEGF, el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF) actúa sobre varios tipos celulares como las células de músculo liso, pericitos, fibroblastos así como sobre las propias células endoteliales (Han and Liu 1999).

Al igual que el VEGF, este factor también es un potente quimioattractante y mitógeno de células endoteliales (Risau 1997; Polnaszek, Kwabi-Addo et al. 2003) y es fuertemente expresado por las células tumorales hipóxicas (Sato, Tozawa et al. 1995). Existe evidencia de que ambos factores interaccionan directamente y pueden actuar de forma sinérgica (Vernon and Sage 1999).

bFGF aumenta la expresión tanto de PA como de PAI en las células endoteliales, produciendo un efecto neto de degradación proteolítica (Pepper, Belin et al. 1990; Liotta, Stetler-Stevenson et al. 1991). Además es capaz de aumentar la adhesión célula-matriz, incrementando el potencial invasivo de las células endoteliales.

Angiogénesis tumoral

Ya desde la antigüedad se ha observado que la relación entre cáncer y angiogénesis. Galeno, en el siglo II DC acuñó el término cáncer (del griego *karkinos*, cangrejo) dada la similitud entre las patas de estos animales y los grandes vasos sanguíneos asociados con los tumores (Cortés Gabaudán 2004). Más cercano en el tiempo diversos experimentos en los sesenta comenzaron a demostrar la existencia de factores secretados por las células tumorales que promovían la generación de nuevos vasos sanguíneos (Greenblatt and Shubi 1968). Durante los últimos 40 años, estos factores han sido estudiados en profundidad, descubriéndose numerosas moléculas estimuladoras o inhibitoras que se mantienen en un balance homeostático (Eichhorn, Kleespies et al. 2007).

Los tumores son poblaciones de células derivadas del hospedador que han perdido su capacidad de regular el crecimiento y por lo tanto proliferan aberrantemente. A pesar de que poseen características distintivas, en muchos aspectos las células tumorales son similares a las normales. La mayor similitud es la necesidad de un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes y un sistema de remoción de los

desechos generados permitiendo que ocurran los procesos metabólicos para mantener la supervivencia. La proximidad a un lecho vascular permite que esos requerimientos se cumplan. Las células tumorales típicamente forman un grupo de crecimiento continuo, que se sustenta en la difusión pasiva para la provisión de oxígeno y nutrientes para el descarte de los desechos generados (Sutherland 1988). A medida que la masa tumoral crece, disminuye su capacidad de absorber nutrientes y eliminar toxinas (Sutherland 1986). Esta fase de crecimiento se denomina avascular y puede persistir limitado por difusión hasta un diámetro de 2mm, en el cual la proliferación esta balanceada por la muerte celular por varios meses o años. En esta fase latente el tumor raramente causa daño y frecuentemente no es detectable(Folkman 2002).

Sin embargo, el tumor puede progresar de la latencia. A medida que la masa tumoral crece, disminuye su capacidad de absorber nutrientes y eliminar toxinas (Sutherland 1986). Para sostener el desarrollo tumoral se debe inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. (Folkman 1971)(FIGURA 3). Este cambio hacia la vascularización se denomina “cambio angiogénico” y está dirigido por un gran número de factores estimulantes e inhibidores, algunos de los cuales son secretados por las células tumorales y otros por las células del hospedador en respuesta a la presencia del tumor(Hanahan and Folkman 1996; Carmeliet and Jain 2000).

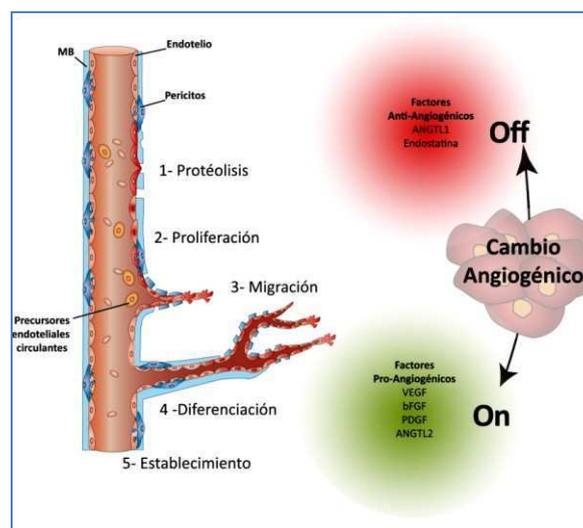


Figura 3 CAMBIO ANGIOGÉNICO. LOS TUMORES CRECEN EN UNA FASE AVASCULAR (OFF) OBTENIENDO OXÍGENO Y NUTRIENTES POR DIFUSIÓN. SOBREPASANDO EL LÍMITE DE LA DIFUSIÓN SE INICIA UN PROGRAMA PRO-ANGIOGÉNICO (ON) QUE DISPARA PROCESOS ANGIOGÉNICOS FISIOLÓGICOS.

El cambio angiogénico es un proceso altamente complejo relacionado con la carencia de oxígeno (hipoxia) en el centro del tumor. Esta hipoxia es el factor modulador de la expresión de factores angiogénicos en las células tumorales (Shweiki, Itin et al. 1992) como VEGF, FGFb, PDGF, ANGTL2(Cao 2005).

La angiogénesis mejora el suministro sanguíneo tumoral, proveyéndolo casi ilimitadamente de oxígeno y nutrientes y de un sistema de eliminación de metabolitos tóxicos, permitiéndole un rápido crecimiento (Carmeliet and Jain 2000). Además, la proximidad de un gran número de vasos sanguíneos aumenta la probabilidad de que las células tumorales entren al sistema sanguíneo y sean transportadas hacia partes lejanas en el cuerpo. Este proceso es el principal peligro ya que estas células pueden establecerse como tumores secundarios, metástasis, que constituyen el mayor problema clínico de la enfermedad (Holmgren, O'Reilly et al. 1995). Los tumores más agresivos son capaces de inducir una angiogénesis robusta e indefinida que si no es tratada eficientemente puede ser fatal (Pawletz and Knierim 1989).

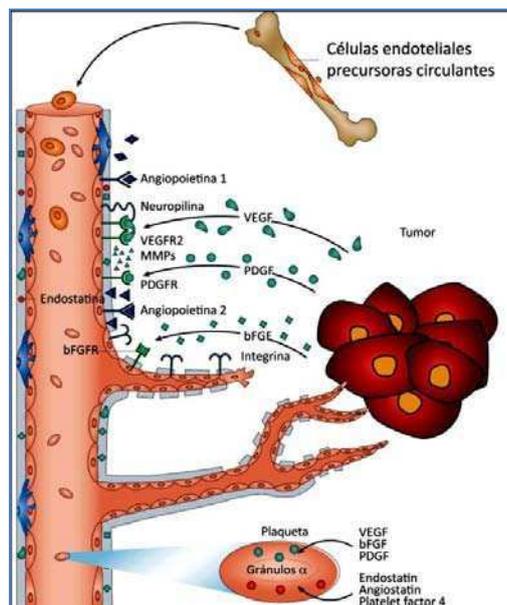


Figura 4 ANGIOGÉNESIS TUMORAL. UNA VEZ QUE OCURRIÓ EL CAMBIO ANGIOGÉNICO, EL TUMOR UTILIZA LOS MISMOS RECURSOS QUE LAS CÉLULAS NORMALES PARA PROGRESAR EN LA ENFERMEDAD.

En la angiogénesis fisiológica, una vez que el tejido blanco se ha vascularizado, la expresión del factor de crecimiento angiogénico cesa. La migración, proliferación y proteólisis por parte de las células endoteliales se detiene y los vasos recién formados comienzan un proceso de maduración (Karamysheva 2008). Se reestablecen las uniones célula-célula en el endotelio y las células endoteliales secretan proteínas como la laminina y el colágeno, formando una membrana basal continua (Paweletz and Knierim 1989). Finalmente las células peri-endoteliales (en su mayoría pericitos en la microvasculatura) son reclutadas y el nuevo vaso se vuelve parte del sistema vascular quiescente. Este proceso de maduración usualmente no ocurre en la angiogénesis tumoral. A pesar de que los capilares penetran en el borde del tumor aportándole oxígeno, éste aún posee regiones en hipoxia que continúan produciendo factores angiogénicos (Sutherland 1986). Además, como las nuevas áreas vascularizadas del tumor crecen, agotan nuevamente el suministro aportado por los nuevos vasos y desarrollan nuevas áreas hipóxicas (Holash, Wiegand et al. 1999). El cambio angiogénico permanece encendido y continúan creciendo nuevos capilares, llevando el suministro sanguíneo a través del tumor que de esta manera crece rápidamente y de manera heterogénea. Esto crea un círculo vicioso donde la angiogénesis continua promueve el crecimiento tumoral y esto a su vez genera nuevas áreas de hipoxia generando una nueva necesidad de vascularización. En un tumor altamente agresivo esta necesidad nunca es satisfecha (Paweletz and Knierim 1989).

Cabe destacar que a pesar de que los vasos generados forman un conducto por el cual llegan los metabolitos, estructuralmente son anormales. Muchos de los capilares relacionados al tumor carecen de pericitos funcionales (Benjamin, Golijanin et al. 1999). Usualmente, estos capilares no son capaces de formar vasos maduros y estables con una membrana basal continua debido a la producción constante de factores angiogénicos (Papetti and Herman 2002). En consecuencia, la nueva vasculatura es dilatada, irregular, tortuosa y extremadamente permeable debido a la presencia de aberturas y huecos transcelulares (Hashizume, Baluk et al. 2000). En este sentido se ha observado que la vasculatura tumoral se encuentra en constante remodelación, mientras que en algunas áreas la red involuciona en otras sufre una

profunda inducción de la angiogénesis, proveyendo soporte a la región avascular adyacente(Vajkoczy, Farhadi et al. 2002).

Otro mecanismo para una vascularización adecuada es el crecimiento de células tumorales yuxtapuestas a vasos existentes por lo cual en un principio no requieren inducir nuevos vasos (Holash, Wiegand et al. 1999). Adicionalmente, se ha observado que los precursores endoteliales circulantes derivados de la médula ósea también son reclutados contribuyendo con la vasculatura tumoral(Rafii 2000).

Angiogénesis en melanoma humano

El melanoma humano es un tumor altamente metastásico de pronóstico pobre y alta resistencia a la terapia. Clínicamente la enfermedad progresa a través de diferentes estadios: nevo benigno, nevo displásico, melanoma in situ, melanoma en fase de crecimiento radial, melanoma en fase de crecimiento vertical y melanoma metastásico (Breslow 1970). El tumor primario crece horizontalmente a través de la epidermis, con el tiempo ocurre el crecimiento vertical y el melanoma aumenta su espesor invadiendo la dermis(Mahabeleshwar and Byzova 2007).

Una vez que se desarrolla la fase vertical hay una correlación entre el espesor del tumor y el número de metástasis (Heasley, Toda et al. 1996). En paralelo con la progresión, el melanoma adquiere una extensa red vascular a medida que las células tumorales aumentan la expresión de receptores de laminina lo que permite la adhesión a la pared vascular y la extravasación y metástasis (Mahabeleshwar and Byzova 2007). La neo-vascularización del melanoma se correlaciona con el mal pronóstico, la supervivencia general y el aumento de la probabilidad de recaída (Mahabeleshwar and Byzova 2007).

Dado que se ha descrito que las células endoteliales son los principales efectores del proceso de angiogénesis mientras que los demás componentes del endotelio y el microambiente circundante contribuyen principalmente en la remodelación de las bifurcaciones y la formación de tubos por las células endoteliales, en esta tesis principalmente utilizaremos el cultivo de líneas de células endoteliales derivadas de

aorta bovina (células BAE) y microendoteliales dérmica humanas transformadas (HMEC1) como modelo in vitro del proceso de angiogénesis.

SPARC

Las proteínas matricelulares median la interacción celular con su microambiente (Alford and Hankenson 2006). SPARC (del inglés *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), es una proteína matricelular que regula el recambio y la remodelación de los componentes de la MEC. Posee propiedades contra-adhesivas, induce el redondeamiento celular, inhibe el estiramiento de las células(Sage, Vernon et al. 1989), está involucrada en el desensamblado de los contactos focales y la reorganización de las fibras de estrés (Murphy-Ullrich, Lane et al. 1995) además de demorar el ciclo celular de varios tipos celulares en G1 (Funk and Sage 1991).

Termine y col. identificaron por primera vez a SPARC como el componente proteico mayoritario del tejido óseo después del colágeno, denominándola osteonectina(Termine, Kleiman et al. 1981) dado que luego de su unión al colágeno promueve la deposición de calcio en el hueso(Termine, Kleiman et al. 1981). Tres años más tarde, SPARC fue aislada de cultivos de células endoteliales bovinas como una glicoproteína de 43 kDa (Sage, Johnson et al. 1984). Se ha observado que SPARC presenta una expresión predominantemente en células no epiteliales de tejidos en desarrollo durante la embriogénesis así como tejido adulto en remodelación como intestino, ovario, testículo, glándulas mamarias, hueso y heridas en cicatrización(Lane and Sage 1994). En particular, en las heridas en cicatrización luego de una injuria las plaquetas aportan SPARC durante la degranulación, adicionalmente la concentración de SPARC aumenta localmente debido a la expresión y secreción del mismo por los fibroblastos y los macrófagos.

Adicionalmente se ha descrito que sparc es uno de los genes que más se expresa en diversos tipos de estrés(Weaver, Workman et al. 2008) y particularmente en el shock de cultivo cuando se disgrega el tejido y se siembran en placa(Sage 1986).

Filogenia

SPARC es el producto de un único gen que se ha mantenido altamente conservado a lo largo de la evolución (Tabla 2). La comparación de la secuencia de la proteína humana con la de otros mamíferos (Termine, Kleiman et al. 1981; Mason, Taylor et al. 1986), anfibios (Damjanovski, Liu et al. 1992), y aves (Bassuk, Iruela-Arispe et al. 1993) mostró una identidad mayor al 70% ; mientras que con SPARC de *C.elegans* y *D.melanogaster* se observa una homología del 30% (Tabla 2) (Schwarzbauer and Spencer 1993; Martinek, Zou et al. 2002).

Especie	Símbolo	GenBank	Identidad (%)
Homo sapiens vs:	SPARC	NP_003109.1	
Pan troglodytes	SPARC	XP_527087.2	100.0
Canis lupus fam.	SPARC	XP_854982.1	97.4
Bos taurus	SPARC	NP_776889.1	99.0
Mus musculus	Sparc	NP_033268.1	92.7
Rattus norvegicus	Sparc	NP_036788.1	93.0
Gallus gallus	SPARC	NP_989741.1	86.6
Danio rerio	sparc	NP_001001942.1	80.8
Xenopus laevis	Sparc	NP_001079752.1	86.5
Oncorhynchus mikkis	sparc	NP_001118174.1	82.5
Drosophila melanogaster	BM-40- SPARC	NP_651509	33.2
Caenorhabditis elegans	ost-1	NP_500039.1	34.0

Tabla 2 IDENTIDAD Y FILOGENIA. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE SPARC EN DIFERENTES ESPECIES. LOS VALORES INDICAN IDENTIDAD DE AMINOÁCIDOS LUEGO DE ALINEARLOS DE A PARES (INFORMATION 2008).

Regulación de la expresión de SPARC

Estructura del gen

Sparc es un único gen localizado en el brazo largo del cromosoma 5 humano, en la posición 5q31-q33-q32 (Swaroop, Hogan et al. 1988). El gen humano consiste de 10 exones, con una longitud total de aproximadamente 25,9 Kb (Figura 5) con el primer exón no codificante seguido de un intrón que contiene motivos regulatorios (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994; Satyamoorthy, Samulewicz et al. 1997). El exón 1 contiene la región 5' no traducible y la secuencia repetida CCGT, que es capaz de estimular la expresión de genes reporteros. El exón 10 contiene toda la región 3' no traducible y por lo menos dos sitios de poliadenilación diferencial (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994). Esta organización génica está altamente conservada entre todos los vertebrados (Lane and Sage 1994) observándose ligeras diferencias en *C. elegans*, donde los exones 1, 3 y 10 están ausentes y el exón 6 y 7 están unidos (Schwarzbauer and Spencer 1993).

Además el genoma posee una región, entre el exón 1 y el intrón 1, con islas CpG de alrededor de 300pb. Estas se encuentran frecuentemente metiladas por DNMT3a en varios tipos tumorales (Socha, Said et al. 2009).

El promotor mínimo de SPARC se encuentra localizado entre los nucleótidos -51 a -120 del gen humano, carece de caja TATA o CAAT y está compuesto casi exclusivamente de purinas siendo GGA el principal motivo repetitivo. Este motivo referido como caja GGA 1, está separado por un espaciador de 10bp de bajo contenido en purinas, de una segunda caja GGA localizada a -131 y -165pb. Ambas cajas GGA son reguladores positivos de la actividad del promotor (Hafner, Zimmermann et al. 1995). En la caja GGA 1 también se encuentran tres sitios de unión de receptores de Retinoide X/Vitamina D seguidos de una caja E. En concordancia, se ha demostrado que el ácido retinoico (Mason, Murphy et al. 1986), la dexametasona (Ng, Manji et al. 1989) y el butirato sódico (Hafner, Zimmermann et al. 1995) son reguladores de la expresión de SPARC.

También se han encontrado varias secuencias consenso para AMPc en la región del promotor y en el primer exón (Young, Findlay et al. 1989), además de secuencias de respuesta a choque térmico consistente con la estimulación de la expresión observada por calor y estrés (Kudo, Hirayoshi et al. 1994).

El mensajero de SPARC más abundante posee 2,2 kb y contiene un marco de lectura entre los nucleótidos 84 a 992, seguido por un largo 3' no codificante y una señal de poliadenilación en el sitio 2104-2109. Aunque se desconoce su función, en algunos tipos celulares podemos encontrar un transcripto de 3,3kb con una región codificante idéntica aunque con una señal de poliadenilación alternativa más alejada (Swaroop, Hogan et al. 1988). Estos mensajeros son muy estables, poseen una vida media de más de 24hs (Delany and Canalis 1998). Sin embargo su degradación puede ser inducida por microARN (miR-29) los cuales se unen a un sitio altamente conservado en el extremo 3'(Kapinas, Kessler et al. 2009).

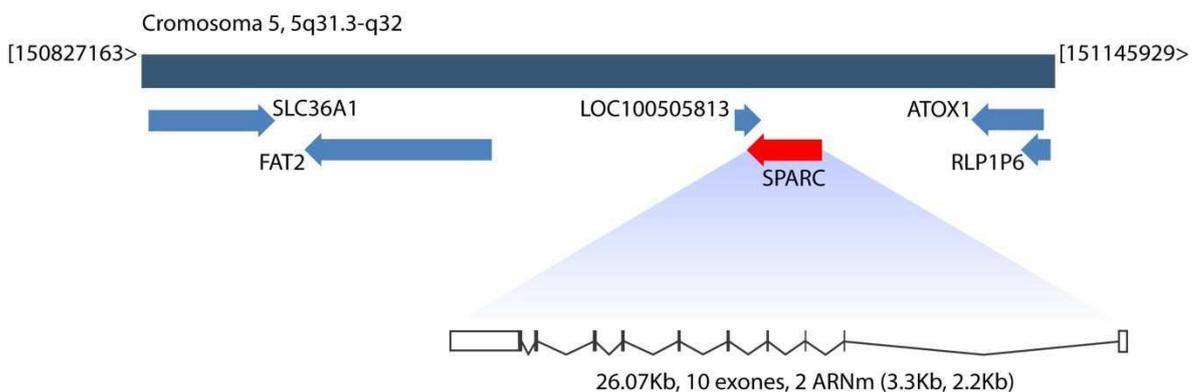


Figura 5 ESTRUCTURA DEL GEN SPARC HUMANO. REGIONES GENÓMICAS, TRANSCRIPTOS Y PRODUCTOS. POSICIÓN GÉNICA DE SPARC EN EL GENOMA HUMANO. EN AZUL OSCURO, CROMOSOMA 5. LAS FLECHAS INDICAN GENES EN LOS ALREDEDORES. LAS CAJAS LLENAS CORRESPONDEN A LOS EXONES QUE CODIFICAN LA PROTEÍNA, LAS CAJAS VACÍAS A LA REGIÓN 5 U 3'UTR. LAS LÍNEAS CORRESPONDEN A LOS INTRONES. DE DERECHA A IZQUIERDA SE MUESTRAN DESDE EL EXÓN 1 AL 10. ADAPTADO WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/GENE/6678.

Sparc es considerado un gen de expresión tardía en células diferenciadas que responde al tratamientos in vitro a ácido retinoico, dexametasona y choque térmico (heat shock)(Young, Findlay et al. 1989; Brekken and Sage 2000). En células de carcinoma embrionario murino la presencia de ácido retinoico induce un aumento

de SPARC de hasta 20 veces en los niveles tanto de ARNm como proteína (Mason, Taylor et al. 1986; Nomura, Hashmi et al. 1989). De igual manera se ha observado que tanto en células de sarcoma osteogénico de rata tratadas con dexametasona como en condrocitos embrionarios de pollos sometidos a tratamiento térmico se produce la inducción de la expresión de SPARC (Ng, Manji et al. 1989), (Neri, Descalzi-Cancedda et al. 1992).

Por otro lado, varias citoquinas y factores de crecimiento han sido identificados como reguladores de la producción del ARNm de SPARC. TGF- β 1 fue capaz de aumentar la expresión de SPARC de tres a cuatro veces en fibroblastos (Wrana, Kubota et al. 1991; Reed, Vernon et al. 1994), en osteoblastos (Shiba, Fujita et al. 1998; Shiba, Uchida et al. 2001), en condrocitos (Chandrasekhar, Harvey et al. 1994; Nakamura, Kamihagi et al. 1996) y en células epiteliales de pulmón (Schiemann, Neil et al. 2003). La activina, un miembro de la familia de TGF- β , estimuló la expresión temprana de SPARC en embriones de *Xenopus* y presentó un efecto sinérgico junto con FGF-2 en la estimulación de la producción de ARNm de SPARC (Damjanovski, Huynh et al. 1998). En otros estudios, BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), otro miembro de la familia del TGF- β , indujo un aumento en los niveles de ARNm de SPARC en condrocitos articulares de conejo (Nakamura, Kamihagi et al. 1996). La expresión de SPARC también fue inducida en estas células por IGF-1 y PDGF (Chandrasekhar, Harvey et al. 1994). En adipocitos se ha detectado inducción de la expresión de SPARC por insulina (Tartare-Deckert, Chavey et al. 2001).

El tratamiento con el factor de crecimiento epidérmico EGF también indujo una disminución en los niveles de ARNm de SPARC en osteoblastos (Shiba, Fujita et al. 1998). Citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α inhibieron la producción y secreción de SPARC en condrocitos articulares (Chandrasekhar, Harvey et al. 1994; Nakamura, Kamihagi et al. 1996) y en osteoblastos (Shiba, Fujita et al. 1998). Se ha descrito un efecto inhibitorio del óxido nítrico (NO) sobre la expresión de SPARC por células mesangiales (Walpen, Beck et al. 2000; Beck, Walpen et al. 2001) y aparentemente el NO actuaría a través del factor de transcripción Erg, necesario para la proliferación de las células endoteliales (McLaughlin, Ludbrook et al. 2001).

El efecto de los factores de crecimiento bFGF y PDGF aún es controvertido y depende del tipo celular. Mientras que bFGF fue capaz de inhibir la producción de SPARC en condrocitos (Nakamura, Kamihagi et al. 1996), en osteoblastos humanos (Shiba, Fujita et al. 1998) y en la línea osteoblástica murina MC3T3, mediante la disminución en la vida media del ARNm de SPARC (Delany and Canalis 1998), células mesangiales de ratón mostraron un aumento en los niveles de ARNm de SPARC en respuesta a bFGF (Pichler, Bassuk et al. 1996). El tratamiento de osteoblastos humanos con PDGF indujo una disminución en los niveles de ARNm de SPARC (Shiba, Fujita et al. 1998). Sin embargo, PDGF indujo la expresión de SPARC en células mesangiales y en condrocitos articulares (Chandrasekhar, Harvey et al. 1994; Pichler, Bassuk et al. 1996).

En resumen, existen diversas citoquinas y factores de crecimiento que regulan la expresión de SPARC humano y podemos agruparlas según su acción en inductores o inhibidores (Figura 6).

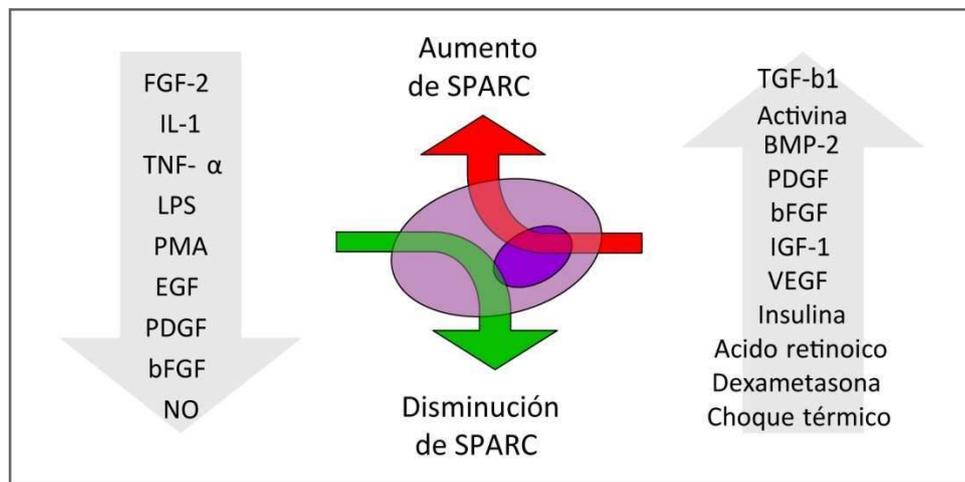


Figura 6 REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE SPARC. LAS MOLÉCULAS FUERON ORDENADAS SEGÚN EL EFECTO INDEPENDIENTEMENTE DEL MODELO PROBADO. LAS MOLÉCULAS QUE SE DESCRIBIERON COMO ESTIMULADORES E INHIBIDORES SE COLOCARON EN AMBOS LADOS. ADAPTADO DE PRADA, 2007 (PRADA 2007)

Expresión de SPARC

La expresión de SPARC se encuentra regulada en forma temporal y espacial durante el desarrollo (Holland, Harper et al. 1987; Sage, Vernon et al. 1989; Nomura, Hashmi et al. 1990; Schwarzbauer, Musset-Bilal et al. 1994; Damjanovski, Huynh et al. 1998). En anfibios, la expresión de SPARC comienza luego de la gastrulación y el

ARNm se acumula rápidamente en estructuras mesodérmicas y ectodérmicas de la néurula (embriones en estadio 13)(Lane and Sage 1994). En ratones, la expresión de SPARC puede ser detectada al día 9 del desarrollo embrionario en el primordio del corazón, somitos, y membranas extraembrionarias. Más tarde en el desarrollo, alrededor del día 14, SPARC es expresado en cartílago, hueso, epitelio del tracto digestivo, piel y vasos sanguíneos (Holland, Harper et al. 1987; Sage, Vernon et al. 1989). Niveles elevados de ARNm y proteína SPARC han sido descritos en huesos y dientes durante el desarrollo, principalmente en osteoblastos, odontoblastos, y fibroblastos adyacentes a condrocitos (Mundlos, Schwahn et al. 1992).

En el adulto, la expresión de SPARC parece estar limitada a tejidos que sufren remodelación, como el intestino, hueso y tejidos en reparación (Holland, Harper et al. 1987; Sage, Decker et al. 1989). Tanto el ARNm como la proteína SPARC se han encontrado en la microvasculatura del cerebro en desarrollo y en heridas dérmicas durante procesos de angiogénesis (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994). SPARC ha sido encontrada en zonas de angiogénesis durante el crecimiento de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, y su expresión correlaciona con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Iruela Arispe, Lane et al. 1995). Se ha observado una expresión moderada de SPARC en condrocitos, trofoblastos, células de músculo liso vascular y una elevada expresión fue observada en fibroblastos, células endoteliales y tejidos en reparación (Porter, Sage et al. 1995). Aunque la mayoría de las células hematopoyéticas no producen SPARC, se ha encontrado ARNm y proteína en megacariocitos (Kelm, Hair et al. 1992) y en macrófagos (Raines, Lane et al. 1992; Reed, Puolakkainen et al. 1993). Una mayor expresión de SPARC ha sido observada en las células ganglionares y astrocitos de la retina de animales adultos en comparación con animales recién nacidos(Yan and Sage 1999; Kantorow, Huang et al. 2000).

En células en cultivo, SPARC puede ser detectada principalmente en el medio de cultivo como un producto de secreción y en menor cantidad en el citoplasma, con una localización perinuclear. Sin embargo, algunos autores han descrito la localización nuclear de SPARC (Yan, Weaver et al. 2005). SPARC ha sido encontrada

en el núcleo de células embrionarias de pollo y de células endoteliales de bovinos adultos con una distribución dependiente del ciclo celular (Gooden, Vernon et al. 1999) y en células de la retina de pollos (Yan and Sage 1999). Además, Gooden *et al* demostraron que SPARC extracelular puede ser tomada por las células y transportada hasta el núcleo (Gooden, Vernon et al. 1999).

Estructura y propiedades bioquímicas de SPARC

En vertebrados, SPARC codifica para una proteína de entre 298 y 304 aminoácidos, de los cuales los primeros 17 constituyen el péptido señal, que es removido antes de que la proteína sea secretada (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994).

SPARC madura de origen humano está compuesta por 286 aminoácidos y posee un punto isoeléctrico de 4,76. Si bien luego de la eliminación del péptido señal SPARC posee un peso molecular teórico de 32 kDa (Mason, Taylor et al. 1986), la forma secretada migra en geles SDS-PAGE como una banda de 43 kDa, en parte debido a la glicosilación (Sage, Johnson et al. 1984); y en parte por el aumento del volumen hidrodinámico, característico de la familia de las proteínas nativamente desplegadas (Fink 2005). La composición de la glicosilación de SPARC depende del tejido donde es producida. Mientras que SPARC producida por tejido óseo presenta una glicosilación de tipo alta manosa, estudios realizados con SPARC purificada a partir de plaquetas o de melanoma humano mostraron la presencia de azúcares complejos (Kelm, Hair et al. 1992; Ledda, Bravo et al. 1997).

A partir de estudio de cristalografía de rayos X se propuso un modelo de tres dominios estructurales independientes (Maurer, Sasaki et al. 1997):

Dominio I: (dominio ácido, aminoácidos 3-51): Está codificado por los exones 3 y 4 y consiste en una región ácida ($pI \sim 3$) rica en Asp y Glu. La estructura de este dominio no ha sido resuelta, y resultados de espectroscopia de dicroísmo circular predijeron la existencia de regiones con características de hélice alfa sensibles a cambios en la concentración de Ca^{2+} (Maurer, Mayer et al. 1992). Las dificultades para cristalizar este dominio sugieren que es responsable de las características de proteína nativamente desplegada que muestra SPARC (Uversky 2002). Este dominio

posee baja afinidad por Ca^{2+} (Maurer, Mayer et al. 1992), y se une a hidroxiapatita, por lo que ha sido implicado en la mineralización de cartílago y hueso (Romberg, Werness et al. 1985). Este dominio N-terminal contiene los epítopes inmunodominantes (Stenner, Romberg et al. 1984; Maillard, Malaval et al. 1992) y es la región que presenta mayor variabilidad entre especies (Figura 7A). Los dos residuos N-terminales adyacentes Glu3 y Glu4 pueden actuar como aceptores aminos en reacciones de unión cruzada (*crosslinking*) catalizadas por la transglutaminasa c (Hohenadl, Mann et al. 1995) particularmente en cartílago (Aeschlimann, Wetterwald et al. 1993; Aeschlimann, Kaupp et al. 1995) como en fibrosis hepáticas (Grenard, Bresson-Hadni et al. 2001). Además del *crosslinking* por transglutaminación, también se ha aislado una glicoproteína de hueso unida a SPARC mediante puentes disulfuro (Zhou, Salih et al. 1998).

Dominio II (FS (*follostatine-like*), aminoácidos 52-132): Está codificado por los exones 5 y 6 y contiene 10 cisteínas y un carbohidrato en la posición Asn99, cuya naturaleza depende del tejido donde SPARC es producida. Existen diferencias entre hueso y plaquetas en la glicosilación de SPARC que han sido propuestas como responsables de diferencias estructurales y funcionales (Kelm and Mann 1991). La estructura de este dominio es homóloga al dominio repetido de folistatina. El análisis por cristalografía de rayos X mostró que el dominio II consiste en una estructura alargada formada por un horquilla- β N-terminal y un pequeño núcleo de estructura mixta α/β (Figura 7A). Tanto la secuencia como la estructura cristalina indican que el núcleo del dominio II se asemeja a un inhibidor de serina-proteasa de la familia Kazal, y que la horquilla- β N-terminal se parece al del EGF (Hohenester, Maurer et al. 1997). La región N-terminal del dominio II posee afinidad por heparina y proteoglicanos (Hohenester, Maurer et al. 1997) y la región C-terminal posee dos sitios con afinidad por Cu^{+2} (Vernon and Sage 1989).

Dominio III (EC (*extracellular Ca^{2+} -binding domain*), aminoácidos 133-285): Está codificado por los exones 7 a 9. El estudio por cristalografía de rayos X reveló la estructura globular de este dominio que contiene dos motivos *EF-hand* (manos EF) con elevada afinidad por Ca^{+2} (K_d de 10^{-7} M) (Hohenester, Maurer et al. 1996). El

dominio EC interacciona con una hélice N-terminal anfifílica del dominio II definiendo un nuevo módulo de unión a calcio (Hohenester, Maurer et al. 1996) (Figura 7A). Dicha interacción tiene lugar a través de múltiples residuos que aparentemente estabilizan la unión a Ca^{2+} (Hohenester, Maurer et al. 1997). Los colágenos fibrilares tipo I, III y V, y el colágeno de lámina basal de tipo IV, se unen al dominio EC de SPARC en forma dependiente de la concentración de Ca^{+2} (Pottgiesser, Maurer et al. 1994; Maurer, Hohenadl et al. 1995; Sasaki, Gohring et al. 1997; Sasaki, Hohenester et al. 1998) (Figura 7B). La afinidad de SPARC por colágeno puede ser aumentada por el clivaje entre las leucinas L197 y L198, y ha sido demostrada la especificidad *in vitro* de varias metaloproteasas de MEC (MMP-7, MMP-3, MMP-2 y MMP-13) para clivar a SPARC en dicha posición (Sasaki, Gohring et al. 1997). El análisis de la estructura cristalina y de la mutagénesis dirigida mostraron que cinco residuos (R149, N156, L242, M245 y E246) son necesarios para la unión al colágeno, y que el clivaje entre los residuos L197-L198 permite un mayor acceso de la hélice triple de colágeno a los residuos involucrados en la unión al colágeno, aumentando de esta manera la afinidad de la interacción (Sasaki, Hohenester et al. 1998) (Figura 7B). El dominio EC de SPARC también posee afinidad por la región de unión a heparina de la vitronectina, pero dicha interacción ha sido observada sólo en ensayos en fase sólida, mientras que la vitronectina en forma soluble no interacciona con SPARC (Rosenblatt, Bassuk et al. 1997).

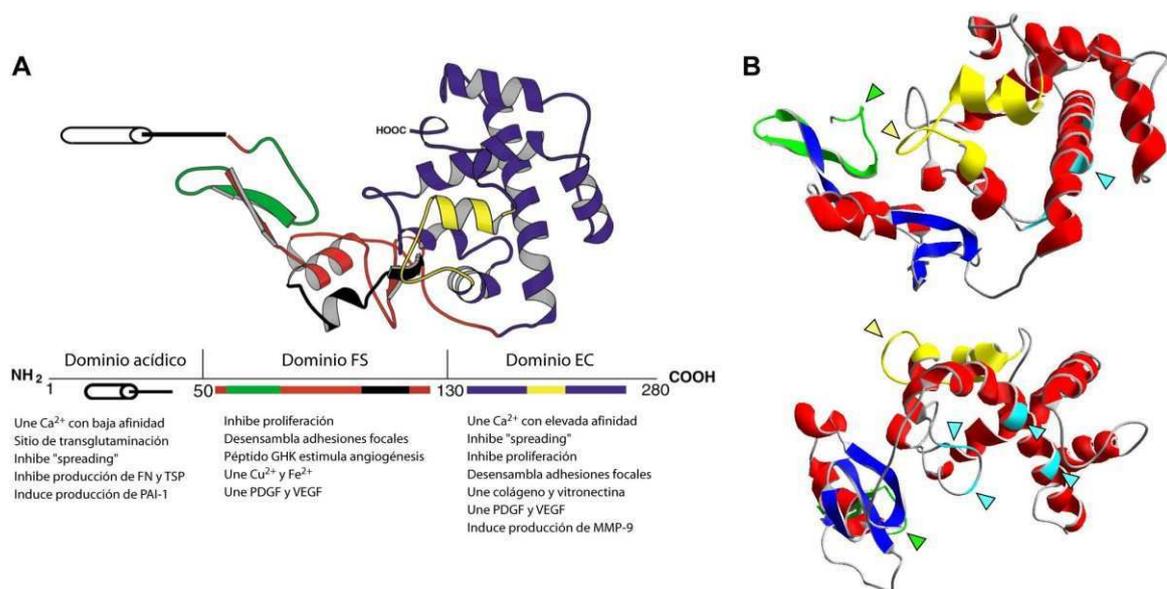


Figura 7 ESTRUCTURA DE SPARC. (A) DIAGRAMA DE CINTAS DERIVADO DE DATOS DE CRISTALOGRAFÍA. REPRESENTACIÓN DE LOS TRES DOMINIOS DE SPARC CON SUS ACTIVIDADES. EL DOMINIO N TERMINAL NO SE ENCUENTRA DENTRO DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRAFÍA. EN VERDE SE ENCUENTRAN LOS AAS. 54-73, EN NEGRO LOS AAS. 114-130, QUE CONTIENEN AL PÉPTIDO GHK, Y EN AMARILLO LOS AAS. 254-273. (B) DIAGRAMA DE CINTAS DONDE SE PUEDE OBSERVAR QUE LAS SECUENCIAS AAS. 54-73 (VERDE) Y AAS. 254-273 (AMARILLO), INVOLUCRADAS EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DESENSAMBLADO DE ADHESIONES FOCAL EN CÉLULAS ENDOTELIALES Y UNIÓN A PDGF Y VEGF, SE ENCUENTRAN DE LA MISMA CARA DE LA MOLÉCULA, Y LOS RESIDUOS INVOLUCRADOS EN LA UNIÓN DE SPARC AL COLÁGENO (FLECHAS CELESTES) SE ENCUENTRAN EN LA CARA OPUESTA. ADAPTADO DE BRADSHAW ET.AL.(BRADSHAW AND SAGE 2001) . COORDENADAS CRISTALOGRAFICAS OBTENIDAS DE BROOKHAVEN PROTEIN DATABASE ([HTTP://WWW.RCSB.ORG/PDB/](http://www.rcsb.org/pdb/)), NÚMERO DE ACCESO 1BMO, E INTERPRETADAS CON EL SOFTWARE SWISS-PDB VIEWER ([HTTP://WWW.EXPASV.ORG/SPDBV/](http://www.expasy.org/spdbv/)).

Las moléculas que interactúan con SPARC

SPARC posee afinidad por cationes bivalentes, factores de crecimiento y componentes de la MEC (**Figura 8**).

SPARC es una proteína que une calcio con elevada afinidad, y tanto la estructura como la función de la proteína son moduladas por el Ca^{2+} . La unión del calcio causa una disminución de helipticidad molar medida por espectroscopia de dicroísmo circular. Dicha unión provoca un cambio conformacional que reduce la susceptibilidad del dominio EC N-terminal frente a proteasas y altera la afinidad por el colágeno (Engel, Taylor et al. 1987; Maurer, Mayer et al. 1992; Pottgiesser, Maurer et al. 1994). SPARC también se une a Cu^{2+} y Fe^{2+} (Vernon and Sage 1989). La secuencia de aminoácidos ubicada entre los residuos 113 y 130 posee elevada afinidad por el Cu^{2+} (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994), y péptidos conteniendo la secuencia KGHK (199-122) son capaces de regular la angiogénesis in Vitro (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994) e in vivo (Iruela Arispe, Lane et al. 1995).

SPARC y su relación con los factores de crecimiento

SPARC modula la actividad de al menos tres factores de crecimiento. SPARC murino es capaz de unirse a dímeros AB y BB de PDGF por interacción con la cadena B del PDGF. Esta interacción interfiere con la unión del PDGF a su receptor en fibroblastos e inhibe la proliferación de células de músculo liso estimulada por PDGF (Raines, Lane et al. 1992). SPARC se une a la cadena B del PDGF mediante su dominio EC con elevada afinidad ($K_d \sim 10^{-9}$ M), la cual no es modificada por la presencia de Ca^{2+} . Göhring *et al* demostraron que la cadena A de PDGF presentada en fase sólida sobre la superficie de un chip de biosensor es capaz de unirse a SPARC con una afinidad de 5×10^{-9} M (Gohring, Sasaki et al. 1998). Más recientemente se ha

mostrado que SPARC es capaz de inhibir la proliferación de células de músculo liso aórtico inducida por PDGF AA, AB y BB (Motamed, Funk et al. 2002). SPARC indujo el arresto del ciclo celular en una etapa tardía de la fase G1, inhibiendo la actividad de Cdk-2, los niveles de p107 y de ciclina A, y el nivel de fosforilación de pRb (Motamed, Funk et al. 2002). El efecto antiproliferativo fue observado tanto con SPARC completa como con dos péptidos pertenecientes al dominio FS (aas 54-72) y al dominio EC (aas 254-273). Resulta interesante que ambos péptidos se encuentran espacialmente próximos en las estructuras obtenidas por difracción de rayos-x (Maurer, Hohenester et al. 1996) (ver Figura 7B).

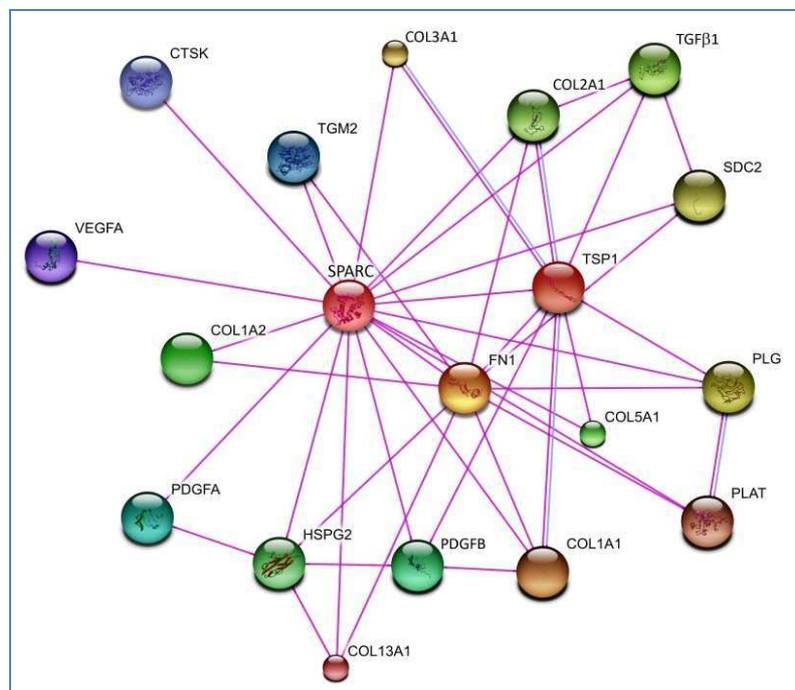


Figura 8 INTERACTOMA DE SPARC. CADA NODO CORRESPONDE A UNA PROTEÍNA INTERACTUANTE. LAS LÍNEAS CORRESPONDEN A LA ASOCIACIÓN PREDICHA. EN AZUL INTERACCIONES OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, EN FUCSIA INTERACCIONES EXPERIMENTALES. RED OBTENIDA MEDIANTE STRING (SEARCH TOOL FOR THE RETRIEVAL OF INTERACTING GENES/PROTEINS(JENSEN, KUHN ET AL. 2009)) UTILIZANDO SPARC HUMANO COMO ENTRADA.

TGF- β 1 es capaz de regular la expresión de SPARC en fibroblastos (Wrana, Kubota et al. 1991). También se ha reportado que SPARC es capaz de inducir la expresión de TGF- β 1 en células mesangiales murinas *in vitro* y en un modelo en rata de glomerulonefritis *in vivo* (Francki, Bradshaw et al. 1999; Bassuk, Pichler et al. 2000). Células mesangiales provenientes de ratones nulos para SPARC mostraron una disminución en el contenido de ARNm y proteína TGF- β 1 respecto a células

obtenidas de ratones normales. Además, el agregado de SPARC indujo la producción de TGF- β 1 por las células provenientes de ratones nulos hasta niveles similares a los observados en células de ratones normales (Francki, Bradshaw et al. 1999). El agregado de SPARC recombinante a un modelo *in vivo* de injuria de células mesangiales en ratas indujo un aumento en el contenido de ARNm y de proteína TGF- β 1 (Bassuk, Pichler et al. 2000). La regulación mutua entre SPARC y TGF- β 1 sugiere la posible existencia de un ciclo de retroalimentación positiva en la expresión de ambas proteínas durante procesos de fibrosis y cicatrización de heridas.

Además existen evidencias de interacción con otros factores como VEGF y FGF, que modulan la actividad angiogénica. Estas interacciones serán descritas en mayor extensión más adelante.

Interacción de SPARC con otros componentes de la MEC

SPARC posee diversos efectos en la biología vascular y podría ser una proteína con un rol central en el re-direccionamiento de la vasculatura existente que genera el tumor en su propio beneficio. Inicialmente, SPARC fue caracterizada como una proteína secretada por células endoteliales *in vitro* (Sage, Johnson et al. 1984), sin embargo ha sido descrito que la mayoría de los tumores la expresan en alta proporción siendo producida por las células tumorales propiamente dichas o por el estroma asociado (Wewer, Albrechtsen et al. 1988; Ledda, Bravo et al. 1997; Duff, Mestre et al. 2007).

La interacción con los colágenos depende en gran medida de la glicosilación, la presencia de Ca^{+2} y la proteólisis por proteasas. SPARC obtenido de hueso, el cual posee glicanos bicatenarios de alta manosa, un colágeno tipo I con una Kd de 15nM (Chlenski, Liu et al. 2004; Kaufmann, Muller et al. 2004) y colágeno tipo V con Kd de 0,19 μ M (Bellahcene and Castronovo 1995). SPARC recombinante u obtenida de plaquetas tiene glicanos bi y tricatenarios y un colágenos tipo I, III, IV y V con Kd superiores a 1 μ M (Maurer, Hohenadl et al. 1995; Sasaki, Gohring et al. 1997). Es de notar que SPARC de origen tumoral posee un patrón híbrido de glicosilación (Kelm

and Mann 1991; Kaufmann, Muller et al. 2004) aunque no se han encontrado diferencias funcionales entre estos patrones.

Otro fenómeno que modifica la interacción con los colágenos es la proteólisis parcial por proteasas extracelulares, particularmente en la Pro₂₃₇-Lis₂₃₈ dentro la primera mano EF, que aumenta la unión de 7 a 20 veces (Sasaki, Gohring et al. 1997). En la unión a los colágenos, SPARC actúa como una chaperona afectando espontáneamente la formación de fibrillas *in vitro*. En una concentración molar en exceso de 10 veces retarda la fibrilogénesis del colágeno I en 40min. Además una molécula mutante de SPARC con deleciones en Val₁₉₆-Phe₂₀₃, la cual limita la proteólisis, inhibe casi completamente la formación de fibrillas en concentraciones equimolares (Giudici, Raynal et al. 2008).

Esta función chaperona fue confirmada en ensayos de actividad chaperona *in vitro* donde SPARC previno la desnaturalización por calor y la agregación de ADH de manera dependiente de la concentración con la casi completa inhibición con exceso de 4 molar ADH (Emerson, Sage et al. 2006). Esta interacción está funcionalmente relacionada ya que no solo la expresión del colágenos se ve afectada sino que también es necesaria la presencia de fibrillas de colágeno $\alpha 1(I)$ para que ocurra la deposición de SPARC en la MEC *in vivo* (Iruela-Arispe, Vernon et al. 1996), demostrando la interacción recíproca entre ambas proteínas.

SPARC también se une a vitronectina, una proteína de la MEC abundante en la lámina basal de los vasos sanguíneos y en la piel y asociada con la progresión tumoral (Schvartz, Seger et al. 1999). La vitronectina colocaliza con SPARC *in vivo*, e interacciona mediante su región de unión a heparina con el dominio EC de SPARC (Rosenblatt, Bassuk et al. 1997). También existen evidencias recientes de que SPARC sería capaz de interactuar con laminina-1 (Brekken, Puolakkainen et al. 2003). SPARC también interacciona en forma específica con trombospondina-1 con una Kd $\sim 0,8$ nM en forma dependiente de la concentración de Ca²⁺, y forma complejos en los gránulos de las plaquetas (Cleardin, Malaval et al. 1988).

SPARC y cáncer

En nuestro laboratorio utilizamos el melanoma como modelo de progresión tumoral y estudio de la función de SPARC en la enfermedad. Como se describió anteriormente se postulan siete hitos en la progresión tumoral. SPARC se ha encontrado relacionado con la mayoría de ellos tanto como un factor pro- como anti-tumoral, dependiendo del modelo en estudio. Además, podemos encontrar la sobre-expresión de SPARC en las células epiteliales tumorales propiamente dichas (epitelio tumoral) o en los fibroblastos y macrófagos infiltrantes o asociados al tumor (estroma) o en ambos compartimientos. En los apartados siguientes describiremos las evidencias sobre el origen de SPARC en el tejido tumoral así como las relaciones con los hitos de la progresión tumoral.

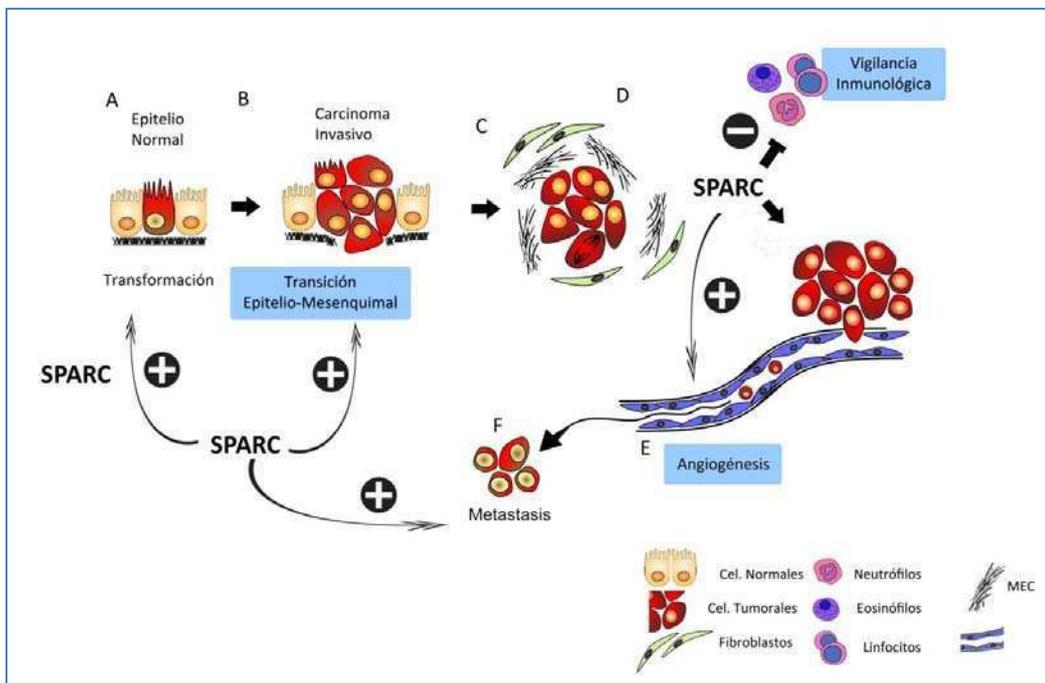


FIGURA 9 EFECTOS DE SPARC EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. SPARC ES CAPAZ DE AFECTAR LA PROGRESIÓN TUMORAL A DIFERENTES NIVELES. DURANTE ETAPAS TEMPRANAS (A) SPARC APARENTEMENTE ESTÁ IMPLICADA EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA. (B) SPARC JUEGA UN ROL EN LA TEM. EN ESTADIOS FINALES SPARC PRODUCIDA POR LAS CÉLULAS TUMORALES O POR EL MICROAMBIENTE (ENDOTELIO, MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS) ESTÁ INVOLUCRADA EN EL ESCAPE TUMORAL INHIBIENDO LA VIGILANCIA INMUNE (D) Y PROMOVIERO LA ANGIOGÉNESIS (E). FINALMENTE, SPARC ESTÁ INVOLUCRADA EN LA METÁSTASIS (F). ADAPTADO DE (PODHAJECR, BENEDETTI ET AL. 2008).

Origen de SPARC: epitelio-estroma

La interacción entre las células epiteliales y el estroma es fundamental para el crecimiento tumoral. En el tumor, SPARC puede ser expresada por las células malignas, por las células infiltrantes (fibroblastos, macrófagos y endotelio) o por ambos tipos celulares. En dos tipos tumorales altamente malignos como el carcinoma de células no pequeñas de pulmón y el adenoma pancreático SPARC está sobre-expresado en los fibroblastos peritumorales mientras que en las células tumorales la expresión está fuertemente inhibida (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2003; Sato, Fukushima et al. 2003; Prenzel, Warnecke-Eberz et al. 2006). Sin embargo, la sobre-expresión de SPARC en los fibroblastos asociados al tumor es un marcador independiente de mal pronóstico y aumento de la mortalidad en ambos tipos celulares (Prenzel, Warnecke-Eberz et al. 2006) sugiriendo una fuerte relación entre SPARC y el aumento de la malignidad. Es interesante que la expresión de SPARC en los fibroblastos es inducida por las células pancreáticas mientras que ellas mismas son incapaces de expresarlo debido a hipermetilación del promotor de SPARC (Hong, Kelly et al. 2008) sugiriendo que SPARC podría tener un rol en la interacción tumor-estroma durante la progresión tumoral.

Esto parece indicar que SPARC juega un rol pro-tumoral, ya sea expresado por el tumor o el estroma. Sin embargo, también existen evidencias experimentales propias del laboratorio que demuestran que la sobre-expresión de SPARC en fibroblastos peritumorales no afecta el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de esferoides heterotípicos con células de melanoma aunque se observa un desbalance en la deposición de MEC, particularmente de colágenos, otra evidencia del rol de SPARC en la regulación de la MEC (Chlenski, Guerrero et al. 2007; Prada, Benedetti et al. 2007).

TEM y SPARC

Uno de los puntos más importantes respecto a este proceso es que la expresión de SPARC en melanoma ha sido asociada con varias características involucradas en TEM; de hecho, SPARC ha disminuido la expresión de E-caderina e incrementado vimentina a través de la fosforilación de FAK y/o la inducción del factor de

transcripción Snail (Robert, Gaggioli et al. 2006; Smit, Gardiner et al. 2007). Estas evidencias sugieren que SPARC podría regular el cambio de expresión E-caderina a N-caderina en células de melanoma con el consecuente aumento de la migración y capacidad invasiva. Recientemente, se ha demostrado en un estudio de perfiles transcripcionales en muestras de melanoma en crecimiento de fase vertical con y sin nodos metastásicos, que SPARC y N-caderina estaban conjuntamente aumentadas en melanoma metastásico, comparado con sus contrapartes no metastáticas (Alonso, Tracey et al. 2007). En otro estudio de perfiles genéticos, se demostró que la sobreexpresión de Snail en líneas celulares de cáncer de mama indujo una disminución de la expresión de E-caderina con un concomitante aumento de la expresión de SPARC y vimentina (Lien, Hsiao et al. 2007).

SPARC anti-tumoral

En ciertos tipos tumorales se ha asociado la expresión de SPARC como un factor de buen pronóstico (Podhajcer, Benedetti et al. 2008). En este sentido, se ha demostrado que SPARC es un factor anti-angiogénico en neuroblastomas (Chlenski, Liu et al. 2002; Chlenski, Liu et al. 2004) y se propuso que podría actuar como un supresor tumoral en ovario (Yiu, Chan et al. 2001; Said, Socha et al. 2007). Adicionalmente -utilizando ensayos de crecimiento tumoral en ratones atímicos nude- se demostró que la sobre-expresión de SPARC en células de cáncer de ovario inhibió la tumorigenicidad de las células ováricas in vivo (Mok, Chan et al. 1996) posiblemente debido a un mecanismo de atenuación de la inflamación, disminución del reclutamiento de macrófagos y normalización del estroma tumoral (Said, Socha et al. 2007; Said, Elmarakby et al. 2008).

El cáncer de colon representa otro caso paradigmático del rol de SPARC como proteína anti-tumorigénica aunque se presentaron datos discrepantes entre sí. Análisis genómico de líneas celulares de cáncer colorrectal resistentes a agentes quimioterapéuticos mostraron que los niveles de SPARC se encuentran fuertemente disminuidos (Tai, Dai et al. 2005). Por otro lado, se vinculó a la expresión de SPARC con una menor resistencia a la apoptosis, mediante una posible interacción directa de SPARC con pro-caspasa 8 (Gooden, Vernon et al. 1999; Taghizadeh, Tang et al.

2007). Contrastando estas evidencias, también se demostró el aumento de la expresión de SPARC en muestras de cáncer de colon humano comparado con tejido normal (Porter, Sage et al. 1995) identificando esta expresión dentro de un grupo de 65 genes diferenciales entre cáncer invasivo colorrectal y células normales (Wiese, Auer et al. 2007).

SPARC, rol pro-tumoral

Diversos autores demostraron que SPARC posee un rol pro-tumoral en el desarrollo de la enfermedad (Ledda, Bravo et al. 1997; Massi, Franchi et al. 1999; Sturm, Satyamoorthy et al. 2002; Rumpler, Becker et al. 2003; Alonso, Ortiz et al. 2004; Alvarez, Prada et al. 2005; Ikuta, Nakatsura et al. 2005; Kuphal, Palm et al. 2005; Moreno-Bueno, Cubillo et al. 2006; Robert, Gaggioli et al. 2006; Alonso, Tracey et al. 2007; Prada, Benedetti et al. 2007; Smit, Gardiner et al. 2007; Sosa, Girotti et al. 2007; Haber, Gottifredi et al. 2008). Trabajos iniciales del laboratorio demostraron que la disminución de la expresión de SPARC mediante ARN antisentido en líneas celulares de melanoma humano produce una total detención del crecimiento tumoral en ratones nude (Ledda, Adris et al. 1997). Dicho rechazo es debido a la acción de células polimorfonucleares (PMN) reclutados en el sitio de inoculación. Trabajos posteriores de nuestro grupo demostraron que el mecanismo de reclutamiento y activación de PMN involucraba la expresión aumentada de IL-8, GRO y leucotrienos por parte de las células tumorales con expresión disminuida de SPARC (Alvarez, Prada et al. 2005).

SPARC e Inflamación

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que SPARC, así como otras proteínas de la familia matricelular, está involucrada en la regulación de diferentes aspectos de la respuesta inflamatoria en cáncer. Como mencionamos anteriormente, trabajos de nuestro laboratorio han mostrado que la disminución de la expresión de SPARC en células de melanoma humano mediante la expresión de ARN antisentido o shARN anulan la capacidad de crecimiento tumoral en ratones nude (Ledda, Adris et al. 1997; Sosa, Girotti et al. 2007). Este efecto está acompañado con la disminución de MMP2 y MMP9 en correlación con la capacidad

invasiva así como una reducción en el reclutamiento de células inflamatorias hacia la masa celular. Además, se demostró que PMN humanos ejercieron un efecto lítico *in vitro* sobre células de melanoma en las que la expresión de SPARC fue inhibida, y este efecto lítico fue a su vez inhibido en presencia de SPARC (Alvarez, Prada et al. 2005; Prada, Benedetti et al. 2007). Por otro lado en ratones nulos para la expresión de SPARC (SP -/-) luego de la administración intratraqueal de bleomicina –un iniciador de injurias pre-cancerosas en pulmón- se observó un mayor reclutamientos de PMN en los pulmones comparado con los ratones salvajes (Savani, Zhou et al. 2000).

Es importante señalar que la evidencia de que SPARC modula la respuesta inmune antitumoral no se limita a melanoma. También se demostró en células tumorales mamarias inyectadas en ratones SP -/- donde ocurre una disminución del crecimiento tumoral. Esta inhibición fue acompañada por un masivo infiltrado de células inflamatorias, principalmente PMN y macrófagos (Sangaletti, Stoppacciaro et al. 2003). Aunque la evidencia obtenida a partir de ratones nulos para SPARC SP-/- debe ser tomada con precaución debido a que estos ratones presentan un desarrollo alterado de su sistema inmune (Rempel, Hawley et al. 2007), los resultados indicarían que SPARC podría tener un rol clave en la regulación de la respuesta inflamatoria y por lo tanto en evitar el ataque anti-tumoral mediado por células inflamatorias, especialmente PMN. Una posibilidad es que SPARC podría regular la vía de apoptosis en células PMN, evento necesario que ocurra para el reclutamiento de nuevas olas de células inflamatorias, un proceso que involucra la acción de FasL (Alvarez, Prada et al. 2005). Al respecto se mostró que en presencia de SPARC secretada tanto por las células tumorales como por el estroma tumoral, las células PMN no entran en apoptosis, siendo incapaces de atraer células inflamatorias adicionales al foco tumoral.

SPARC y angiogénesis

Las proteínas matricelulares tienen un rol sumamente importante en el intercambio de información entre la célula tumoral, las células de estroma y la MEC que las rodea ya que estas interactúan con los receptores celulares, las moléculas

estructurales de la matriz y los factores extracelulares solubles como factores de crecimiento y proteasas. Es interesante notar que al ser cultivadas *in vitro*, las células endoteliales expresan niveles elevados de SPARC que pueden ser aun más elevados al formar estructuras diferenciadas como la formación de túbulos (Iruela-Arispe, Hasselaar et al. 1991). Esta proteína es capaz de influenciar la forma celular, la síntesis proteica y la proliferación (Sage, Johnson et al. 1984; Sage and Bornstein 1991).

Como se mencionó anteriormente (Figura 7) SPARC es capaz de unir cationes divalentes como el Cu^{+2} y el Zn^{+2} y al igual que varias proteínas moduladoras de la angiogénesis *in vivo* (Parke, Bhattacharjee et al. 1988; Black, Berthod et al. 1998) posee una expresión coincidente con la reorganización endotelial *in vivo*. Estas son las primeras evidencia que nos llevan a pensar que SPARC está involucrado en el crecimiento endotelial.

SPARC antiangiogénico:

En estudios iniciales sobre la actividad de SPARC se demostró que esta proteína inhibe la progresión del ciclo celular en el inicio de la fase S tanto en células arrestadas así como en células en crecimiento exponencial, proponiéndose un mecanismo de inhibición de la unión de PDGF a su receptor (Sage, Bassuk et al. 1995) y la atenuación de la vía VEGF (Yunker, Schultz et al. 2006). En otra serie de experimentos con líneas celulares derivadas de neuroblastoma se demostró que el aumento de la expresión de SPARC tiene un efecto anti-tumoral mediado por la inhibición de la angiogénesis (Chlenski, Liu et al. 2004). Además ha sido demostrado que SPARC es inhibitorio de la proliferación de las células endoteliales mediante péptidos anti-proliferativos de la región de unión a Ca^{+2} (aas 254-273)(Sage, Bassuk et al. 1995); también es capaz de estimular la respuesta angiogénica tanto como proteína completa y como fuente de péptidos pro-angiogénicos (2 región catiónica) (K)GHK(Lane, Iruela-Arispe et al. 1994).

SPARC pro-angiogénico:

Las evidencias sobre el rol anti-angiogénico de SPARC fueron contrastadas en modelos de melanoma donde la sobre-expresión de SPARC produce un incremento de la densidad vascular (Prada, Benedetti et al. 2007) así como en modelos no tumorales como cicatrización de heridas (Reed, Puolakkainen et al. 1993), válvulas aórticas ateroscleróticas (Charest, Pepin et al. 2006) y ensayos de membrana corioalantoidea (Iruela Arispe, Lane et al. 1995) donde existe una correlación temporo-espacial entre la expresión de SPARC y la formación de nuevos vasos. Más aun, se ha demostrado que el agregado de SPARC a células endoteliales en cultivo *in vitro* induce la formación de estructuras tubulares indicando un rol en la diferenciación angiogénica (Charest, Pepin et al. 2006) (Iruela Arispe, Lane et al. 1995).

Estas evidencias contrastantes podrían ser explicadas por las propiedades de los distintos péptidos derivados de SPARC ya que se han demostrado actividades inductoras o inhibitoras de la angiogénesis tanto *in vivo* como *in Vitro* (Lane, Iruela-Arispe et al. 1994) de distintos fragmentos de SPARC generados por proteólisis vía metalo-proteasas (MMP3) o plasmina en diferentes tejidos según la condición fisiológica (Iruela Arispe, Lane et al. 1995; Sage, Reed et al. 2003).

Por otro lado, SPARC y péptidos derivados del dominio EC (aas 254-273) y FS (aas 54-72) también se unen a VEGF, interfiriendo con la unión del VEGF a su receptor VEGF-R1 en células endoteliales, e inhibiendo la proliferación de dichas células (Kupprion, Motamed et al. 1998). SPARC es capaz de inhibir la fosforilación de VEGF-R1 inducida por VEGF, pero no es capaz de inhibir la activación de VEGF-R2. SPARC y péptidos derivados del dominio EC (aas. 254-273) inhibieron la actividad de FGF-2 sobre células endoteliales aórticas bovinas (Hasselaar and Sage 1992; Sage, Bassuk et al. 1995). Tanto SPARC como péptidos derivados del dominio EC inhiben la fosforilación de FGF-R1 y MAPK inducida por FGF-2 en células endoteliales humanas y en mioblastos a través de un mecanismo mediado parcialmente por PKA (Brekken and Sage 2000; Motamed, Blake et al. 2003).

Toda la evidencia acumulada indica que SPARC posee efectos intrínsecos sobre el endotelio los cuales podrían estar regulados por el contexto. Es decir, teniendo en

cuenta el tipo tumoral y la etapa en que se encuentre la enfermedad, SPARC producirá efectos pro- o anti-angiogénicos que dependerán de la distribución y cantidad relativa de las demás moléculas presentes. Además debemos tener en cuenta que el proceso que se ha descrito es justamente dinámico presentando patrones temporo-espaciales los cuales debemos tener presentes en todo momento del análisis.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en la caracterización de la función de la proteína SPARC en la biología endotelial. Los objetivos específicos que permitirán llevar a cabo este trabajo de tesis han sido divididos en los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específico 1

Purificar SPARC producida por células de melanoma y comparar la actividad biológica de la proteína purificada con otras descritas en literatura.

Objetivos específico 2

Analizar el efecto de SPARC de melanoma en la migración y diferenciación endotelial.

Objetivos específico 3

Examinar el comportamiento endotelial frente a la expresión de SPARC en células tumorales.

Resultados

Resultados

Capítulo 1: Caracterización de SPARC *in vitro*.

Caracterización de SPARC secretada por células derivadas de melanoma humano

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue el de estudiar y definir el rol de SPARC sobre las células del parénquima y estroma tumoral. Para ello definimos como una de las principales metas la purificación de la proteína producida por células de melanoma humano y su caracterización en comparación con la proteína obtenida de diferentes fuentes, como endodermo parietal, recombinante producida en *E.coli* y en células Sf9 infectadas con sistema baculoviral(Engel, Taylor et al. 1987; Bassuk, Baneyx et al. 1996; Bradshaw, Bassuk et al. 2000) así como una serie de proteínas con diversas modificaciones en un sistema de células SL3. Como la proteína es secretada utilizamos medios condicionados de células derivadas de melanomas humanos. En primer lugar se estudiaron diferentes líneas de melanoma humano en busca de aquellas que poseyeran un mayor nivel de expresión. Dentro de las líneas evaluadas (IIB-Mel-LES; IIB-Mel-J; Mel-888; A375N y SB2) se determinó que las células A375N constituían una muy buena fuente de SPARC secretada al medio extracelular (Figura 1) a partir de las cuales se purificó la proteína SPARC nativa (hMEL-SPARC).

Para la purificación se modificaron protocolos de la literatura existente para obtener un máximo rendimiento con alto grado de pureza, poniendo énfasis en la eliminación del principal contaminante, la seroalbúmina bovina (BSA), proveniente del suero con el que se suplementa el medio de cultivo. La purificación fue desarrollada y puesta a punto principalmente por la Dra. Andrea Llera y Cynthia López Haber respectivamente y consta de tres pasos definidos (Figura 1):

Concentración del medio condicionado por ultrafiltración y diálisis del concentrado (Figura 1A).

Purificación por punto isoelectrico (Mono Q) (Figura 1B-C).

Un segundo paso de purificación por tamiz molecular (Superdex-200) (Figura 1D-E).

Luego de obtenida la proteína purificada se la concentró hasta 1mg/mL mediante ultrafiltración con membranas de 30kDa de corte y se dializó contra PBS. Este PBS fue utilizado como control de todos los estudios realizados en esta tesis.

Mediante estos pasos de purificación obtuvimos lotes de pureza superior al 95% , medida mediante SDS-PAGE con tinción de SYPRO Ruby (Figura 1E). Además, en todos los lotes preparados se logró un rendimiento promedio de un miligramo de SPARC por litro de medio condicionado.

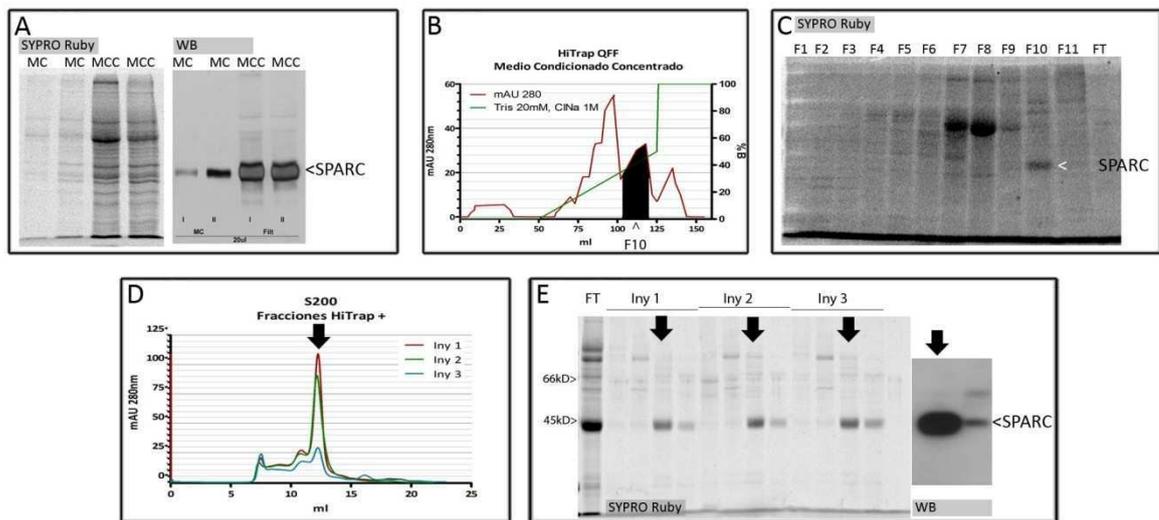


Figura 1 PURIFICACIÓN DE SPARC NATIVA DE MELANOMA HUMANO. (A) SDS PAGE (SYPRO RUBY) Y WESTERN BLOT (WB) DE MEDIO CONDICIONADO CONCENTRADO POR ULTRAFILTRACIÓN. (B) PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL PRIMER PASO DE PURIFICACIÓN (COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO; HI TRAP QFF) DE LA PROTEÍNA SPARC A PARTIR DE MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA A375N. (C) SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES DEL INTERCAMBIO IÓNICO INDICADOS. (D) PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL TAMIZ MOLECULAR (SUPERDEX-200) UTILIZANDO TRES INYECCIONES DE LA F10 COMO SIEMBRA. (E) FRACCIONES COLECTADAS DE LA SUPERDEX-200, CORRIDAS EN UN SDS-PAGE. WESTERN BLOT COMO CONTROL DE IDENTIDAD PROTEICA. PARA LOS SDS-PAGE SE SEMBRARON 10 ML DE CADA FRACCIÓN. MC: MEDIO CONDICIONADO, MCC MEDIO CONDICIONADO CONCENTRADO, FT: FLUJO A TRAVÉS DE LA COLUMNA; F#: NÚMERO DE FRACCIÓN SEMBRADA, FLECHA OSCURA: FRACCIÓN COLECTADA (>95% hMEL SPARC

Por otro lado podemos destacar que en algunos lotes de purificación se observaron dos señales específicas para SPARC con una pequeña diferencia de movilidad electroforética. Este dato, anteriormente reportado por nuestro laboratorio (Ledda, Bravo et al. 1997), fue confirmado al observar alrededor de 9 isoformas secretadas en ensayos de geles bidimensionales, con variaciones de punto Isoeléctrico y de

peso molecular relativo (Sosa, Girotti et al. 2007). La masa total de proteína sembrada y las condiciones en las que se realiza el condicionamiento son factores importantes para la detección de dichas bandas en ensayos de inmunodetección. Se desconoce hasta el presente cuál es la relevancia biológica de dichas isoformas.

SPARC modula la proliferación endotelial independientemente de la fuente de obtención de la proteína.

Las interacciones con la MEC tienen una profunda influencia en la progresión tumoral. SPARC, como componente de la MEC, es capaz de disminuir la proliferación de diferentes tipos celulares y de aumentar la agresividad de células tumorales. Trabajos previos asociaron la expresión de SPARC con el aumento (Thomas, True et al. 2000; Parker, Argani et al. 2004) de la angiogénesis así como con la inhibición de la proliferación de las células endoteliales, esto último se ha mostrado principalmente en tumores derivados del sistema nervioso central (Chlenski, Liu et al. 2002; Bhoopathi, Chetty et al. 2007). En la mayoría de estos trabajos se discutía la posibilidad de que las diferencias encontradas podrían deberse a que cada una que la proteína utilizada era obtenida de diferentes orígenes, recombinante en bacteria, de hueso, de plaquetas, de mosca y los efectos encontrados podían estar asociados a modificaciones post-traduccionales específicos del tipo celular o sistema de producción y purificación.

Con el objetivo de validar la proteína purificada de melanoma y compararla con otras especies previamente descritas, así como una nueva producida en el laboratorio por la Dra. Llera en un sistema de *Drosophila* SL3 (Figura 2) se estudiaron los efectos SPARC sobre el redondeo, estiramiento, migración y entrada en el ciclo celular de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) de cinco proteínas obtenidas de diferentes fuentes:

Nombre	Descripción
hMel SPARC	SPARC derivada de células de melanoma humano (A375N) purificada de medio de cultivo condicionado.

rh-MEL- SPARC-6xH	Proteína recombinante con etiqueta de seis histidinas N-terminales y sitios de cortes por trombina producida y purificada en el sistema SL3.
rh-MEL- SPARC	Proteína producida y purificada en el sistema SL3 sin etiqueta de histidina por clivaje con trombina.
rh-SPARC(293)	Proteína producida en HEK293 cedidas gentilmente por Dr. Chlenski (Departamento de Pediatría, Universidad de Chicago, EEUU)(Chlenski, Liu et al. 2006).
rh-SPARC(SF9)	Proteína producida en células de Sf9 con el sistema de expresión con baculovirus. Sistema cedido por la Dra. Sage (Hope Heart Program, Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle, Washington, EEUU)(Bradshaw, Bassuk et al. 2000).

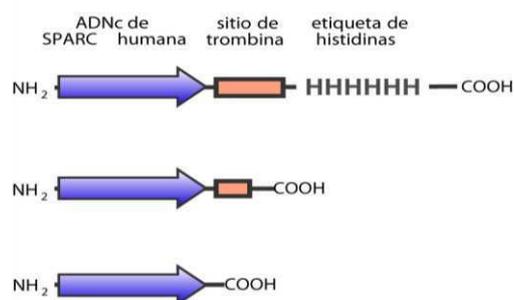


Figura 2 Esquema de las especies utilizadas para la caracterización. Arriba) rh-Mel-SPARC-6xH. Centro) rh-Mel-SPARC sin etiqueta de histidina clivada con trombina. Abajo) esquema de la proteína nativa (hMel-SPARC, SF9, 293).

Una de las características distintivas de SPARC es su capacidad de producir el redondeo de células endoteliales pegadas al plástico. Para comparar los efectos de las diferentes preparaciones se sembraron células BAE en presencia de 10ug/mL de cada proteína y se determinó el porcentaje de células redondeadas a distintos tiempos (Figura 3).

A las 4 hs. post-siembra se observa que todas las proteínas utilizadas son capaces de desprender a las células endoteliales induciendo su redondeo, siendo la proteína con la etiqueta de histidina la de menor efectividad. A las 8 hs. se produce el máximo de efecto para la mayoría de las proteínas que pueden ser separadas en tres grupos bien definidos. La de mayor efectividad, con casi un 80% de células redondeadas, es

la producida en el sistema de Drosophila sin la etiqueta de histidina. El segundo grupo está compuesto por las producidas en células SF9 y la nativa de melanoma con más del 60% de inducción de redondeo mientras que en el tercer grupo, con alrededor del 40%, encontramos a las producidas en HEK293 y la etiquetada con histidina. A las 24 hs. se mantienen estos grupos, aunque disminuyen las diferencias así como el efecto en general.

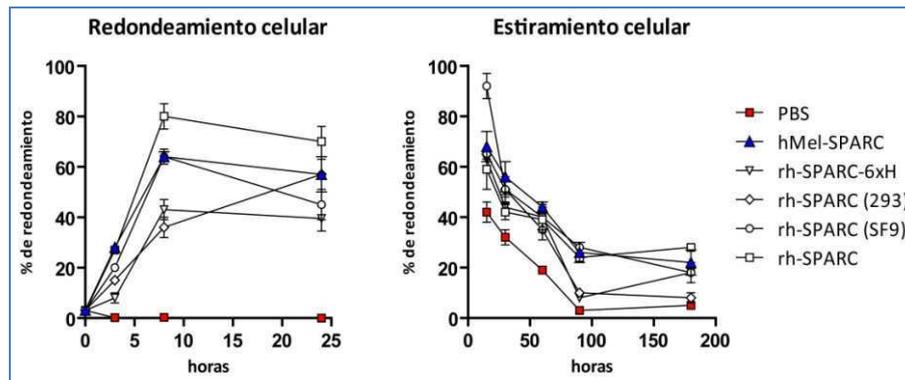


Figura 3 TODAS LAS ESPECIES DE SPARC AFECTAN EL REDONDEAMIENTO Y EL ESTIRAMIENTO CELULAR. LAS CÉLULAS BAE FUERON INCUBADAS CON 20UG/ML DE SPARC DURANTE EL TIEMPO INDICADO. SE TIÑERON LAS CÉLULAS CON FALOIDINA Y SE CONTARON LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS REDONDEADAS O ESTIRADAS CON RESPECTO AL TOTAL. LOS ENSAYOS FUERON HECHOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE INDICA EL PROMEDIO \pm DE.

Es notorio el efecto diferencial en el redondeamiento que se produce con la remoción de la etiqueta de histidina si comparamos los efectos de rh-SPARC 6xH y rh-SPARC, efecto que podría deberse a la alteración del plegamiento normal de SPARC con la posterior interferencia con sus ligandos, receptores o interactuantes.

Completando el análisis sobre el comportamiento de adhesión se cuantificó el porcentaje de células estiradas a diferentes tiempos en presencia de 10ug/mL de cada especie en estudio donde observamos que todas las proteínas poseen la capacidad de inhibir o demorar el estiramiento de las células endoteliales (Figura 3). A pesar de las pequeñas diferencias, todas las especies fueron capaces de inducir el redondeo e inhibir el estiramiento de células endoteliales, característica distintiva de las proteínas matricelulares y particularmente de SPARC.

Dado que uno de los eventos claves de la angiogénesis es la migración, nos cuestionamos si las diferentes especies de SPARC tenían efectos similares sobre la

movilidad de las células endoteliales hacia bFGF. Para ello evaluamos los efectos de todas las proteínas en estudios de migración de células BAE hacia bFGF a 0,4 ng/mL. Estos ensayos mostraron que todas las especies producen una inhibición de la migración de más del 40% en comparación con el control (Figura 4).

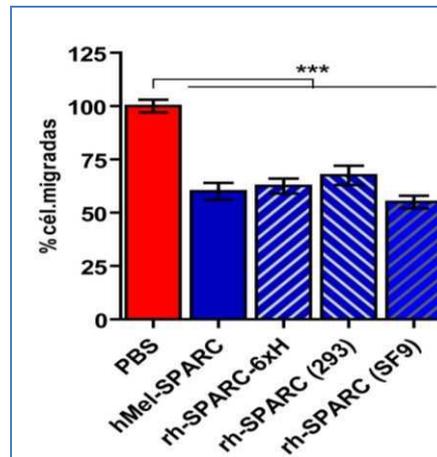


Figura 4 TODAS LAS ESPECIES DE SPARC TIENEN EFECTOS SIMILARES SOBRE LA MIGRACIÓN. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE BFGF EN PRESENCIA DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE SPARC CON RESPECTO AL CONTROL (PBS). LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPLICADO \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE UN FACTOR CON TEST DE BONFERRONI (***) ($p < 0.001$).

Del mismo modo, se caracterizó el efecto de todas las proteínas sobre la proliferación de células endoteliales. Para ello, se probaron distintas concentraciones de cada una de las especies sobre la proliferación inducida por SBF en células BAE arrestadas. Para ello, se arrestaron cultivos de células BAE en confluencia mediante privación de suero durante 72hs; posteriormente se estimuló la entrada al ciclo celular con medio de cultivo suplementado con 2,5% SBF en presencia de 10 μ g/mL de cada especie de SPARC.

Todas las especies fueron capaces de inhibir la proliferación, medida como incorporación de timidina tritiada. La proteína nativa mostró ser la de mayor eficiencia en la inhibición, logrando el máximo de inhibición en todas las concentraciones probadas, observándose inclusive cerca de un 80% de inhibición con concentraciones de 5 μ g/mL. El resto de las especies exhibió un efecto menor, desatancándose la proteína con etiqueta de histidina la cual solo produjo una

inhibición del 22/ (Figura 5A). Esta menor efectividad se encuentra en concordancia con el menor efecto en el redondeamiento observado previamente para la misma especie proteica. Más aún, demostramos que estos efectos son específicos de SPARC ya que pre-incubando la proteína nativa con un anticuerpo neutralizante (N-Ab)(Sweetwyne, Brekken et al. 2004) se revierte significativamente el efecto inhibitorio con respecto a su control de isotipo (C-Ab) (Figura 5B). Este método nos permitió no solo comparar las diferentes especies, sino que también fue utilizado como control de calidad de las preparaciones sucesivas de SPARC utilizada durante esta tesis.

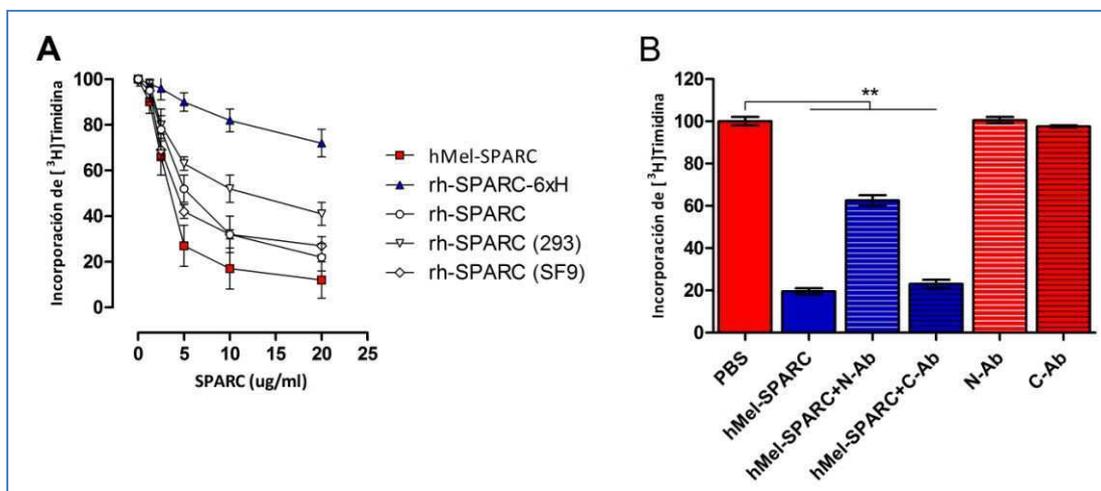


Figura 5 TODAS LAS ESPECIES DE SPARC TIENEN EFECTOS SIMILARES SOBRE LA PROLIFERACIÓN. A) ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SPARC. LAS CÉLULAS FUERON ARRESTADAS EN CONFLUENCIA MANTENIDAS ENTRE 36 Y 72HS EN MEDIO SIN SUERO. POSTERIORMENTE SE LAS REPLAQUEÓ A BAJA CONFLUENCIA EN MEDIO CON 2,5/ DE SBF COMO ESTIMULANTE EN PRESENCIA DE TIMIDINA TRITIADA Y SPARC EN LAS CONCENTRACIONES INDICADAS O PBS EN EL VOLUMEN EQUIVALENTE. A LAS 24HS CULTIVOS EN DUPLICADO FUERON LAVADOS EN PBS FRÍO, FIJADOS EN ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 10/ , Y SOLUBILIZADOS EN NaOH 0.4M, DETERMINANDO LAS CUENTAS POR SEGUNDO (CPM) EN CADA TRATAMIENTO EN CONTADOR DE CENTELLEO Y SE GRAFICÓ EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL PBS (CONTROL). B) ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA Y NEUTRALIZACIÓN DE SPARC MEDIANTE ANTICUERPOS. LAS CÉLULAS HAMBREADAS FUERON TRATADAS COMO EN A, EN PRESENCIA DE 20ug/mL hMel-SPARC Y/O INCUBADO CON 20ug DE ANTICUERPO NEUTRALIZANTES (N-Ab) O CONTROL DE ISOTIPO (C-Ab). LOS ASTERISCO INDICAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA MEDIDA POR ANOVA, CON POST-TEST DE BONFERRONI (**p<0.001).

Otro efecto notorio es que los anticuerpos bloqueantes no poseen efecto sobre la proliferación, indicando que de SPARC endógeno luego de la siembra no contribuye significativamente a la modulación de la proliferación en nuestros estudios.

Estos ensayos demuestran que independientemente de la fuente de obtención de la proteína, todas las especies tienen los mismos efectos sobre el redondeo, la migración o la proliferación de células endoteliales.

SPARC inhibe la proliferación de células endoteliales tanto normales como transformadas

Para los siguientes estudios seleccionamos a la proteína nativa hMel-SPARC como proteína representativa ya demostramos que es efectiva en todos los ensayos realizados y además está purificada de líneas tumorales. A partir de aquí la referiremos como SPARC genéricamente.

Los resultados anteriores nos llevaron a preguntarnos si diferentes líneas celulares endoteliales tienen la misma respuesta ante el agregado de SPARC. Para ello se probó el efecto de SPARC en una línea normales derivadas de endotelio umbilical humano (HUVEC), de microvasculatura dérmica humana (HMEC1) y murina (MEC-1) ambas transformadas con el antígeno T grande del virus SV40. Todas estas líneas poseen diferentes niveles de expresión de SPARC (Figura 6).

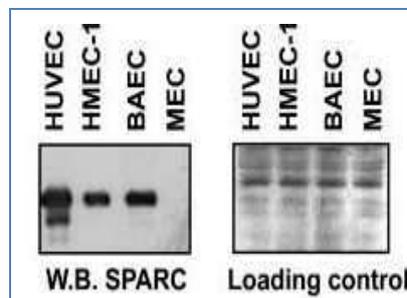


Figura 6 EXPRESIÓN DE SPARC EN LÍNEAS ENDOTELIALES. SE CRECIERON A CONFLUENCIA LAS CÉLULAS INDICADAS, Y SE CONDICIONÓ EL MEDIO SIN SBF POR 24HS. SE REALIZÓ UNA INMUNODETECCIÓN (W-B) ESPECÍFICA CON ANTICUERPOS ANTI-SPARC. SE MUESTRA UN GEL CON TINCIÓN DE PLATA COMO CONTROL DE CARGA.

En la línea HUVEC se produjo un mínimo de inhibición a partir de las 12hs manteniéndose hasta las 20hs post-plaqueado, normalizándose con respecto al Control en tiempos posteriores a 32hs (Figura 7A). En las células BAE el agregado de SPARC produjo una inhibición con un máximo a las 24hs. Efecto que disminuye progresivamente en tiempos más avanzados, aunque no se llegó a detectar normalización en los tiempos más largos analizados (Figura 7B).

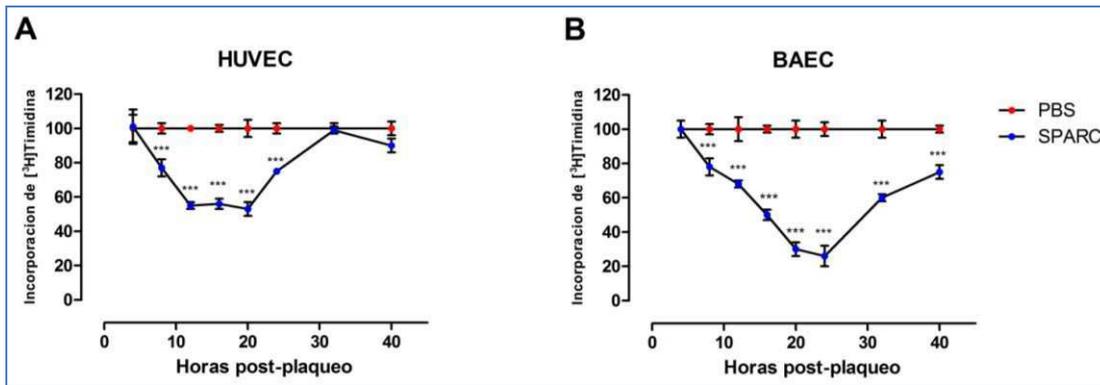


Figura 7 SPARC INHIBE LA PROLIFERACIÓN TEMPRANA EN CÉLULAS PRIMARIAS ENDOTELIALES. LAS CÉLULAS HUVEC Y BAE FUERON HAMBREADAS Y RE-SEMBRADAS EN MEDIO CON 2,5/ DE SFB EN PRESENCIA DE 20UG/ML DE SPARC O PBS CONTROL. SE CUANTIFICÓ EL PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA COMO EN **Figura 5A**. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (***) $p < 0.001$).

Por otro lado en las líneas transformadas, SPARC produce el mismo efecto inhibitorio antes con un máximo de a las 20hs (Figura 8A y B), aunque con una intensidad levemente menor particularmente en la línea derivada de endotelio de ratón MEC1 (Figura 8B).

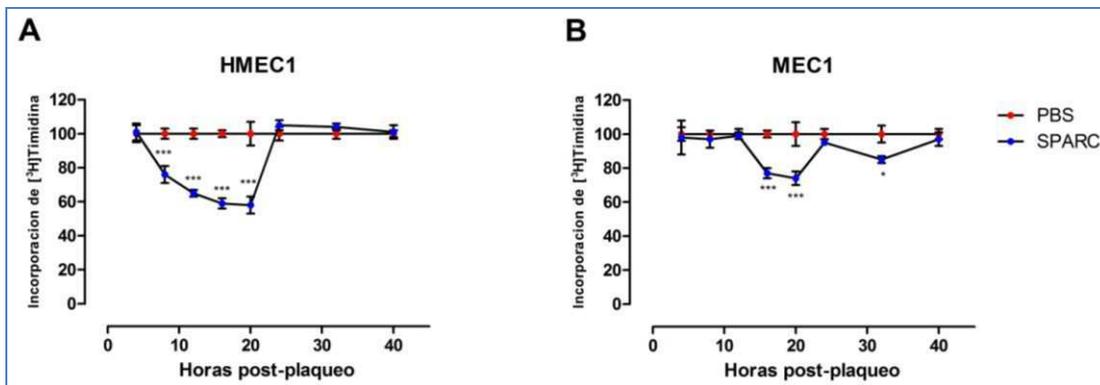


Figura 8 SPARC INHIBE LA PROLIFERACIÓN TEMPRANA EN CÉLULAS ENDOTELIALES TRANSFORMADAS. CÉLULAS HMEC-1 Y MEC-1 FUERON TRATADAS CON IGUAL MANERA QUE LA **Figura 5**. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (***) $p < 0.001$).

En conclusión observamos que el agregado de SPARC produce un efecto inhibitorio de la proliferación en las primeras 20-24hs. post-estímulo independientemente de la producción endógena de la proteína o del grado de transformación de las células endoteliales.

SPARC induce una modulación bifásica de la proliferación de fibroblastos.

Otro componente importante del entorno tumoral son los fibroblastos. Dado que este tipo celular también se encuentra afectado por la presencia de SPARC en diversos modelos tumorales (Perrin, Ringard et al. 1992; Bhowmick, Neilson et al. 2004; Kalluri and Zeisberg 2006) se evaluó el efecto de hMel-SPARC en dos líneas de fibroblastos fetales humanos de diferente origen, como HFL1 y Wi38, con y sin expresión endógena de SPARC respectivamente y se analizó el efecto sobre la proliferación. Los fibroblastos fueron crecidos hasta confluencia y hambreados durante 48hs. En ambos tipos celulares SPARC promovió un aumento en la incorporación de timidina tritiada durante las primeras 20hs. disminuyendo progresivamente no produciendo efectos a las 30hs. e inhibiendo en tiempos posteriores (Figura 9).

La máxima diferencia entre producida por el tratamiento con SPARC en ambos tipos celulares ocurrió en el tiempo más temprano probado (8hs.), indicando que SPARC puede acelerar los eventos iniciales de la replicación del ADN, disparados por el estímulo del SBF en el medio, independientemente de la expresión endógena.

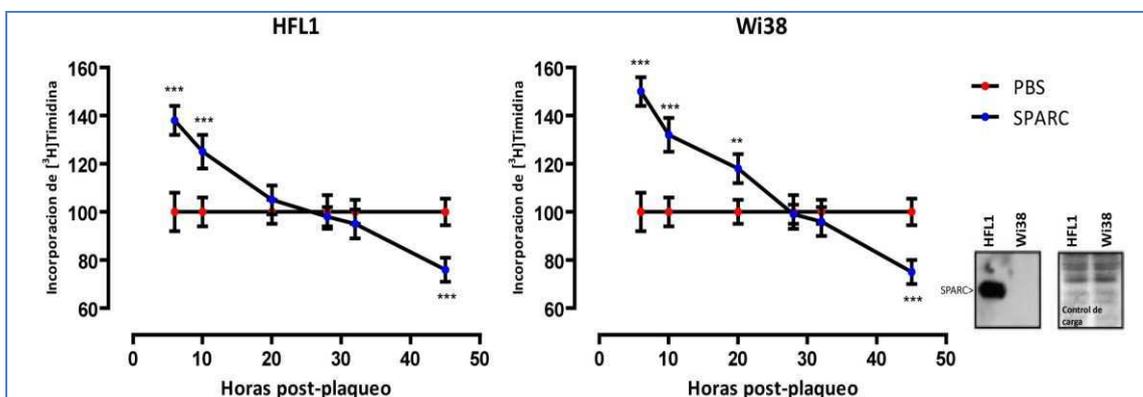


Figura 9 SPARC TIENE UN EFECTO BIFÁSICO EN LA PROLIFERACIÓN EN FIBROBLASTOS. HFL-1 Y WI-38 FUERON TRATADAS DE IGUAL MANERA QUE EN LA **Figura 5**. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). INSERTO: NIVELES DE EXPRESIÓN DE SPARC, EL CONDICIONAMIENTO Y EL W.B. FUE REALIZADO EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE EN LA **Figura 6**.

SPARC no afecta la proliferación de células malignas.

Dado que la presencia de SPARC es un evento característico del proceso tumoral finalmente se evaluó su efecto sobre células tumorales malignas. Inicialmente se

analizó la expresión de SPARC en un panel de líneas tumorales derivadas de melanoma (A375N, IIB-Mel-Les, SB2, MEL 888, IIB-Mel-J), colon (HCT116, LOVO) y neuroblastoma (U87) como representantes de de células malignas con y sin expresión endógena además de diferente origen ontológico (Figura 10).

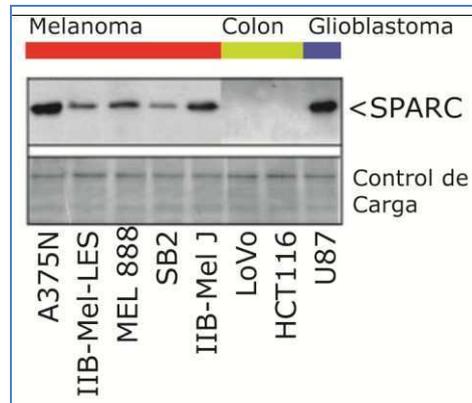


Figura 10 EXPRESIÓN DE SPARC EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS DERIVADAS DE TUMOR. LOS NIVELES DE SPAREC SECRETADO FUERON OBTENIDOS A PARTIR DE MEDIO CONDICIONADO POR LAS LÍNEAS TUMORALES INDICADAS EL ANÁLISIS POR W.B. FUE REALIZADO EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE EN LA Figura 6.

Todas las líneas fueron crecidas a confluencia y arrestadas mediante privación de suero enriqueciendo los cultivos en células en G1. Se probó la capacidad de incorporar timidina tritiada, como indicador de la proliferación en presencia de SPARC (Figura 11).

Sorprendentemente, y a diferencia de lo observado con células endoteliales y fibroblastos, no se encontraron diferencias significativas en ningún tiempo entre el tratamiento con SPARC y el control en ninguna de las seis líneas tumorales.

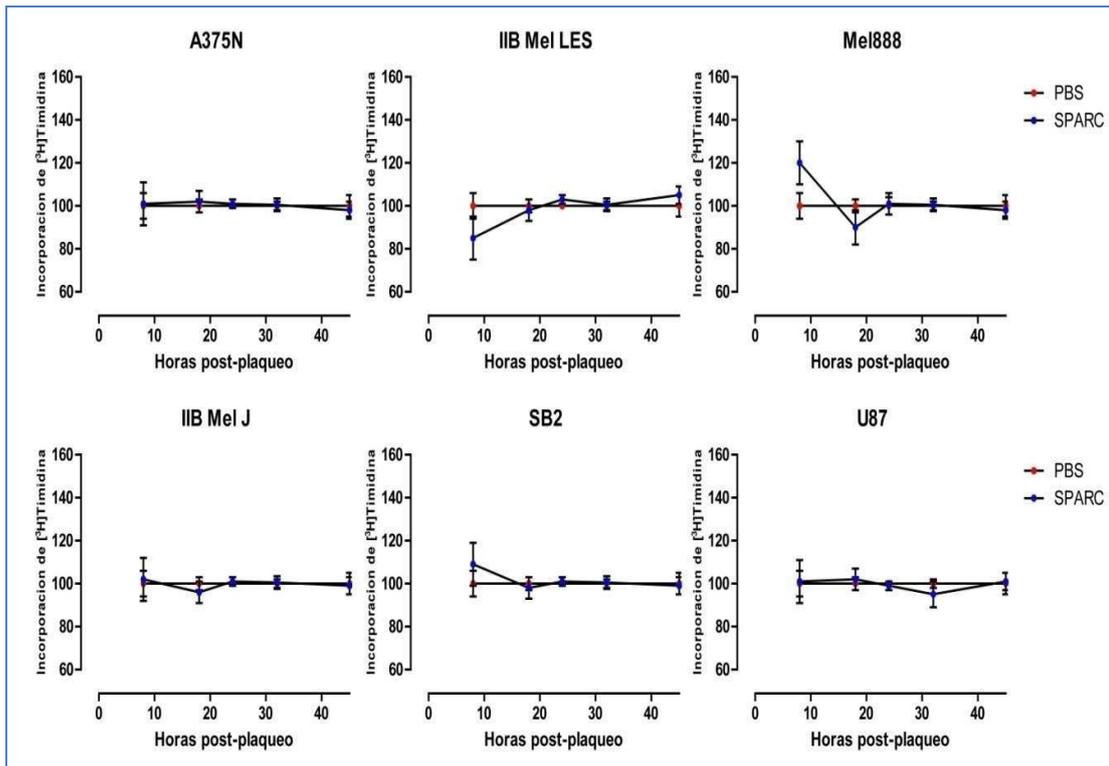


Figura 11 SPARC NO AFECTA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DE TUMORES. ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA EN PRESENCIA DE SPARC EN CÉLULAS CON EXPRESIÓN ENDÓGENA DE SPARC. . LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO. PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES.

Dado que todas estas líneas expresan SPARC de manera endógena, probamos el efecto del agregado exógeno en células malignas que no lo expresan. Para ello utilizamos células derivadas de tumores humanos de colon (Figura 12). Es interesante que estas líneas tampoco sean esencialmente sensibles a los efectos de SPARC, salvo pequeñas diferencias en la línea LoVo a las 18hs. post-plaqueado.

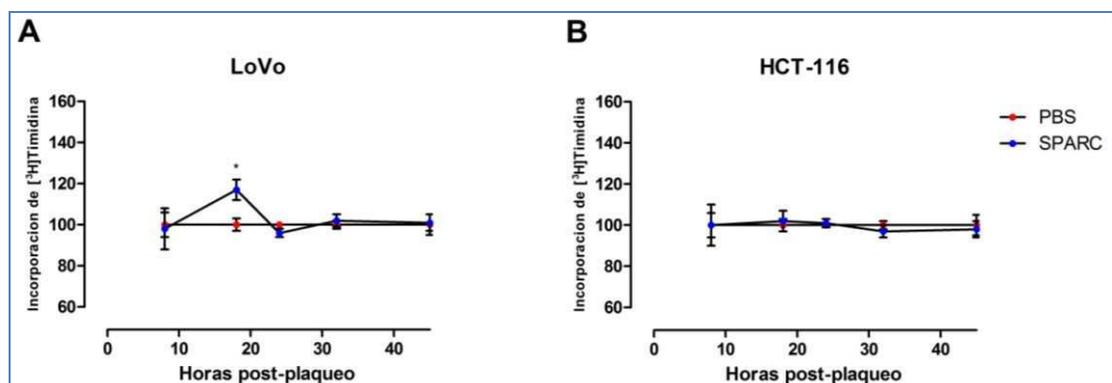


Figura 12 EFECTO DE SPARC EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS SIN EXPRESIÓN ENDÓGENA DE SPARC. ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA EN PRESENCIA DE SPARC. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (* $p < 0.05$).

Estos resultados indican que sin importar los mecanismos de transformación, que involucren un aumento de la expresión de SPARC como en los melanomas o su completa desaparición como en cáncer de colon, las células malignas se vuelven refractarias a los efectos de SPARC sobre la proliferación. En este aspecto, es notorio que las células A375N de melanoma, de las cuales se obtuvo SPARC son completamente refractarias a los efectos autócrinos de dicha proteína.

La regulación de la expresión endógena de SPARC sensibiliza a las células de melanoma frente al agregado de SPARC exógeno.

En base a los resultados previos evaluamos si la expresión de SPARC endógeno podía estar asociada al efecto refractario de células de melanoma a SPARC exógeno.

Para ello utilizamos clones derivados de células de melanoma en los cuales la expresión de SPARC fue disminuida utilizando dos estrategias diferentes en la primera se expresó un ARNm antisentido de SPARC (L1D)(Ledda, Adris et al. 1997) y en la segunda se utilizó la expresión de un ARN de interferencia en horquilla (L2F6). En ambos casos los clones poseen una expresión residual de SPARC entre el 20 y el 40% con respecto a sus controles parentales LCMV y Lblast, respectivamente (Figura 13).

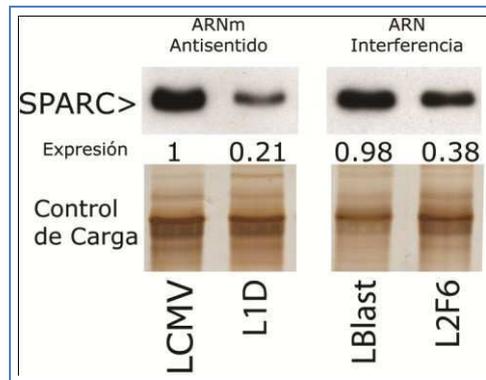


Figura 13 EXPRESIÓN DE SPARC EN CLONES DE IIB-MEL LES EXPRESANDO ARNm ANTISENTIDO O ARN DE INTERFERENCIA. LAS CÉLULAS DE MELANOMA IIB-MEL LES FUERON TRANSFECTADAS CON UN PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DE ARNm DE SPARC EN ORIENTACIÓN ANTISENTIDO O ARN EN HORQUILLA CONTRA LA SECUENCIA 5'-TCTTAGTCTTAGTCACCTTAT-3' del ARNm de SPARC HUMANO. SE SELECCIONARON CLONES CON EXPRESIÓN DISMINUIDA. ARRIBA, WESTERN BLOT (WB) ESPECÍFICO DE SPARC DE MEDIO CONDICIONADO POR CLONES SELECCIONADOS (L1D, L2F6) Y SUS RESPECTIVOS CONTROLES (LCMV, LBLAST). ABAJO, SDS-PAGE DEL MISMO VOLUMEN DE MEDIO SEMBRADO PARA WB TEÑIDO CON PLATA.

Ambas líneas fueron generadas previamente en el laboratorio y es interesante notar que ambos métodos produjeron patrones de proteínas secretadas similares

demostrado mediante ensayos de proteómica (Sosa, Girotti et al. 2007), las cuales incluyen a SPARC mismo así como otras proteínas moduladas él previamente conocidas, como Colágeno I y IV. Esto indica que ambas estrategias generan clones con cambios muy similares en la expresión génica, los cuales resultan de la modulación de SPARC.

Al igual que la línea parental, IIB-Mel LES, la entrada al ciclo de las células control LCMV o Lblast arrestadas por confluencia y privación de suero, no fue afectada significativamente por SPARC (Figura 14A y B). Sin embargo la disminución de SPARC en las líneas de melanoma, tanto mediante el uso de RNA antisentido o ARNi, las volvió sensibles a la presencia de SPARC exógeno observándose una disminución del 35% de la incorporación de timidina a las 48hs de iniciado el experimento (Figura 14C y D).

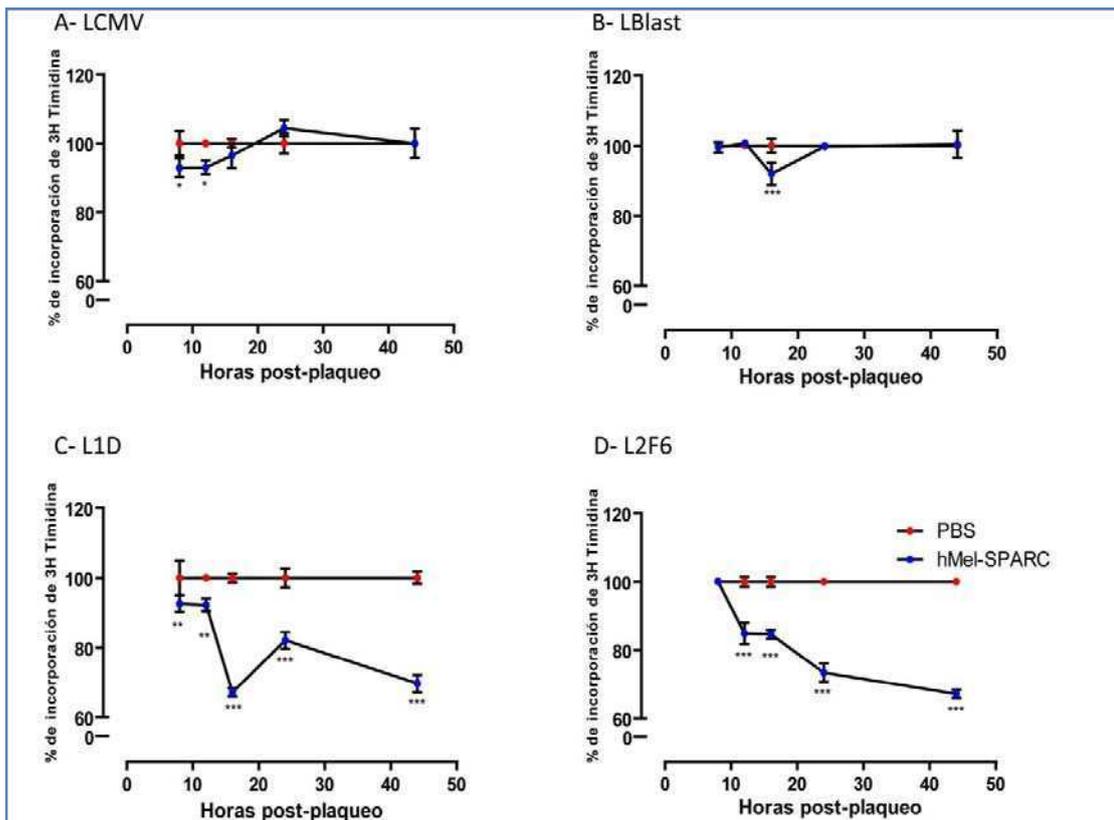


Figura 14 EL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE SPARC SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS IIB MEL-LES A LOS EFECTOS ANTI-PROLIFERATIVOS DE SPARC EXÓGENO. A Y C) SPARC INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE IIB MEL LES TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE CON EL ADN ANTISENTIDO DE SPARC (L1D) PERO NO DEL CONTROL LCMV. B Y D) SPARC INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS IIB MEL LES TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE CON ARNI ESPECÍFICO PARA SPARC (L2F6) MIENTRAS QUE EL CONTROL (LBLAST) NO RESPONDE. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Para establecer si el efecto inhibitorio de la incorporación de timidina y por lo tanto la entrada en proliferación era específico de SPARC o un efecto general ante cualquier compuesto inhibitorio, probamos los efectos de un compuesto genotóxico inhibitorio como el 5-fluouracilo (5FU). Este afectó la incorporación de timidina de manera similar en todas las líneas utilizadas en el ensayo independientemente del nivel de expresión de SPARC a las 48hs. de tratamiento con la droga en todas las concentraciones probadas (Figura 15).

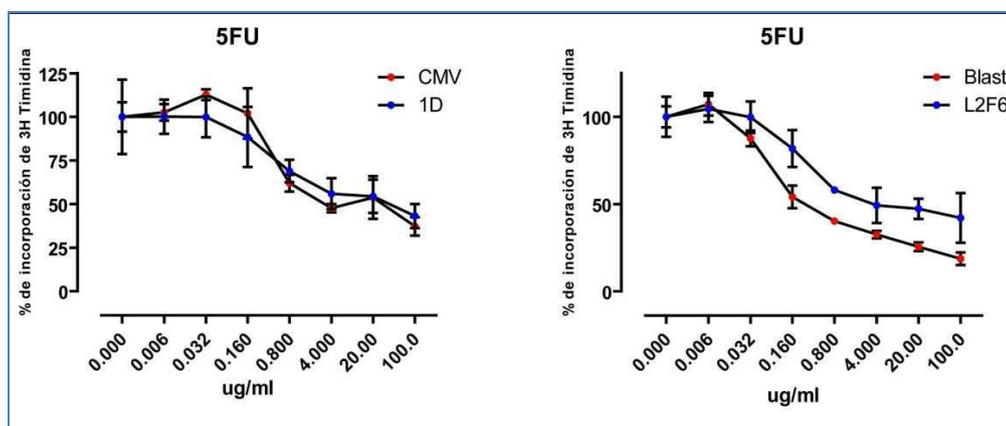


Figura 15 EFECTOS DE 5FU SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA CON DISMINUCIÓN DE SPARC. LAS LÍNEAS CON DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SPARC FUERON TRATADAS DURANTE 24HS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 5 FLUOROURACILO (5FU) EN PRESENCIA DE TIMIDINA TRITIADA. LOS VALORES SE EXPRESARON COMO EL PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL PROCESADO EN PARALELO. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS EN TRIPLICADO Y PARA CADA PUNTO SE CALCULÓ EL PROMEDIO \pm DE Y SE ANALIZÓ LA DIFERENCIA CON RESPECTO AL CONTROL MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Por otro lado, también se utilizó cisplatino (CPT) como agente inhibitorio general ya que actúa generando aductos en el ADN que disparan la muerte celular programada. El tratamiento con CPT produjo un efecto aun más pronunciado en las células parentales LCMV y Lblast en comparación con células L1D y L2F6 con menor expresión de SPARC (Figura 16). Estos efectos indican que los efectos de inhibición de la incorporación de timidina ante la presencia de SPARC exógeno en las líneas de melanoma con SPARC disminuido es un efecto específico hacia la proteína.

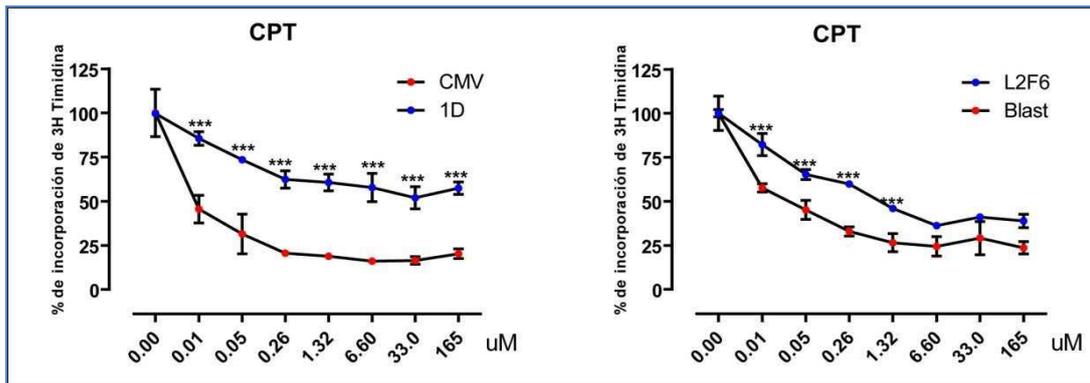


Figura 16 EFECTO DE CISPLATINO (CPT) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA CON DISMINUCIÓN DE SPARC. LAS LÍNEAS CON DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SPARC FUERON TRATADAS DURANTE 24HS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPT EN PRESENCIA DE TIMIDINA TRITIADA. SE ANALIZÓ MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES. LOS ASTERISCOS INDICAN SIGNIFICANCIA EN POST-TEST DE BONFERRONI (***) $p < 0,01$.

Para establecer si además de la proliferación de células de melanoma, la migración también estaba afectada por la disminución de la expresión de SPARC, se realizaron ensayos en cámaras de Boyden modificadas con el agregado de SPARC en el compartimiento celular (Figura 17).

En primer lugar se observó que SPARC no afecta la capacidad de migración de las células de melanoma utilizando 10% de SFB como factor quimioattractante, independientemente de los niveles de expresión de SPARC (Figura 17A). Sin embargo, mientras que el agregado de SPARC no afecta la capacidad quimio-cinética de las células parentales LCMV y Lblast, SPARC inhibe la capacidad migratoria de las células con expresión restringida de SPARC (Figura 17B). La disminución de la capacidad quimio-cinética de L1D y L2F6 fue de 51 y 43% respectivamente con respecto a sus controles parentales.

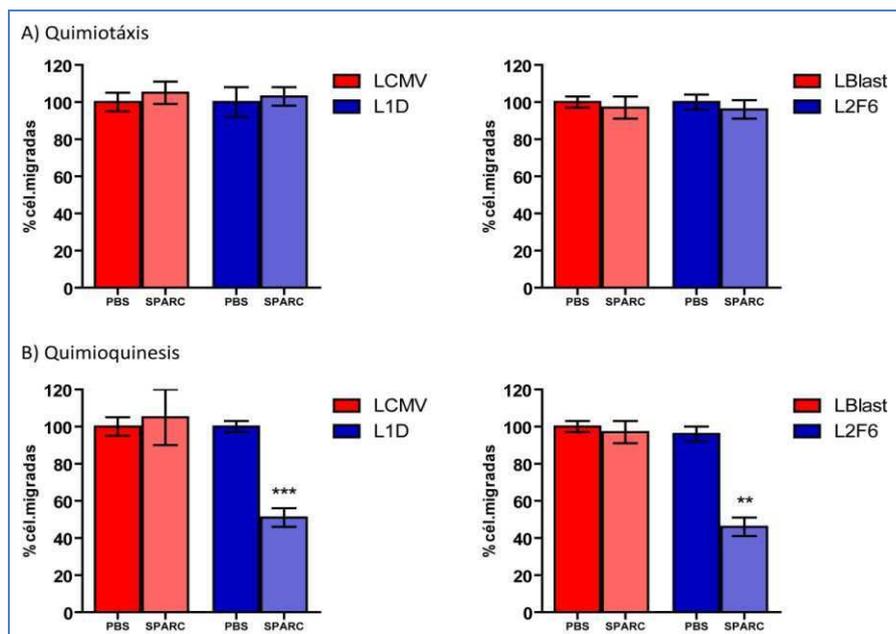


Figura 17 INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SPARC SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS IIB-MEL LES AL AGREGADO EXÓGENO DE SPARC EN ENSAYOS DE MIGRACIÓN. A) B) SPARC INHIBE LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE TIENEN INHIBIDO SPARC PERO NO EN LAS CÉLULAS CONTROL. LA MIGRACIÓN FUE REALIZADA EN PRESENCIA (QUIMIOTAXIS) O AUSENCIA (QUIMIOQUINESIS) DE 10^{-7} DE SBF COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO PORCENTAJE (/) DE LA MIGRACIÓN CON RESPECTO A LAS CÉLULAS MIGRADAS FRENTE A PBS COMO CONTROL. LOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS POR TRIPLICADO Y CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO \pm DE. LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS FUERON PRBADAS MEDIANTE ANOVA DE 2 FACTORES ENTRE LÍNEAS Y TRATAMIENTOS. LOS ASTERISCOS INDICAN SIGNIFICANCIA EN POST-TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.00$; ** $p < 0.01$).

Los efectos de SPARC en la modulación de la quimioquinesis pero no de la quimioatracción podría indicar que éste modula señales basales pero no señales más fuertes presentes en 10^{-7} de SFB que son capaces de promover la migración en más de 5 veces con respecto a los niveles basales (promedio de 51 células por campo en el control en la quimioquinesis versus 224 durante la quimiotaxis). Estos experimentos nos muestran que la inhibición de SPARC en las células de melanoma mediante diferentes estrategias, provoca la sensibilización hacia SPARC exógeno.

Se ha descrito que SPARC modula la expresión de diversas proteasas las cuales pueden llegar a tener al mismo SPARC como blanco. Siendo esta una posible explicación a la carencia de efectos de la proteína sobre la proliferación o la migración de las células de melanoma y del efecto de reversión al inhibir la expresión de SPARC, se incubó $10\mu\text{g/mL}$ de SPARC durante 24hs de medio de cultivo sin suero de células L2F6, LCMV y sus contrapartes con SPARC inhibido, L2F6 y L1D.

Dicho medio condicionado fue concentrado 10 veces mediante precipitación con acetona y sembrado en un SDS-PAGE para ser probado contra SPARC(FIGURA 18).

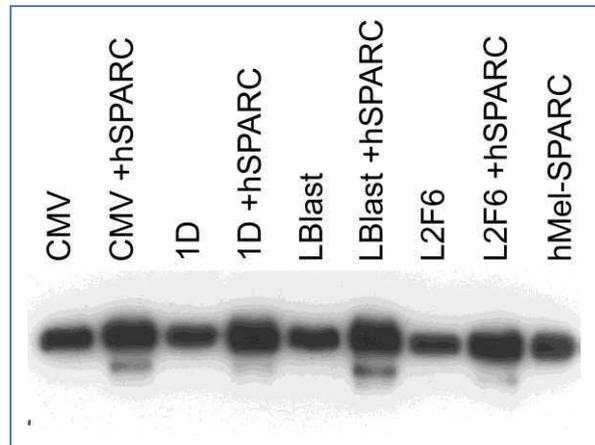


FIGURA 18 INCUBACIÓN DE SPARC CON CÉLULAS DE MELANOMA CON EXPRESIÓN DISMINUIDA DE SPARC ENDÓGENO. LAS CÉLULAS FUERON CRECIDAS HASTA CONFLUENCIA EN PLACA DE 100MM DE DIÁMETRO Y SE LAS INCUBÓ EN 5ML DE MEDIO SIN SUERO CON 5ug/mL DE hMEL-SPARC DURANTE 24HS. EN LA FIGURA SE MUESTRA UN WESTERN BLOT SOBREEXPUERTO DE 25UL DE MEDIO CONDICIONADO CONCENTRADO 10 VECES PROBADO CON SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO CONTRA SPARC HUMANA.

Como resultado de esta incubación observamos que ninguna línea celular modificó la proteína exógena. Sin embargo, la concentración del medio y la sobreexposición permitió revelar una segunda banda específica de SPARC que se observa con el mismo patrón de intensidad que la banda mayoritaria.

En conjunto, de estos estudios podemos concluir que las proteínas purificadas, tanto en su forma nativa como recombinante, poseen patrones estructurales similares entre ellas y respecto de otras proteínas anteriormente publicadas en la literatura. Asimismo, la actividad biológica de todas las formas de SPARC fue validada mediante un ensayo funcional de proliferación de fibroblastos murinos, metodología adoptada en la actualidad por nuestro laboratorio como control de calidad de todas las preparaciones de SPARC. Además, partiendo de la evidencia mencionada en los párrafos anteriores, no existiría un efecto directo de SPARC sobre la proliferación de las células tumorales estudiadas. Dicho resultado sumado a otros trabajos de nuestro grupo(Prada, Benedetti et al. 2007), llevaron a la generación de un trabajo aceptado(Haber, Gottifredi et al. 2008), en el que se demuestra definitivamente que las células tumorales (expresen o no SPARC) son

insensibles a la acción de SPARC exógena sobre la proliferación celular. Lo que nos permite pensar que existe un mecanismo molecular propio de las células tumorales que permitiría que las mismas evadan la acción antiproliferativa de SPARC producida por los fibroblastos y las células endoteliales del estroma tumoral.

Capítulo 2

Capítulo 2: SPARC regula la modulación de la migración y la diferenciación endotelial.

SPARC a diferentes concentraciones, aumenta o inhibe la migración endotelial dependiente de bFGF

En vista de que SPARC es capaz de modular diferentes aspectos del fenotipo y actividad de células endoteliales, nos concentramos en la segunda etapa de esta tesis en intentar establecer su rol global en el proceso de angiogénesis. Inicialmente, determinamos el efecto de SPARC sobre la migración de células endoteliales inducida por bFGF o VEGF, dos factores ampliamente reconocidos como paradigmáticos como estímulo pro-angiogénico. La migración de células endoteliales es una herramienta muy útil que nos permite determinar las propiedades angiogénicas de un factor determinado. Para ello el factor es colocado en el compartimiento inferior y las células en el superior. Contando la cantidad de células que migran en un determinado tiempo, podemos determinar la actividad quimioattractante de éste. En nuestro esquema la primera determinación que realizamos es la del efecto de SPARC como único factor presente. Para ello se realizaron ensayos de migración de células BAE hacia concentraciones crecientes de SPARC (Figura 19). Además también se probó el efecto de colocar SPARC en el mismo compartimiento que las células para determinar si este estaba promoviendo la quimioquinesis (Figura 19).

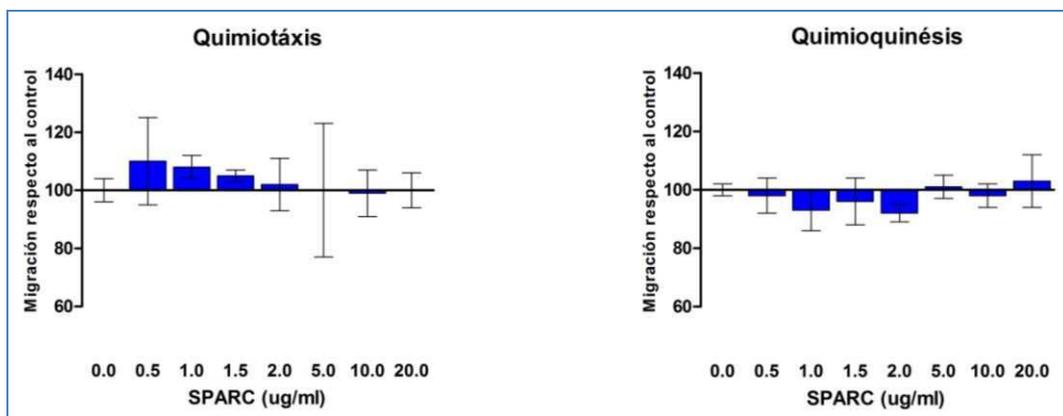


Figura 19 SPARC NO TIENE ACTIVIDAD QUIMIOQUINÉTICA NI QUIMIOTÁCTICA SOBRE CÉLULAS BAE. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE A LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS (0.0ug/mL). LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE TRIPLICADO ± DE.

De ambos experimentos, determinamos que SPARC por sí sola no posee efectos quimiotácticos o quimioquinéticos ya que no fue capaz de estimular la migración de las células endoteliales.

SPARC produce un efecto bifásico en la migración hacia bFGF

Dado que los efectos de SPARC podrían estar involucrados en la modulación de la capacidad migratoria de las células endoteliales hacia otros factores, inicialmente se estudio la transmigración de células BAE en cámaras de Borden inducida por 2ng/mL de bFGF en presencia de distintas concentraciones de SPARC puesta en contacto con las células endoteliales (Figura 20 BAEC). A concentraciones de entre 0,5-1,5 ug/mL (bajas concentraciones) SPARC estimula la migración hacia bFGF, mientras que a concentraciones mayores a 2ug/mL SPARC posee un efecto inhibitorio sobre la transmigración dependiente de bFGF, directamente proporcional a la dosis utilizada.

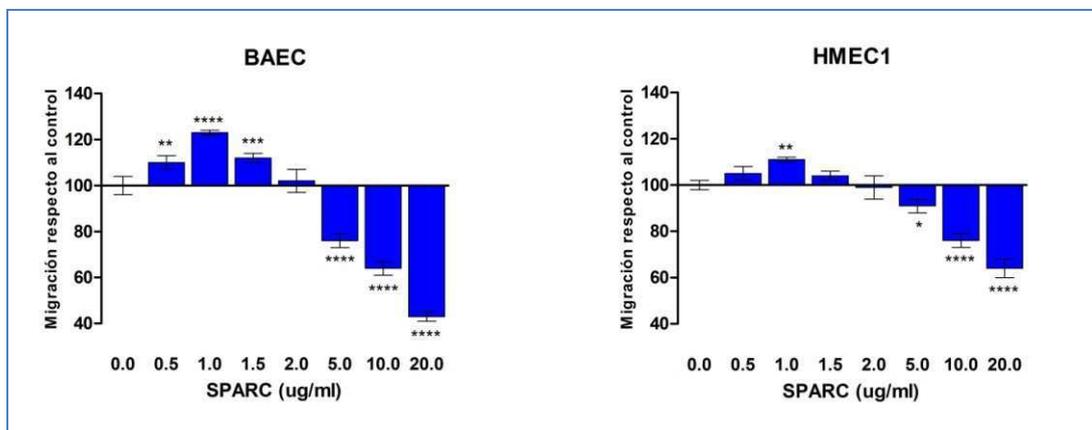


Figura 20. SPARC TIENE UN EFECTO BIFÁSICO SOBRE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA bFGF. BAJAS CONCENTRACIONES DE SPARC ESTIMULAN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS BAE HACIA 0,4ng/mL DE bFGF. ALTAS CONCENTRACIONES INHIBEN LA MIGRACIÓN. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA bFGF CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS(0.0ug/mL). LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE TRIPLICADO ± DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001;****p<0.0001).

Para comprobar si el efecto se extiende a otra línea endotelial, se realizó el mismo ensayo con células HMEC1, las cuales respondieron de la misma manera, con un

estímulo del 20/ a 1ug/mL y una inhibición de 36/ a la máxima concentración probada (Figura 20 HMEC1).

Para demostrar que el efecto es debido a la presencia de SPARC, se realizaron los mismos experimentos de migración en células BAE y HMEC1 utilizando concentraciones estimuladoras (1ug/mL) o inhibitorias (5ug/mL) de SPARC preincubado con anticuerpos bloqueantes específicos (Ab236)(Sweetwyne, Brekken et al. 2004) cedidos por la Dra. Helene Sage (hsage@benaroyaresearch.org).

SPARC produce efectos estimulatorios o inhibitorios sobre la migración de las células endoteliales hacia bFGF que se revierte en presencia del anticuerpo bloqueante pero no con el Control de isotipo (IgG1) (Figura 21) confirmando que el efecto modulador es específico.

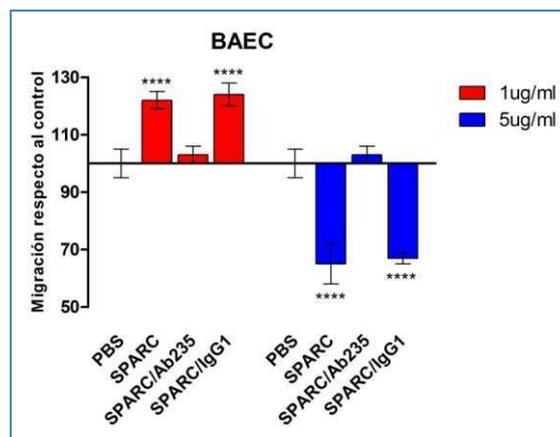


Figura 21 BLOQUEO DE SPARC Y MIGRACIÓN HACIA bFGF. EL ANTICUERPO BLOQUEANTE DE SPARC, Ab236, INHIBE EL EFECTO ESTIMULADOR E INHIBITORIO DE SPARC EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS BAE HACIA bFGF. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA bFGF CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN DUPLICADO O TRIPPLICADO \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (**** p <0.001).

La máxima inhibición, pero no el efecto estimulatorio, es dependiente de la matriz extracelular donde ocurre la migración.

Dado que la migración endotelial se establece a partir de la interacción con distintas proteínas de la MEC, se analizó si el efecto bifásico producido por las diferentes concentraciones de SPARC es dependiente de los componentes la matriz extracelular específicos utilizados.

Se realizaron migraciones similares a las descritas anteriormente, utilizando membranas recubiertas con Colágeno tipo I (Col I), Fibronectina (Fn) o un polímero de secuencias aminoacídica RGD (Arg-Gly-Asp) correspondiente al sitio de interacción de la Fn con las integrinas específicas ($\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alphaIII\beta3$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta6$) (Figura 22).

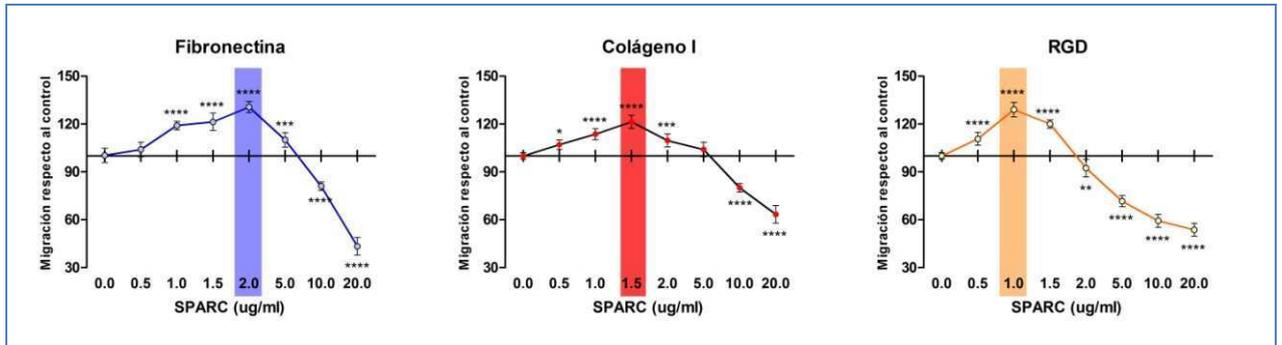


Figura 22 MIGRACIÓN ENDOTELIAL HACIA bFGF EN DIFERENTE MATRICES. EL EFECTO BIFÁSICO DE SPARC SOBRE LA MIGRACIÓN HACIA bFGF OCURRE DE MANERA SIMILAR SOBRE MATRICES DE COLÁGENO I, FIBRONECTINA Y EL POLÍMERO ARTIFICIAL DE REPETICIONES RGD. EN COLOR SE INDICA LA CONCENTRACIÓN QUE PRODUCE EL MÁXIMO ESTÍMULO MIGRATORIO PARA CADA MATRIZ. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE bFGF CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Las comparaciones mostraron que el efecto estimulatorio de SPARC ocurre con todas las matrices con pequeñas variaciones en la concentración de máximo estímulo en cada matriz, 2ug/mL en fibronectina, 1,5ug/mL sobre colágeno tipo I y a 1ug/mL sobre el polímero RGD. Por otro lado, el efecto inhibitorio de SPARC fue menor en Col I y Fn en comparación a RGD, aunque mantiene su dependencia respecto a la concentración.

SPARC aumenta la migración endotelial dependiente de VEGF

Dado que la migración endotelial es un proceso central en la angiogénesis y uno de los factores más importantes involucrados en ella es el Factor de Crecimiento Vascular-Endotelial (VEGF) se determinaron los efectos de la presencia de SPARC en la migración inducida por el mismo.

Para ello se realizaron experimentos similares a los descritos anteriormente utilizando 1ng/mL para células BAE y 5ng/mL para HUVE de la variante 165 de VEGF (a la que denominaremos VEGF genéricamente). De manera similar a lo que ocurre

con bFGF, la presencia de SPARC en contacto con las células endoteliales aumentó la migración de estas hacia VEGF hasta una concentración de 5ug/mL disminuyendo a 10 ug/mL e inhibiendo, aunque no significativamente, a 20 ug/mL (Figura 23).

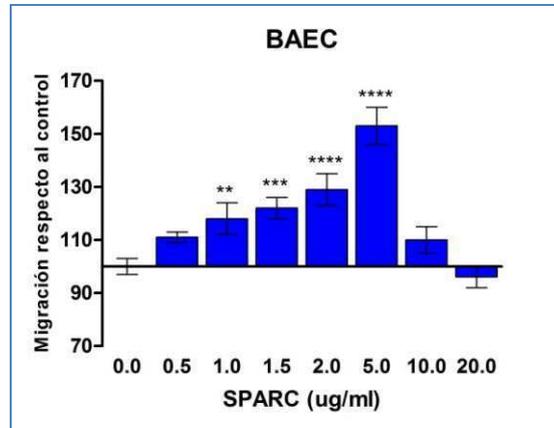


Figura 23 MIGRACIÓN HACIA VEGF EN PRESENCIA DE SPARC. LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO EL PORCENTAJE DE LA MIGRACIÓN CORRESPONDIENTE DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE VEGF CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPPLICADO \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE UN FACTOR CON TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

SPARC bloquea la actividad de VEGF.

Estudios previos mostraron que SPARC modula la actividad mitogénica de VEGF sobre células endoteliales interactuando directamente con éste e impidiendo la unión a su receptor (Kupprion, Motamed et al. 1998). Los resultados de las migraciones a concentraciones mayores de 10ug/mL observados en la Figura 23 podrían ser resultado de la interferencia de SPARC sobre VEGF. Para determinar si esto estaba ocurriendo realizamos migraciones con pre-incubación de SPARC y VEGF 12hs a 4°C o mezclados inmediatamente antes de la migración (Figura 24).

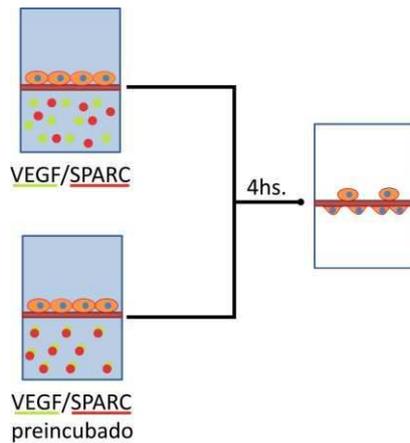


Figura 24 ENSAYO DE MIGRACIÓN PREINCUBADO SPARC Y VEGF. LAS MIGRACIONES SE REALIZARON COMO EN LOS EXPERIMENTOS ANTERIORES PERO CON LOS FACTORES EN LA MISMA CÁMARA.

La pre-incubación con SPARC inhibe el efecto quimioattractante de VEGF sobre las células endoteliales de manera dependiente. Este alcanza una disminución de casi el 90% del efecto de VEGF a más de 5 μ g/mL de SPARC.

Sin embargo, es interesante notar que SPARC no produce ningún efecto sobre la migración de las células hacia el VEGF si se los mezcla inmediatamente antes del inicio de la migración (Figura 24, SPARC+VEGF) en el tiempo estudiado.

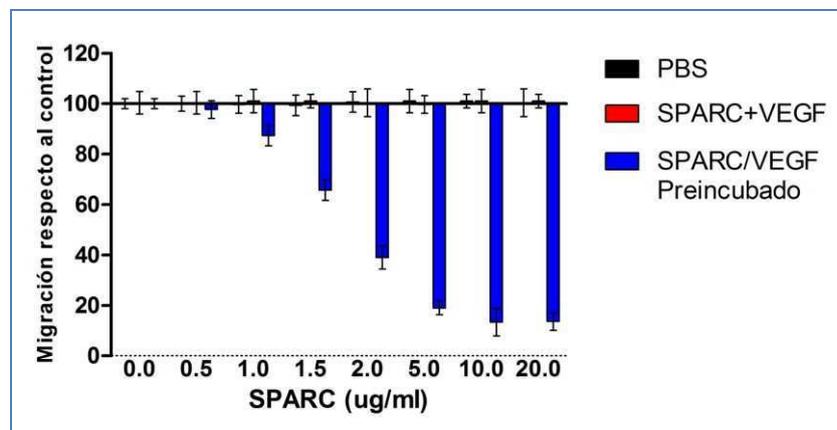


Figura 25 BLOQUEO DEL EFECTO PRO-MIGRATORIO DE VEGF PRE-INCUBANDO CON SPARC. SE INCUBÓ SPARC EN LAS CONCENTRACIONES INDICADAS CON 2ng/mL VEGF (SPARC/VEGF PREINCUBADO), SE COLOCÓ EN LA CÁMARA INFERIOR. POR OTRO LADO SE COLOCÓ SPARC Y VEGF AL MISMO TIEMPO EN LA CÁMARA INFERIOR (SPARC+VEGF) Y SE EVALUÓ LA MIGRACIÓN DE AMBOS CON RESPECTO AL CONTROL CON PBS.

Los resultados de la preincubación están de acuerdo con estudios previos (Kupprion, Motamed et al. 1998) que demuestran que SPARC se une a VEGF impidiendo que este interactúe con su receptor.

SPARC induce la diferenciación de las células endoteliales

La diferenciación endotelial es el evento posterior a la migración asociado al desarrollo de una vasculatura funcional. Para evaluar la capacidad de diferenciación de células endoteliales inducida por SPARC, se realizaron ensayos de tubulogénesis sobre Matrigel™ (Baatout 1997) utilizando células BAE y HMEC1 en presencia de SPARC.

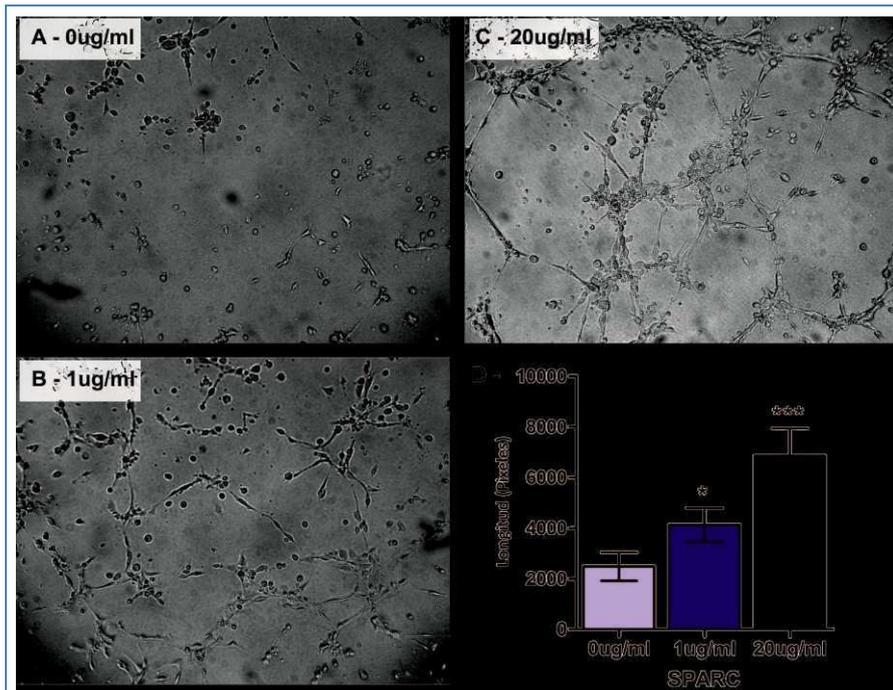


Figura 26 ENSAYO TUBULOGÉNICO, CURVA DE SPARC. SE SEMBRARON LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SOBRE MATRIGEL Y EN PRESENCIA DE 1 Y 20µg/mL DE SPARC. A, B, C) FOTOMICROGRAFÍAS 10X DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SOBRE MATRIGEL A LAS 18HS, CON 0, 1 Y 20µg/mL DE SPARC. D) CUANTIFICACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TÚBULOS. SE TOMÓ LA LONGITUD MEDIDA EN PÍXELES DE CADA IMAGEN DE LOS TÚBULOS FORMADOS A LAS 18HS. SE ANALIZARON 4 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE UN FACTOR PAREADO POR EXPERIMENTO CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL CONTROL SIN SPARC (*p<0.05, ***p<0.01).

Las células fueron puestas sobre Matrigel con diferentes concentraciones de SPARC y se las incubó 12hs. a 37°C en condiciones normales de crecimiento. En ausencia de estímulo ambas líneas celulares emiten un bajo número de proyecciones. Sin embargo, el agregado de SPARC, ya sea a concentraciones estimuladoras o inhibitoras de la migración endotelial, 1 y 20µg/mL respectivamente, inducen la generación de túbulos de manera dosis dependiente. La cuantificación de la extensión de la red formada nos muestra que SPARC indujo un aumento del 50% y del 160% a 1 y 20µg/mL, respectivamente, en la formación de túbulos (Figura 26D).

Es interesante notar que SPARC posee un efecto muy fuerte en la inducción de la diferenciación ya que en ensayos de agregado directo de 10ug/mL de la proteína purificada sobre cultivos en monocapa de células BAE produce la inducción de un fenotipo tubular similar al observado en los ensayos previos realizados sobre Matrigel (Figura 27).

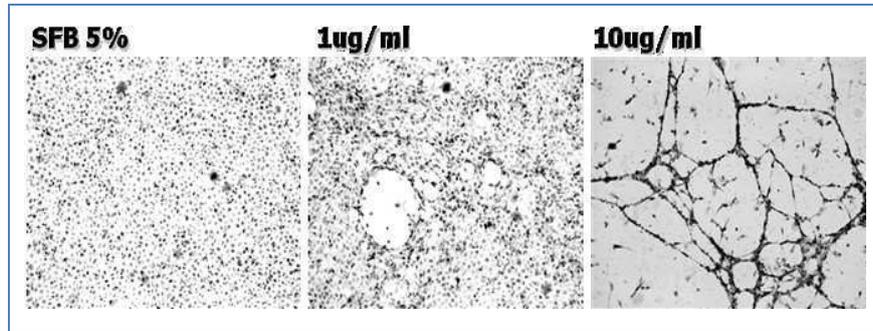


Figura 27 SPARC INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS EN MONOCAPA. FOTOMICROGRAFÍAS 10x DE CÉLULAS BAE CECIDAS SOBRE VIDRIO EN MONOCAPA, ARRESTADAS POR DEPRIVACIÓN DE SUERO E INCUBADAS 18HS EN PRESENCIA DE SUERO FETAL BOVINO (SFB) O SPARC A LAS CONCENTRACIONES INDICADAS FIJADAS CON PARAFORMALDEHÍDO 4/ Y TEÑIDAS CON GIEMSA.

Ambos ensayos indican que SPARC es un fuerte inductor de la diferenciación de células endoteliales dependiente de la concentración.

Capítulo 3

Capítulo 3: Efectos de SPARC secretado sobre células endoteliales.

SPARC es la única proteína secretada por las células de melanoma que afecta la migración de células endoteliales hacia factores quimiotácticos

El efecto bifásico de SPARC sobre la migración endotelial resaltó la potencial relevancia biológica de los cambios de la expresión de la proteína en las células de melanoma para modular el comportamiento endotelial. Para acercarnos a un contexto más complejo y evaluar el efecto de SPARC en conjunto con todos los factores parácrinos secretados por las células tumorales probamos el efecto del medio condicionado por éstas sobre las células endoteliales.

En estos ensayos, el medio condicionado por células A375N inhibió la migración de las células endoteliales BAE (Figura 28A) y HMEC1 (Figura 28B) hacia bFGF en un 35 y 17% respectivamente. Como control de que SPARC es responsable del efecto inhibitorio, se utilizó medio condicionado pre-incubado con 50ug del anticuerpo neutralizante Ab236. El bloqueo de SPARC anuló por completo el la inhibición de la migración de células endoteliales inducida por el medio condicionado obtenido de células A375N.

Es interesante notar que dicho medio condicionado diluido 1:1 (Dil. 50%) con medio fresco, produjo un aumento de la migración de las células endoteliales BAE y HMEC1 (Figura 28 Barras azules).

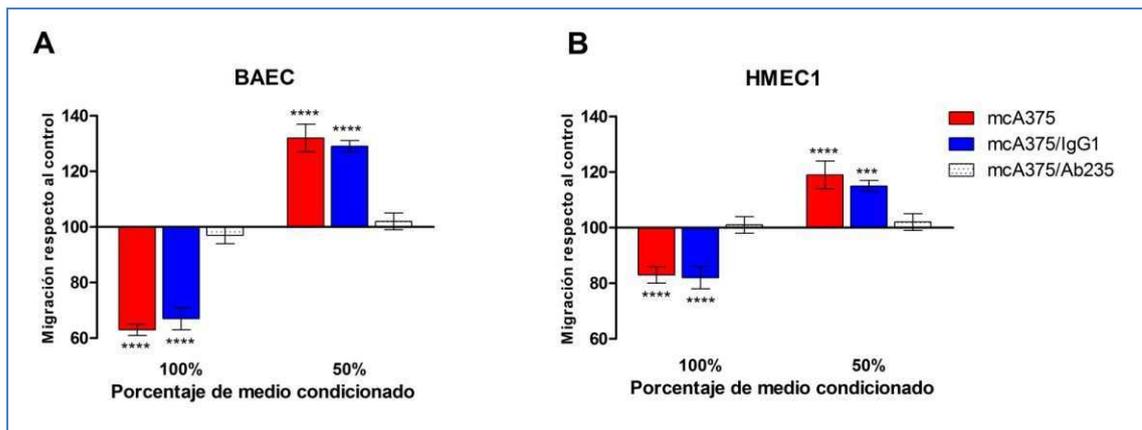


Figura 28 EL MEDIO CONDICIONADO POR LAS CÉLULAS DE MELANOMA A375N MODULA LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES BAE HACIA bFGF DE MANERA DEPENDIENTE DE SPARC. LA MIGRACIÓN SE REALIZÓ RESUSPENDIENDO LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE MELANOMA SIN DILUIR Y DILUIDO AL MEDIO CON MEDIO SIN CONDICIONAR (50%) Y CON ANTICUERPO BLOQUEANTE DE SPARC (mcA375/Ab236) O SU CONTROL DE ISOTIPO (mcA375/IgG1). SE CUANTIFICÓ EL NÚMERO DE CÉLULAS MIGRADAS A LAS 4HS. Y SE RELATIVIZÓ CON RESPECTO AL CONTROL CON MEDIO SIN CONDICIONAR. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPLICADO \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (**p<0.001;****p<0.0001).

Este efecto de la inducción de migración con el medio condicionado diluido 1:1, también fue completamente anulado con el anticuerpo neutralizante de SPARC. Cabe resaltar que un anticuerpo control de isotipo no tuvo ningún efecto (Figura 28 Barras blancas).

En otra serie de experimentos para determinar la contribución de SPARC secretado por las células de melanoma sobre la migración endotelial se utilizaron líneas de melanoma con expresión disminuida de SPARC mediante el uso de ARNi (Figura 29A). Esta serie de estudios demostró que el medio condicionado por las células control inhibió la migración mientras que el obtenido por las células con expresión disminuida de SPARC por la presencia de ARNi (clones A321 y A2175) estimuló la migración. (Figura 29B).

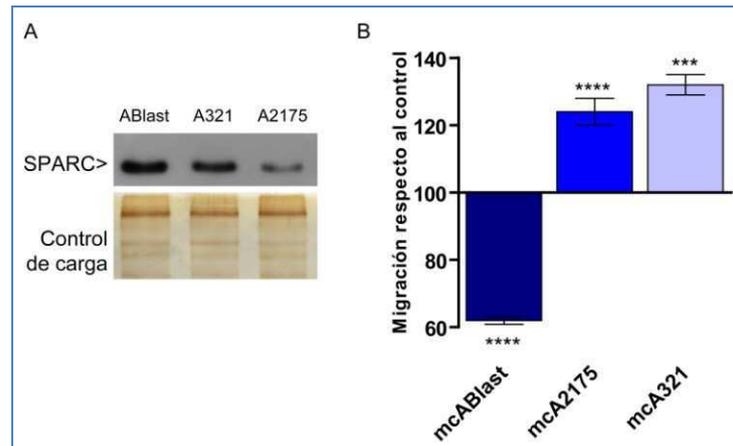


Figura 29 MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE MELANOMA CON EXPRESIÓN DE SPARC MODULADA. A) INMUNO-DETECCIÓN DE SPARC (ARRIBA) Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE TINCIÓN CON PLATA (ABAJO) EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE MELANOMA A321 UTILIZADO EN LAS MIGRACIONES. B) MIGRACIÓN DE CÉLULAS BAE HACIA bFGF DE BAE EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE MELANOMA CON DIFERENTES NIVELES DE SPARC. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN CUADRUPLICADO \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE UN FACTOR CON TEST DE BONFERRONI (** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Extendiendo el ensayo a otros medios condicionados por células que expresan SPARC, se analizó el efecto del medio por células derivadas de otro melanoma humano (MelJ, Figura 30A) y primarias de fibroblastos (HFL1, Figura 30B).

En ambos casos se observó el mismo comportamiento; es decir, el medio sin diluir inhibió la migración alrededor de un 20% y la dilución al medio la estimuló más del 20%. También se probaron diluciones mayores las cuales produjeron una pérdida de efecto inhibitorio/estimulador con valores similares al medio control sin condicionar (Figura 30).

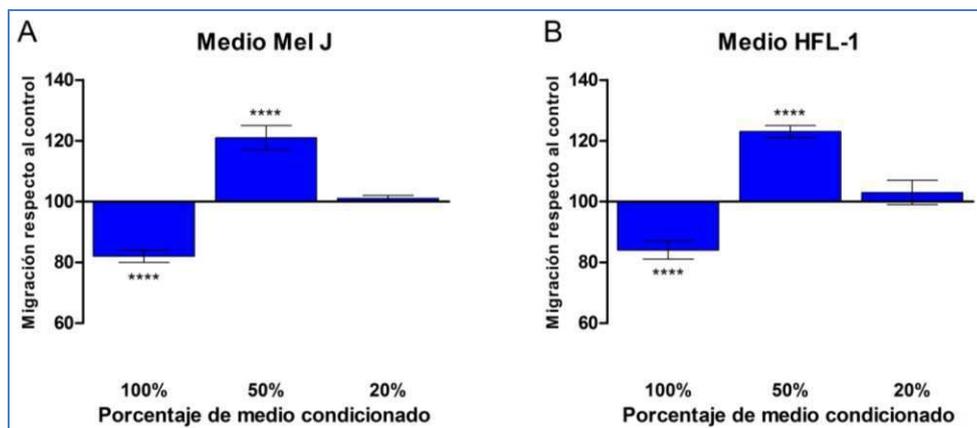


Figura 30 MIGRACIÓN CÉLULAS ENDOTELIALES BAE EN MEDIO CONDICIONADO HACIA bFGF. LAS MIGRACIONES SE REALIZARON EN LAS MISMAS CONDICIONES ANTERIORES CON MEDIOS CONDICIONADOS POR LAS LÍNEAS DE MELANOMA IIB-MEL J (A) Y FIBROBLASTOS

HFL1 (B), AMBAS EXPRESAN SPARC. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN CUADRUPlicado \pm DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (**** $p < 0.0001$).

Para confirmar si el efecto observado es atribuible a SPARC se probó el medio condicionado por una línea tumoral derivada de cáncer de colon (LoVo) que no posee expresión endógena de SPARC (Figura 31). Notoriamente, este medio condicionado no modifica la migración de las células endoteliales hacia bFGF en ninguna de las diluciones utilizadas.

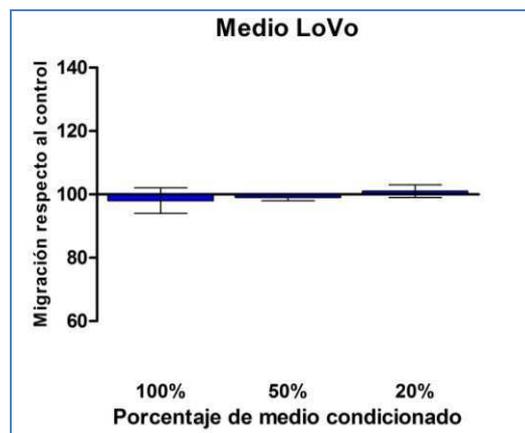


Figura 31 MIGRACIÓN CÉLULAS ENDOTELIALES BAE EN MEDIO CONDICIONADO HACIA bFGF. LAS MIGRACIONES SE REALIZARON EN LAS MISMAS CONDICIONES ANTERIORES CON MEDIO CONDICIONADO POR LA LÍNEA LoVo, QUE NO EXPRESA SPARC. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPLICADO \pm DE.

Para probar si la expresión de SPARC en estas células reproduce el efecto de los medios condicionados por las líneas que tienen expresión endógena, se utilizaron adenovirus expresando el ADNc completo de SPARC humano y un adenovirus de expresión de β -galactosidasa como control (Figura 32). Se condicionó el medio de las células con expresión forzada y se probó su capacidad de modulación de la migración hacia bFGF (Figura 32A).

Observamos que el medio condicionado de las células LoVo que expresan SPARC es capaz de inhibir la migración endotelial hacia bFGF cerca de un 30% con respecto al control y que la dilución de este medio produce un aumento del 20% de esta migración (Figura 32B).

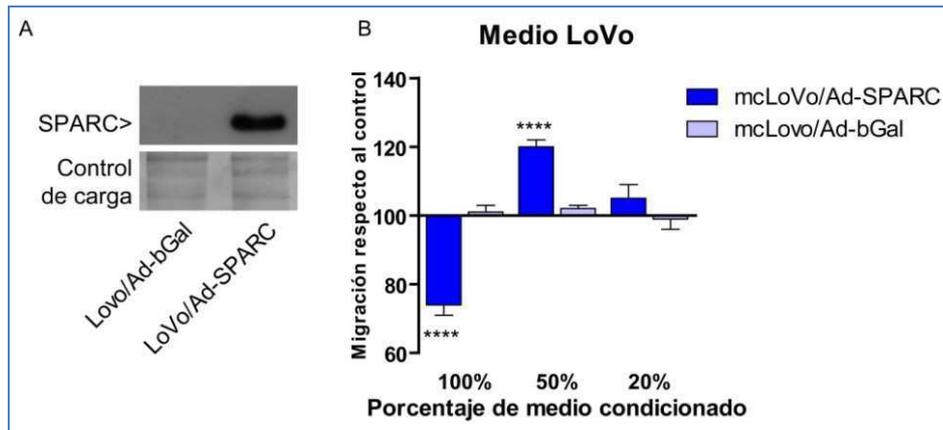


Figura 32 EL MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS QUE EXPRESAN SPARC MODULA LA MIGRACIÓN ENDOTELIAL. A) EXPRESIÓN DE SPARC EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS LoVo TRANSDUCIDAS POR AL ADENOVIRUS DE EXPRESIÓN DE SPARC (Ad-SPARC) Y DE b-GALACTOSIDASA (Ad-bGal). B). MIGRACIÓN ENDOTELIAL EN MEDIO CONDICIONADO HACIA bFGF UTILIZANDO LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE A. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPLICADO ± DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (**** $p < 0.0001$).

Extendiendo el ensayo hacia VEGF, se realizaron experimentos con medio condicionado de las células forzadas a expresar SPARC (Figura 33). En esta serie de experimentos también se obtuvieron resultados similares donde la expresión forzada de SPARC a las mayores concentraciones inhibe la migración hacia VEGF y su dilución la estimula.

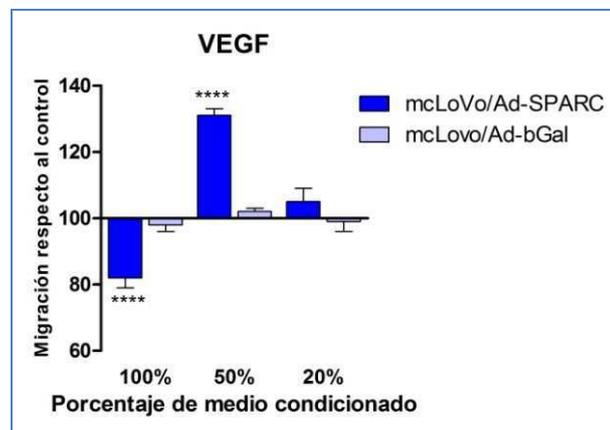


Figura 33 MIGRACIÓN HACIA VEGF EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS LoVo EXPRESANDO SPARC. MIGRACIÓN ENDOTELIAL EN MEDIO CONDICIONADO HACIA VEGF UTILIZANDO IGUALES MEDIOS CONDICIONADOS QUE EN LA Figura 32. LAS BARRAS EXPRESAN EL PROMEDIO DE UN TRIPLICADO ± DE. LOS ASTERISCOS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS MEDIDA POR ANOVA DE DOS FACTORES CON TEST DE BONFERRONI (**** $p < 0.0001$).

Estos resultados son sorprendentemente similares a los obtenidos utilizando el medio condicionado por las células A375N. Todos estos resultados indican que

SPARC posee una capacidad única de modular la migración de células endoteliales hacia dos de los factores claves para el proceso como los son bFGF y VEGF de manera dependiente de la concentración local. A bajas concentraciones posee un efecto estimulante volviéndose inhibitorio al aumentar su concentración.

Diferentes niveles de tensión de oxígeno regulan la expresión y secreción de la proteína SPARC por las células de melanoma.

Dado que la concentración local de SPARC sobre las células endoteliales modula su migración hacia factores proangiogénicos como VEGF, seguidamente decidimos establecer si la producción de SPARC por las células malignas puede ser regulada por las condiciones del microambiente tumoral como hipoxia.

Se analizó la expresión de la proteína SPARC en medio condicionado por células de las líneas A375N, IIB-MEL-IAN, SB-2, IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES y Mel-888 mantenidas 20 hs. en condiciones de hipoxia (0,1/ O₂) o normoxia (21/ O₂). Se determinó en todos los casos, que la producción de SPARC en el medio condicionado de células de melanoma fue menor en hipoxia (Figura 34).

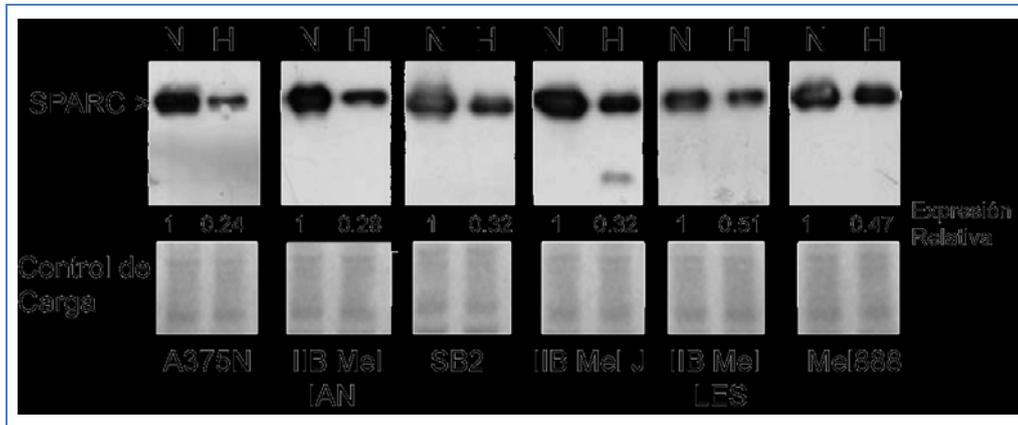


Figura 34 LA HIPOXIA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE SPARC EN MEDIO CONDICIONADO DE LÍNEAS DE MELANOMA. SE TOMÓ EL MEDIO DE CULTIVO CONDICIONADO 24HS. POR CÉLULAS DE CADA LÍNEA CELULAR MANTENIDAS EN CONDICIONES DE NORMOXIA (N) O EN CÁMARAS DE HIPOXIA (H) CON UNA MEZCLA DE AIRE CON 0,1/ DE OXÍGENO. SE SEMBRÓ LA MISMA CANTIDAD RELATIVA DE PROTEÍNAS TOTALES (CONTROL DE CARGA) Y EN PARALELO SE REALIZÓ UN W.B. ESPECÍFICO CONTRA SPARC Y SE CUANTIFICÓ POR DENSITOMETRÍA LA INTENSIDAD DE LAS SEÑALES. SE ESPECIFICA LA EXPRESIÓN RELATIVA A NORMOXIA.

Se cuantificó por densitometría la intensidad relativa de la señal específica de SPARC obtenida en hipoxia comparada con la señal de normoxia y se determinó que en las líneas de melanoma la condición de hipoxia produce una disminución promedio del 35/ ($\pm 10/$) de la secreción de SPARC al medio condicionado en las líneas de melanoma evaluadas.

Para establecer si la disminución de la secreción de SPARC podía estar regulada a nivel transcripcional evaluamos los niveles de ARNm de SPARC en hipoxia (Figura 35). La expresión del ARNm de SPARC aumentó significativamente en las líneas A375N e IIB-Mel J, disminuyó en SB2 y Mel888 y no se modificó en IIB Mel Ian e IIB Mel LES en hipoxia. Por lo cual no existe una correlación con los datos obtenidos de estas mismas líneas, donde el crecimiento en condiciones de muy bajo O_2 disminuyó la concentración de la proteína en el medio condicionado sugiriendo una regulación a nivel traduccional o secretorio.

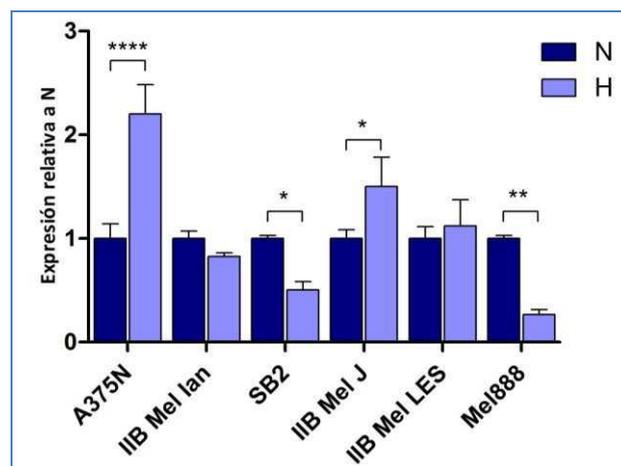


Figura 35 EXPRESIÓN DE ARNm DE SPARC EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DEL ARNm DE SPARC NORMALIZADO CONTRA EL ARNm DE ACTINA B EN LAS LÍNEAS DE MELANOMA UTILIZADAS EN EL ESTUDIO EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA UTILIZANDO NORMOXIA COMO CONDICIÓN CALIBRADORA. SE ANALIZARON 4 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL CALIBRADOR EN NORMOXIA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Dada la importancia de la hipoxia en el ambiente tumoral, analizamos si la expresión modulada de SPARC observada en los medios condicionados también se producía in vivo. Se inocularon 3×10^6 células de la línea celular A375N en ratones nude y 30 días post-inoculo se administró el marcador de zonas de hipoxia, cloruro

de pimonidazol (Hypoxyprobe-1™, Chemicon) y se realizó la tinción según las especificaciones del proveedor. Posteriormente, se analizó la expresión de SPARC en cortes histológicos y su relación con los niveles de hipoxia marcados por la sonda específica (Figura 36).

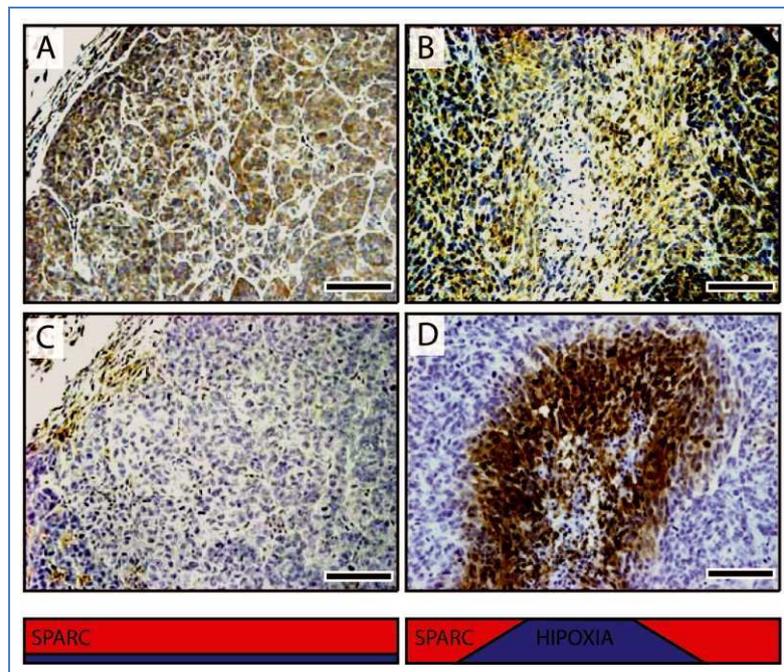


Figura 36 SPARC ESTÁ DISMINUIDO EN LA REGIÓN HIPÓXICA DE LOS TUMORES. SE INOCULARON CÉLULAS DE MELANOMA A375N Y LAS SEMANAS SE PROCEDIÓ A MARCAR LA ZONA EN HIPOXIA UTILIZANDO LA Sonda HYPOXYPROBE-1 30MIN. ANTES DE LA EUTANASIA. LAS CÉLULAS A375N FUERON INYECTADAS EN FORMA SUBCUTÁNEA EN RATONES ATÍMICOS. 5 SEMANAS LUEGO DE LA INOCULACIÓN LOS RATONES FUERON TRATADOS DURANTE 30MIN. CON HYPOXYPROBE-1. LOS TUMORES GENERADOS FUERON REMOVIDOS, INCLUIDOS EN PARAFINA, CORTADOS EN 8UM Y SECCIONES SERIADAS FUERON PROBADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA SPARC (A, B) O ADUCTOS DE HYPOXYPROBE-1(C, D) EN REGIONES PERITUMORALES (A, C) Y CENTRALES CON REGIONES EN HIPOXIA (B, D). SE REALIZÓ UNA CONTRA-TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA. ZONA TUMORAL PERIFÉRICA. BARRAS DE ESCALA = 100um. ABAJO) LAS BARRAS DEBAJO DE LAS IMÁGENES SEÑALAN LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL ESPECÍFICA.

En estos ensayos se encontramos una correlación inversa entre la expresión de SPARC y las zonas de hipoxia. Observamos la ausencia o muy poca expresión de SPARC en zonas altamente marcadas por la sonda de hipoxia y al contrario, un aumento de la expresión de SPARC en las zonas negativas para la presencia de hipoxia.

Los niveles de tensión de oxígeno modulan la expresión de SPARC y por ende, la migración de células endoteliales

Dado que en hipoxia las células de melanoma expresan menor cantidad de SPARC decidimos establecer si esta disminución es capaz de producir un efecto sobre la migración endotelial.

Para ello, utilizamos medio condicionado de células A375N obtenido en condiciones de 21% de O₂ (normoxia) y 0,1% de O₂ (hipoxia) en ensayos de migración hacia bFGF (Figura 37).

Mientras que el medio condicionado en normoxia inhibe la migración endotelial estimulada por bFGF, el medio condicionado en hipoxia que contiene niveles disminuidos de SPARC estimula la migración tanto de células BAE (Figura 37A) como HMEC1 (Figura 37B) hacia bFGF.

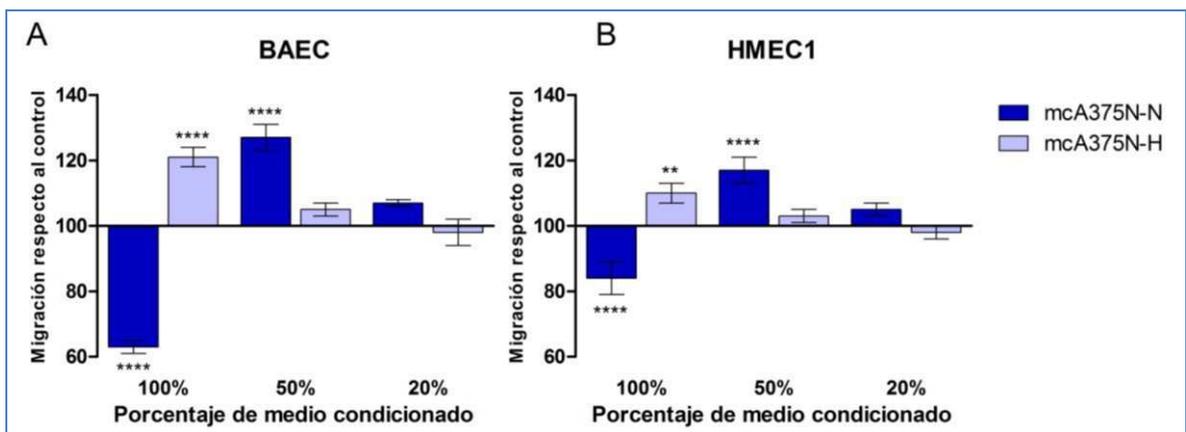


Figura 37 MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA bFGF EN MEDIO CONDICIONADO DE A375N EN NORMOXIA (mcA375N-N) E HIPOXIA (mcA375N-H). EL MEDIO CONDICIONADO EN NORMOXIA INHIBE LA MIGRACIÓN HACIA bFGF Y LAS DILUCIONES REVIERTEN ESTE EFECTO EN CÉLULAS BAE (A) Y EN HMEC1 (B). LAS CÉLULAS ENDOTELIALES FUERON SUSPENDIDAS EN MEDIO CONDICIONADO EN LAS DIFERENTES CONDICIONES Y DILUCIONES. SE ANALIZARON 3 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL CALIBRADOR EN NORMOXIA (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Para establecer si se trataba de un efecto general, utilizamos medio condicionado por las células de melanoma IIB-Mel-J. También en este caso el medio condicionado en normoxia resulto inhibitorio de la migración endotelial mientras que el obtenido en hipoxia la estimuló (Figura 38).

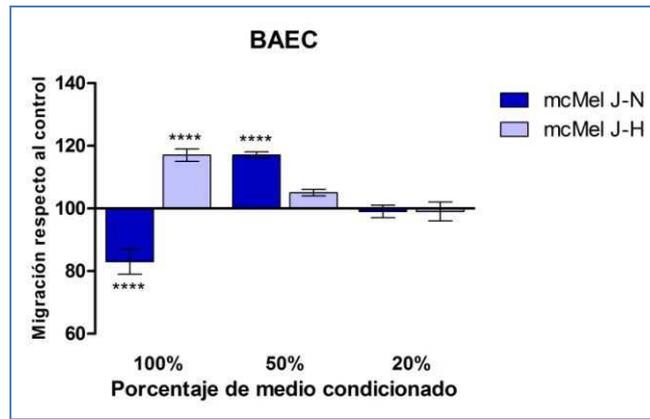


Figura 38 MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA bFGF EN MEDIO CONDICIONADO POR LAS CÉLULAS IIB MEL J (mcMel J) EN NORMOXIA (mcMel J -N) E HIPOXIA (mcMel J -H) EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE EN LA Figura 37. SE ANALIZARON 3 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL CALIBRADOR EN NORMOXIA (**** $p < 0.001$).

Como el medio condicionado por líneas celulares posee una gran cantidad de factores que podrían estar involucrados en el efecto observado, se estudió la contribución de SPARC mediante su neutralización con el anticuerpo Ab236. En estos ensayos determinamos que más del 70% del efecto estimulador de la migración inducida por el medio condicionado por A375N en hipoxia, es bloqueado por el Ab236 (Figura 39).

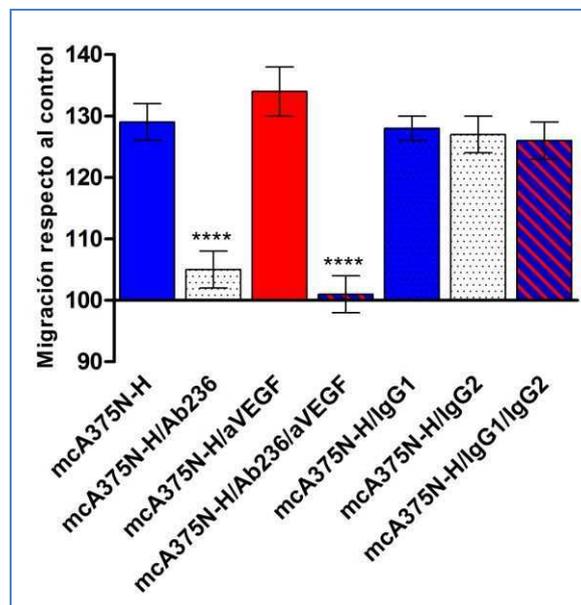


Figura 39 LA CONCENTRACIÓN DE SPARC EN EL MEDIO CONDICIONADO EN HIPOXIA ESTIMULA LA MIGRACIÓN HACIA bFGF. LA NEUTRALIZACIÓN DE SPARC CON ANTICUERPO BLOQUEANTE ANULA EL ESTÍMULO EN CÉLULAS BAE. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES FUERON SUSPENDIDAS EN MEDIO CONDICIONADO EN LAS DIFERENTES CONDICIONES PRE-INCUBADO CON ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE SPARC

(Ab236) y/o aVEGF O SUS CONTROLES DE ISOTIPO (IgG1, IgG2). SE ANALIZARON 3 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE UN FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL MEDIO CONDICIONADO EN HIPOXIA (mcA375N-H)(****p<0.001).

De manera similar a lo obtenido con la migración endotelial inducida por bFGF, el medio condicionado de A375N obtenido en normoxia inhibe la migración endotelial inducida por VEGF y la dilución al medio posee un efecto estimuladorio (Figura 40). Al igual que lo descrito en forma previa, el medio condicionado en hipoxia estimuló la migración hacia VEGF en comparación al obtenido en normoxia (Figura 40A). Estos experimentos fueron repetidos en la línea HMEC1, obteniéndose resultados similares de inhibición y estímulo con medio condicionados en normoxia e hipoxia respectivamente (Figura 40B).

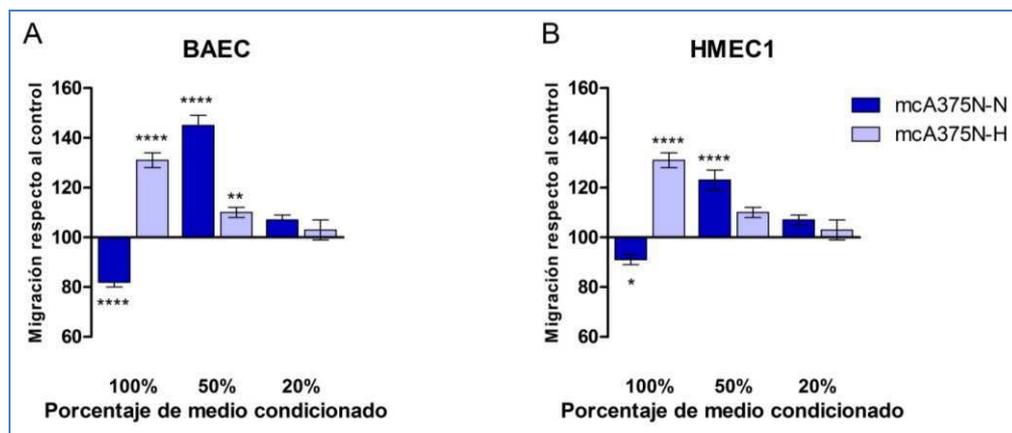


Figura 40 MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES HACIA VEGF EN MEDIO CONDICIONADO DE A375N EN NORMOXIA (mcA375N-N) E HIPOXIA (mcA375N-H). EL MEDIO CONDICIONADO EN NORMOXIA INHIBE LA MIGRACIÓN HACIA VEGF Y LAS DILUCIONES REVIERTEN ESTE EFECTO EN CÉLULAS BAE (A) Y EN HMEC1 (B). LAS CÉLULAS ENDOTELIALES FUERON SUSPENDIDAS EN MEDIO CONDICIONADO EN LAS DIFERENTES CONDICIONES Y DILUCIONES. SE ANALIZARON 3 ENSAYOS MEDIANTE ANOVA DE DOS FACTORES CON POST-TEST DE BONFERRONI CON RESPECTO AL CALIBRADOR EN NORMOXIA (*p<0.05; **p<0.01; ****p<0.001).

Inducción de la diferenciación endotelial con medios condicionados por células de melanoma.

Como vimos en los apartados anteriores el medio condicionado por las líneas de melanoma con diferentes niveles de expresión de SPARC, era capaz de modular la migración hacia distintos factores de manera dependiente de la concentración de SPARC, hecho que se correlaciona con el efecto de SPARC purificado.

Para determinar si los efectos sobre la angiogénesis también ocurrían en los eventos de diferenciación, así como se demostró en los ensayos de tubulogénesis donde la proteína purificada es pro-diferenciadora, ensayamos la formación de túbulos utilizando los medios condicionados por líneas de melanoma con distintos niveles de expresión de SPARC, al igual que en los ensayos de la migración del apartado anterior.

Observamos que los medios condicionados por células con expresión disminuida de SPARC por efecto de la expresión de ARNi fueron capaces de estimular la formación de túbulos de forma inversamente proporcional a los niveles de SPARC presentes. Los medios con una disminución de aproximadamente 20% , producen un aumento de casi tres veces en la formación de túbulos mientras que en los que se observa una disminución de la expresión de SPARC del 80% encontramos un aumento de casi 5 veces con respecto a la línea control, sea esta originada de IIB-Mel Les (Lblast) o A375N (ABlast) (Figura 41).

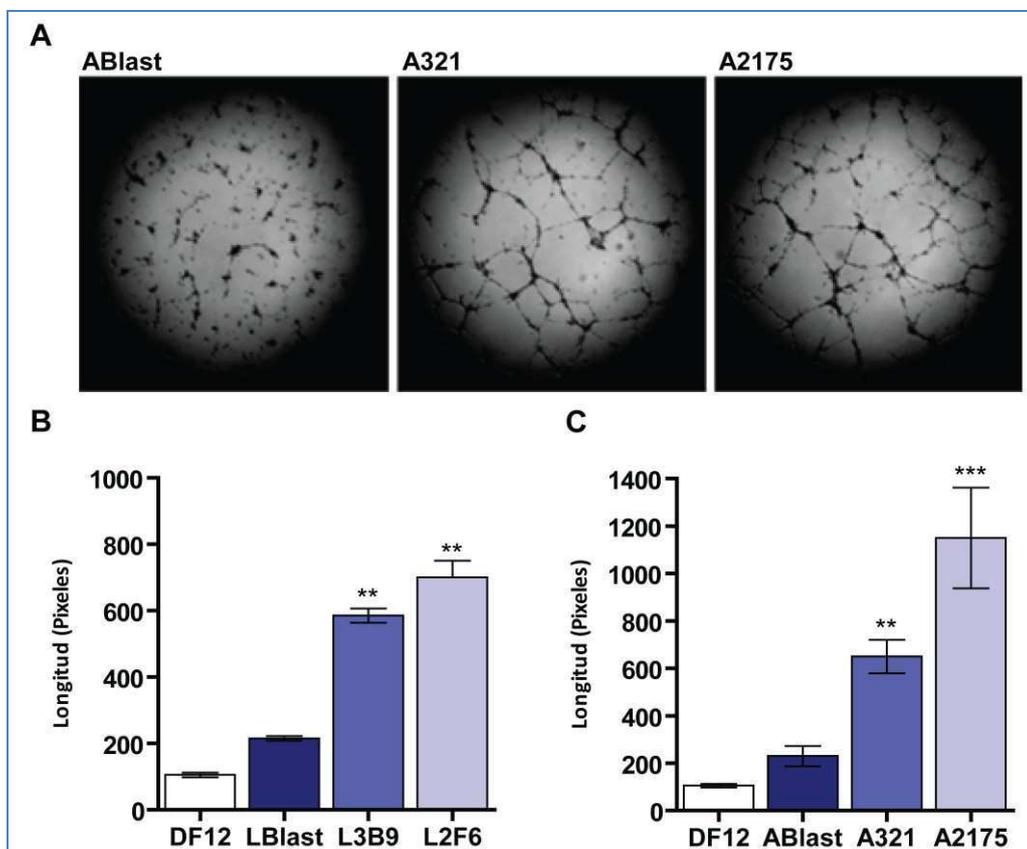


Figura 41 LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS DE MELANOMA CON DISTINTOS NIVELES DE SPARC ESTIMULAN LA FORMACIÓN DE TÚBULOS. CÉLULAS BAE FUERON SEMBRADAS SOBRE MATRIGEL EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS IIB-MEL LES (Lblast, L3B9, L2F6) Y A375N (ABlast, A321, A2175) CON SPARC INTERFERIDO MEDIANTE ARNi. A) TÚBULOS EN MATRIGEL A LAS 8HS. CON MEDIOS CONDICIONADOS. B-C) SE MIDió LA LONGITUD DE LOS TÚBULOS FORMADOS A LAS 8HS, SE NORMALIZó CON RESPECTO A AL MEDIO DMEM/F12 (DF12) Y SE ANALIZó MEDIANTE ANOVA DE UN FACTOR, CON DATOS PAREADOS POR EXPERIMENTOS. SE REALIZó UN POST-TEST DE BONFERRONI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Cabe destacar que los resultados obtenidos con los medios condicionados son ligeramente contrarios a los observados con la proteína nativa purificada de medio condicionado de melanoma. Por este motivo decidimos establecer si la presencia de otros factores podía explicar estas diferencias.

Expresión de VEGF en medio condicionado

Uno de los primeros factores angiogénicos descubiertos en el VEGF. Este factor posee una gran capacidad de inducir la formación de túbulos y como ya hemos visto está íntimamente relacionado con SPARC. Por ello determinamos los niveles de VEGF presente en los medios condicionados utilizados para los ensayos de diferenciación mediante medición semi-cuantitativa por Dot-blot (Figura 42).

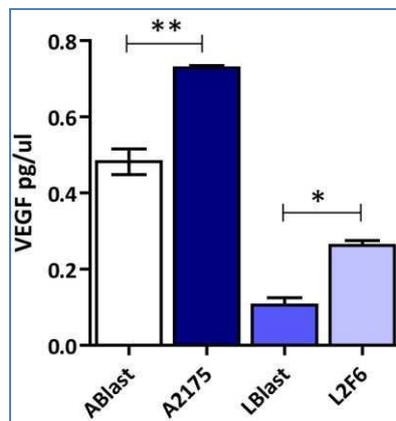


Figura 42 CONCENTRACIÓN DE VEGF EN MEDIOS CONDICIONADOS. SE MIDió SEMI-CUANTITATIVAMENTE MEDIANTE DOT-BLOT LA CONCENTRACIÓN DE VEGF EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR LAS CÉLULAS DE MELANOMA CON SPARC MODULADO.

Determinamos que los medios condicionados obtenidos de clones con la expresión de SPARC disminuida poseen niveles elevados de VEGF con respecto al control que en el caso de células L2F6 llega casi a duplicar los niveles. En el medio de ABlast encontramos una concentración media de 0,48pg/ul de VEGF mientras que en el clon A2175, con una reducción del 60% en la expresión de SPARC la concentración

aumenta a 0,73pg/ul. Este fenómeno también se observa en el medio condicionado por Lblast, donde encontramos una concentración de 0,10pg/ul mientras que en L2F6 (80% de reducción de SPARC) la concentración es de 0,26pg/ul. En ambos casos la disminución de SPARC mediante ARNi produjo un aumento del 50% al 260% en la concentración de VEGF secretada al medio de cultivo.

Como control de la expresión de VEGF se realizó un condicionamiento de medio en condiciones de hipoxia. En estas condiciones, la concentración de VEGF en medios condicionados de Ablast y Lblast en hipoxia, fue de 1.2 y 2.8pg/ul respectivamente.

Aunque los valores absolutos de la concentración en los clones con disminución de SPARC fue menor que la de las líneas en hipoxia, se encuentran aumentados con respecto a sus controles en normoxia. Es decir, la disminución forzada de la expresión de SPARC induce un aumento en los niveles de expresión de VEGF.

Bloqueo de VEGF/SPARC

La siguiente pregunta fue demostrar si el aumento en la formación de túbulos inducida por medios condicionados de melanoma con expresión disminuida de SPARC era el resultado del aumento de los niveles de VEGF. Para ello se sembraron células endoteliales sobre matrigel en medio condicionado por células de melanoma con diferentes niveles de expresión de SPARC pre-incubados con anticuerpos neutralizantes (Figura 43).

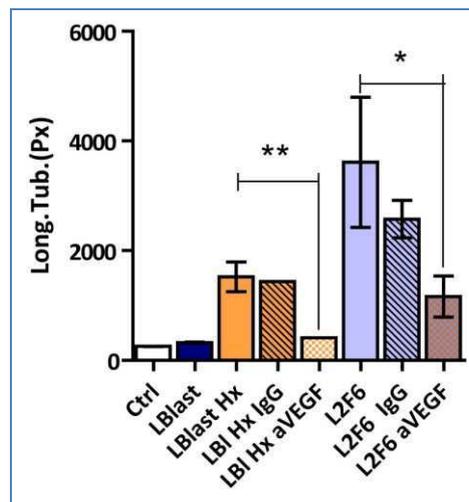


Figura 43 VEGF es el responsable de la diferenciación en los medios con SPARC reducido. CÉLULAS BAE FUERON SEMBRADAS SOBRE MATRIGEL EN MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS IIB-MEL LES (Lblast, L2F6) CON SPARC INTERFERIDO

MEDIANTE ARNi. SE CUANTIFICARON LOS TÚBULOS EN MATRIGEL A LAS 8HS. CON MEDIOS CONDICIONADOS TRATADOS CON ANTICUERPOS NEUTRALIZANTE CONTRA VEGF (aVEGF) O SU CONTROL DE ISOTIPO (IgG). SE MIDió LA LONGITUD DE LOS TÚBULOS FORMADOS A LAS 8HS, SE NORMALIZó CON RESPECTO A AL MEDIO DMEM/F12 (DF12) Y SE ANALIZó MEDIANTE ANOVA DE UN FACTOR, CON DATOS PAREADOS POR EXPERIMENTOS. SE REALIZó UN POST-TEST DE BONFERRONI (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

El medio con mayor concentración de SPARC induce muy poca formación de túbulos en normoxia (LBlast). Sin embargo, el medio condicionado de LBlast obtenido en hipoxia (LBlast Hx) fue capaz de inducir la formación de túbulos. Dicha inducción fue completamente bloqueada con la incubación previa con anticuerpos neutralizantes contra VEGF (LbI Hx aVEGF); la incubación con un anticuerpo control de isotipo no produce ningún efecto (LbI Hx IgG). Como ya se había demostrado anteriormente (Figura 41) el medio condicionado por la línea L2F6, que posee SPARC disminuido, es un gran estimulador de la tubulogénesis; dicho estímulo fue significativamente reducido en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-VEGF (L2F6 aVEGF).

En ambos casos la inducción de la tubulogénesis por el medio con menor concentración de SPARC, ya sea mediante ARNi como en L2F6 o por hipoxia como en LBlast, pudo ser revertida mediante bloqueo con anticuerpos neutralizantes de VEGF. Cabe resaltar que el medio condicionado por células L2F6, a pesar de tener menor concentración de VEGF comparado con el de LBlast en hipoxia, es un fuerte inductor de formación de túbulos y que dicho efecto no es bloqueado a niveles basales por el anticuerpo neutralizante anti-VEGF, indicando la existencia de factores adicionales promotores de la tubulogénesis.

Discusión

Discusión

SPARC y efectos sobre células del estroma.

En este capítulo inicialmente demostramos que la proteína nativa obtenida de células de melanoma y las proteínas recombinantes obtenidas de diversas fuentes esencialmente poseen las mismas capacidades y efectos sobre el estiramiento (Figura 3), la migración (Figura 4) y la capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales (Figura 5). Estos resultados fueron extendidos utilizando la proteína obtenida de células de melanoma donde se mostró además la inhibición de la proliferación de células endoteliales normales (Figura 7) y transformadas (Figura 8) así como un efecto bifásico sobre fibroblastos independientemente de si estos expresan o no SPARC (Figura 9).

Las evidencias de que las diferentes especies de SPARC mostraron la misma actividad en un sistema ampliamente aceptado como lo es la inhibición del estiramiento, proliferación y migración de células BAE sugiere que el efecto de SPARC es independiente de la fuente de origen. SPARC ha sido purificada de hueso humano (Kaufmann, Muller et al. 2004) y murino (Funk and Sage 1991), plaquetas (Kelm and Mann 1990) y expresada como proteína recombinante de células de insectos (Sf9) (Bradshaw, Bassuk et al. 2000) y mamíferas (Chlenski, Liu et al. 2006) y en cada caso existen pequeñas diferencias en la glicosilación. Particularmente, la N-glicosilación diferencial observada en las diferentes especies modifica la afinidad de SPARC por el colágeno tipo I (Kaufmann, Muller et al. 2004) y se había postulado que este evento posiblemente modificara el efecto de SPARC sobre las células blanco. Sin embargo y a pesar de que las variaciones en la glicosilación de las diferentes especies utilizadas podrían explicar las pequeñas diferencias, todas las variantes fueron activas como proteínas anti-adhesivas, anti-proliferativas y anti-migratorias. Es de destacar que la “etiqueta” de seis histidinas C-terminal (rh-SPARC-6xH) fue el único motivo que generó una actividad en detrimento de la anti-proliferativa en comparación con el resto de las especies. Dado que trabajos previos del grupo habían demostrado que la estructura secundaria y terciaria de esta especie es virtualmente idéntica a otras

preparaciones, podemos suponer que esos aminoácidos extras podrían interferir con la función del dominio C-terminal de SPARC, el cual se determinó como crítico para la inhibición de la proliferación endotelial utilizando péptidos de la secuencia 254-273(Motamed, Blake et al. 2003),(Sage, Reed et al. 2003).

El análisis de los efectos de SPARC sobre la proliferación de diversas líneas endoteliales reveló que la inhibición de la entrada a fase S por SPARC es también evidente en células transformadas por el antígeno T grande del virus SV40. El mecanismo por el cual SPARC inhibe la proliferación ha sido explorado previamente. En esos estudios, el efecto anti-proliferativo fue asociado a la alteración de la señalización de diversos factores de crecimiento a través de diferentes mecanismos que incluyen el secuestro de VEGF(Kupprion, Motamed et al. 1998), la interacción con los receptores de PDGF(Raines, Lane et al. 1992), la cooperación con TGF β en la activación de la vía de SMAD2/3(Schiemann, Neil et al. 2003) y efectos indirectos sobre las vías de IGF(Francki, Motamed et al. 2003) y FGFb(Motamed, Blake et al. 2003). Inclusive se ha asociado la inhibición de MAPK, la inhibición de CDK2 (kinasa 2 dependiente de ciclina E) y ciclina A y el mantenimiento de la activación de RB con la inhibición mediada por SPARC de la proliferación dependiente de PDGF(Motamed, Funk et al. 2002).

Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que los efectos de SPARC sobre la proliferación endotelial pueden operar a través de múltiples vías que incluyen pero no están restringidas a la hiper-fosforilación de RB. De hecho, se ha mostrado que el antígeno T grande de SV40 inactiva tanto RB como p53(Ahuja, Saenz-Robles et al. 2005) sugiriendo que SPARC podría inhibir la entrada a fase S aún en ausencia de estos potentes anti-oncogenes.

El efecto de SPARC sobre el ciclo celular endotelial podría depender de un receptor aún no identificado(Bradshaw, Francki et al. 1999) o de su interacción con otros componentes de la MEC como los colágenos, los cuales a su vez podrían modular la señalización extracelular que incluye la unión de diversos factores a la matriz de colágeno(Ramirez and Rifkin 2003). Posiblemente los diferentes efectos de SPARC

sobre la proliferación de células endoteliales, fibroblastos y tumorales podrían afectar diferentes vías de señalización en cada tipo celular.

SPARC y resistencia a quimioterapéuticos en células tumorales

En contraste a los efectos sobre las células endoteliales, SPARC no afectó de manera significativa la proliferación de las células derivadas de diferentes tumores (Figura 11 y Figura 12), aunque al menos en melanoma esta resistencia puede ser revertida mediante el bloqueo de la expresión endógena de SPARC (Figura 14).

Los resultados de los ensayos de proliferación de células tumorales derivadas de melanoma, glioma y colon en presencia de SPARC nos muestran que todas las líneas probadas son resistentes al tratamiento con la proteína, ya que el agregado exógeno fue incapaz de afectar la proliferación. Estos datos se agregan a los obtenidos en trabajos de nuestro grupo donde se utilizaron otras líneas derivadas de melanoma, cáncer de colon y metástasis en pulmón con similares resultados(Prada 2007).

Al analizar la bibliografía encontramos que los datos reportados respecto del efecto sobre la proliferación de células tumorales por parte de SPARC son mucho más complejos y controvertidos. Tanto la hiperexpresión como la disminución en los niveles de SPARC no tienen efectos reportados sobre la proliferación de líneas de melanoma humano, de neuroblastoma y de cáncer de mama(Chlenski, Liu et al. 2002),(Koblinski, Kaplan-Singer et al. 2005),(Ledda, Bravo et al. 1997). Por otro lado, el aumento de SPARC en células de glioma humano produce una importante inhibición de la proliferación de la línea de glioma humano U-87 *in vivo* e *in vitro*(Rempel, Golembieski et al. 2001). El agregado de SPARC exógeno sólo fue descrito como inhibidor de la proliferación en dos líneas de cáncer de ovario(Said and Motamed 2005),(Yiu, Chan et al. 2001). En dichos casos la inhibición de la proliferación fue acompañada por un incremento en la apoptosis inducida por SPARC.

En nuestro caso es interesante agregar que al inhibir la expresión de SPARC en las células de melanoma estas se vuelven sensibles al agregado exógeno. Lo que

sugiere que durante el progreso tumoral, SPARC es una proteína que podría ser perjudicial para las células epiteliales tumorales, pero es necesaria como señal para las células estromales. Por lo tanto en aquellos tumores donde las células epiteliales son productoras de SPARC, éstas deben desarrollar un mecanismo de resistencia a la inhibición de la proliferación por la presencia de la proteína. Este fenómeno nos permite explicar la compartimentalización observada en muchos tumores, donde existe una sobre-expresión intra- y peritumoral en el estroma pero una expresión menor o inclusive inhibición en las células epiteliales tumorales (Arnold and Brekken 2009). Este efecto se observa en cáncer de mama, colorrectal, de pulmón, ovario, páncreas y de endometrio (Barth, Moll et al. 2005), (Iacobuzio-Donahue, Argani et al. 2002), (Paley, Goff et al. 2000), (Rodríguez-Jimenez, Caldes et al. 2007), (Sato, Fukushima et al. 2003), (Suzuki, Hao et al. 2005), (Yang, Kang et al. 2007), (Yiu, Chan et al. 2001). Es de notar que aunque la expresión se encuentre disminuido, las células epiteliales tumorales pueden actuar parácrinamente estimulando la expresión de SPARC en las células del estroma en el que está embebido (Sato, Fukushima et al. 2003). Las razones de esta compleja regulación están siendo estudiadas en el laboratorio mediante estrategias adicionales como el uso de ratones null para SPARC.

Es interesante notar que la insensibilidad a SPARC es específica y dependiente de SPARC, ya que al inhibir la expresión en células de melanoma se restaura la inhibición de la proliferación por la presencia de la proteína (Figura 14). La insensibilidad a los efectos antiproliferativos de SPARC, ha sido recientemente descrito en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (AML). En esta enfermedad el rearreglo del gen MLL (gen de la enzima Histona metiltransferasa HRX) genera la represión de SPARC, entre varios genes. Notablemente, el agregado exógeno de la proteína selectivamente disminuye el crecimiento de las líneas que poseen rearreglos en el gen MLL y no expresan SPARC, mediante la inhibición de la progresión del ciclo de la fase G1 a la S (Dimartino, Lacayo et al. 2006).

Por otro lado, esta sensibilización no responde a un mecanismo celular generalizado o a la activación de un inhibidor que actúe de manera dominante ya que el

tratamiento con un agente antimetabolito antagonista de la pirimidina, como el 5FU, no genera ningún efecto inhibitorio y esto es independiente de los niveles de expresión de SPARC (Figura 15). Aún más interesante es el hecho de que, a pesar de la gran resistencia intrínseca de las células de melanoma a la inhibición inducida por cisplatino, el bloqueo de la expresión de SPARC aumenta dicha resistencia (Figura 16). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en cáncer de colon, donde se observa la expresión de SPARC solo en tejido normal particularmente en las células mesenquimales y del estroma (Lussier, Sodek et al. 2001). Esta inhibición de la expresión tumoral está relacionada con la resistencia a la quimioterapia como ha sido demostrada en células resistentes derivadas de cáncer de colon MIP101, donde la re-expresión de SPARC restaura la sensibilidad a la quimioterapia y lleva a la regresión de los tumores inoculados en ratones (Tai, Dai et al. 2005). En relación a la resistencia a quimioterapéuticos, recientemente se ha demostrado que en leucemia mieloide crónica (CML) el tratamiento con el inhibidor de BCR-ABL, Imatinib, produce un aumento de la expresión de SPARC. Este aumento está relacionado con la resistencia a Imatinib. Es muy interesante notar que al ser bloqueada esta expresión, se restaura la sensibilidad a los inhibidores. Además, la sobreexpresión forzada de SPARC promueve la viabilidad celular así como la protección contra la apoptosis mediada por el Imatinib. Notablemente este efecto protector requiere la retención intracelular de SPARC, disminuyendo la secreción al medio de cultivo. Este aumento en la expresión y retención intracelular de SPARC está ligado a la activación de la vía de las quinasas Fyn/ERK (Fenouille, Puissant et al. 2010).

Por el contrario, en pacientes con linfoma B difuso de células grandes tratados con la terapia convencional (CHOP) se ha asociado la expresión de SPARC con mayor supervivencia y la alta expresión con la supervivencia libre de enfermedad (Meyer, Fu et al. 2011). Toda esta plétora de mecanismos de regulación de respuesta a fármacos novedales que involucran a SPARC es el centro de fuertes estudios de diferentes grupos.

SPARC y sus efectos en la migración en células de melanoma.

La resistencia a SPARC también fue observada a nivel de migración celular. SPARC inhibe la migración quimio-quinética solo en células con expresión disminuida (Figura 17). Aunque el rol de SPARC como factor quimio-táctico es controvertido (De, Chen et al. 2003), se ha reportado que la presencia de la proteína dispara mecanismos estimulantes de la migración no direccional sobre células de cáncer de mama (Dianalee A. Campo McKnight 2005). Sin embargo, también se ha reportado que SPARC inhibe la migración de células de cáncer de ovario inducida por células mesoteliales a través de un mecanismo mediado por ácido lisofosfatídico (Said, Najwer et al. 2007). Posiblemente este comportamiento contradictorio sea debido a diferencias en los receptores utilizados por SPARC para ejercer su función. En este sentido se ha sugerido que SPARC podría unirse a la membrana de células endoteliales (Said, Najwer et al. 2007) así como a las de cáncer de mama (Gradishar 2006) por lo cual su efecto en la migración podría depender de su capacidad de unirse a este receptor aún no identificado.

Por otro lado los resultados obtenidos con las células de melanoma podrían indicar que los niveles o la disponibilidad del receptor de SPARC estarían modulados por los niveles de SPARC. Podemos asumir que la regulación coordinada de SPARC y su receptor putativo en las células tumorales también podrían explicar la incapacidad de regular el ciclo celular (Figura 11). Alternativamente existe la posibilidad de que las diferencias entre células sean debidas a la expresión diferencial de proteasas con capacidad de clivar o degradar SPARC (Ledda, Bravo et al. 1997), (Sage, Reed et al. 2003). Sin embargo, el análisis mediante western blot del clivaje de SPARC exógeno en cultivos de fibroblastos, células endoteliales y tumorales es independiente de la expresión endógena de SPARC y no mostró diferencias sugiriendo que el clivaje no es el mecanismo mediante el cual las células malignas se vuelven resistentes a la presencia de SPARC (Figura 18).

Por otro lado, la cuestión de que si la sobreexpresión de SPARC puede llevar a la ocupación completa del receptor o si puede inducir eventos de señalización que afectan la disponibilidad del receptor permanece abierta. La disminución de la

expresión de SPARC puede inducir cambios cuali-cuantitativos en la expresión de otras proteínas que pueden estar involucradas en el mecanismo de la resistencia a SPARC. En este sentido, otros trabajos de nuestro laboratorio realizaron el análisis proteómico de las proteínas secretadas (secretoma) en células de melanoma con disminución de SPARC donde se encontraron al menos 30 proteínas diferenciales sobre-expresadas y 36 disminuidas (Girotti et al, enviado) relacionadas en su mayoría con la transición epitelio-mesenquimal. Aunque este trabajo estaba basado en el secretoma de melanoma, estas diferencias podrían indicar que los cambios en la expresión de SPARC concomitantemente modifica la expresión de varias proteínas que pueden modular la capacidad de las células de melanoma para crecer en presencia de niveles elevados de SPARC(Sosa, Girotti et al. 2007). Esta idea es coincidente con trabajos sobre la sobreexpresión de SPARC en células de cáncer de mama donde se ha mostrado que la capacidad metastásica está asociada a SPARC solo cuando se la coselecciona junto a otras proteínas(Minn, Gupta et al. 2005).

Sobre este tema, es importante agregar que en otra serie de experimentos realizados por nuestro grupo se demostró que la modulación en los niveles endógenos de SPARC en células de melanoma, pero no los niveles producidos por el estroma tumoral ni los cambios generados en el ambiente (aumento de microvasculatura, reclutamiento de fibroblastos y producción masiva de MEC) inducidos por la proteína, afectan el crecimiento del melanoma humano. Esto nos induce a pensar que la hiperexpresión de SPARC por parte de las células y tejidos tumorales funcionaría como una estrategia para evadir el control que ejerce el huésped contra las células malignas. Podríamos especular que esta resistencia estaría mediada por la modulación de los niveles de un putativo receptor para SPARC, causada por los niveles de producción endógenos de SPARC. Aunque la existencia de dicho receptor no pudo ser probada ni por nosotros ni por otros grupos, hay evidencias de que SPARC se une a la superficie celular(Gradishar 2006),(Yost and Sage 1993).

SPARC como modulador de la migración y diferenciación de células endoteliales.

SPARC y migración endotelial.

Los estudios realizados en esta sección nos señalan un rol central de SPARC en los eventos tempranos de la angiogénesis. Hemos encontrado que SPARC es un componente clave que controla la migración de las células endoteliales, actuando en su microambiente como modulador de la migración hacia dos de los factores angiogénicos más importantes, el FGFb y el VEGF. En este escenario complejo demostramos que SPARC en concentraciones de 1 a 2ug/mL (bajas concentraciones) en el microambiente endotelial estimula la migración de células endoteliales hacia FGFb, mientras que la inhibe a concentraciones superiores a 2-5ug/mL (altas concentraciones, Figura 20 y Figura 21) independientemente de la matriz utilizada (Figura 22). Además, estimula la migración hacia VEGF hasta una concentración de 5ug/mL, perdiendo efecto a concentraciones superiores (Figura 23).

El efecto encontrado sobre la migración hacia FGFb podría ser explicado por la presencia de al menos dos receptores y/o con concomitante activación de vías alternativas a cada concentración. Sumado al hecho de que SPARC no posee actividad quimiotáctica *per se* podemos suponer que a altas concentraciones promueve el despegado celular y por lo tanto el aislamiento de las señales externas mientras que a niveles menores promueve una estructura del citoesqueleto más dinámica y por lo tanto más migratoria. La participación de SPARC en el estado de adherencia celular fue uno de los puntos más estudiados en la biología de esta proteína (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998; Murphy-Ullrich et al., 2006) y de hecho fue uno de los criterios utilizados en esta tesis para comparar las especies de SPARC obtenidas de diversas fuentes. El proceso celular de antiadhesión o despegado es potencialmente importante para que una célula pueda participar en procesos morfogénicos normales como la respuesta a injuria o procesos patológicos como la progresión tumoral (Murphy-Ullrich 2001) . Utilizando como guía el modelo de estados de adhesión de Murphy-Ullrich, podemos ver cómo es posible generar

estados bifásicos en función de la concentración de SPARC o cualquier otra proteína matricelular que se esté estudiando.

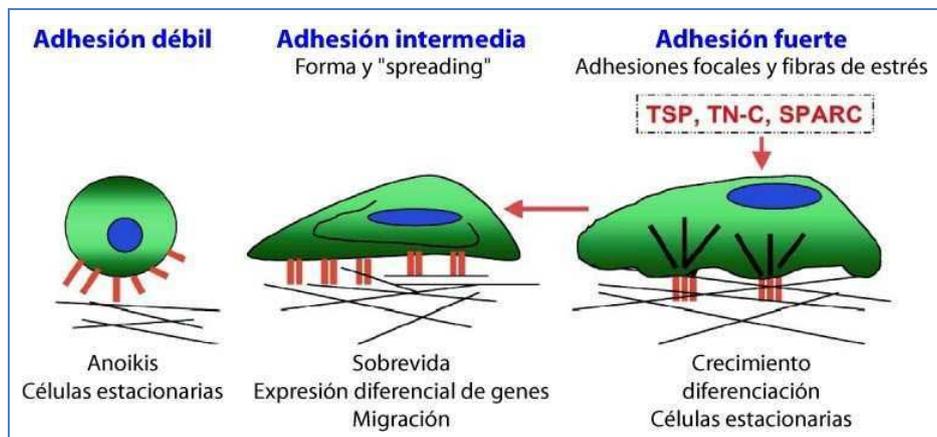


Figura 44 ETAPAS DE LA ADHESIÓN CELULAR E INDUCCIÓN DEL ESTADO DE ADHESIÓN INTERMEDIA POR LAS PROTEÍNAS MATRICELULARES. ADAPTADO DE MURPHY-ULLRICH(MURPHY-ULLRICH 2001).

La disminución en los niveles de SPARC generaría un estado de adhesión fuerte generalmente relacionado con la quiescencia. Al aumentar los niveles de SPARC estaríamos en un primer momento favoreciendo un estado de adhesión intermedia capaz de mantener la viabilidad celular, dejando que el ambiente estimule la proliferación o la migración de la célula. A medida que la concentración de SPARC aumenta, se estaría induciendo un despegado celular masivo en donde la sobrevida y destino celular estaría en riesgo por el gatillado de la apoptosis relacionada al estado de adhesión (anoikis) (tal cual fue descrito como rol de SPARC en cáncer de ovario (REF) o podrían comenzar otros procesos de diferenciación estableciendo un nuevo estado. En este sentido, resultados propios que no forman parte de esta tesis ya que aún se encuentran en escritura, indican que al menos en células de melanoma, estos estados proadhesivos vs proquinéticos estarían mediados por las pequeñas GTPasas Rho y Rac (Salvatierra y col., en preparación).

Podemos también especular que ocurre el mismo efecto de adhesión intermedia en el aumento de la migración hacia VEGF dependiente de la concentración de SPARC en el microambiente endotelial (Figura 23). Notablemente, el efecto disminuye dramáticamente al sobrepasar los 5ug/mL de SPARC. Esta migración disminuida

puede ser explicada por la unión y bloqueo de la actividad de VEGF por SPARC. Se ha demostrado que existe una interacción directa entre SPARC y VEGF. Un péptido, denominado 4.2, correspondiente a la región C-terminal de SPARC se une a VEGF e inhibe la proliferación estimulada por VEGF en células endoteliales mediante el bloqueo de la unión del VEGF al receptor VEGFR1. Esta interacción es específica, ya que el VEGFR2 se encontró fosforilado y activo en presencia de SPARC(Kupprion, Motamed et al. 1998). Esto sugiere que SPARC está actuando mediante el bloqueo selectivo del receptor tipo 1 y además que la acción quimioattractante del VEGF es dependiente del mismo.

SPARC y diferenciación endotelial

Uno de los resultados más interesantes de esta tesis es la determinación de que SPARC es un fuerte promotor de la diferenciación endotelial. Es interesante notar que la incubación de células endoteliales arrestadas sobre una matriz similar a la membrana basal generada por células epiteliales (Matrigel) en presencia de concentraciones crecientes de SPARC induce una rápida diferenciación y formación de túbulos (Figura 27). Estudios de hace casi dos décadas demostraron la acción de los astrocitos en la diferenciación de los capilares del sistema nervioso central(Risau 1991). En este evento la matriz extracelular tiene un rol muy importante y la combinación de SPARC, Fibronectina, Trombospondina I y Colágeno IV es inductora y promotora de la diferenciación. Las tres últimas son secretadas tanto por los astrocitos como por las células endoteliales, lo que hace suponer que su rol prioritario es estructural, sin embargo SPARC es el único factor secretado solo por los astrocitos(Webersinke, Bauer et al. 1992). Esto nos estaría señalando un rol diferencial de SPARC en los eventos de señalización en la diferenciación endotelial.

Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual SPARC es capaz de inducir la diferenciación endotelial hacia la formación de túbulos. En este sentido en nuestro laboratorio estamos realizando ensayos de genómica en la búsqueda de genes que respondan específicamente a diferentes concentraciones de SPARC, sobre los cuales se analizarán las vías comunes entre ellos activadas para cada condición.

SPARC secretada por células de melanoma y su efecto sobre las células endoteliales

En esta tesis demostramos que el medio secretado por células que expresan SPARC inhibe la migración de las células endoteliales hacia FGFb (Figura 28, Figura 30, Figura 31 y Figura 32). Es interesante notar que el efecto inhibitorio se revierte, convirtiéndose en estimulador al diluir el medio condicionado y es completamente dependiente de la presencia de SPARC ya que al bloquear con anticuerpos específicos se restaura la migración basal (Figura 28). Uno de los hechos más sorprendentes encontrados en esta tesis es la posibilidad de generar el mismo efecto inhibitorio/estimulador únicamente con la expresión forzada de SPARC en células de cáncer de colon en respuesta tanto a FGFb como a VEGF como factores quimioattractantes (Figura 32). Por otro lado el hecho que el mismo efecto sea observado también en medio condicionado por fibroblastos (Figura 30) nos hace pensar en la importancia de las células del estroma así como en el fluido intersticial, el cual está presente en todos los tejidos del cuerpo incluyendo el tejido tumoral en sí mismo. Este líquido intersticial está compuesto por todos los metabolitos secretados por las células y que se encuentra en constante flujo desde el tumor hacia los vasos circundantes. Considerando que en muchos tipos de cánceres las células epiteliales tumorales o los fibroblastos asociados son los mayores productores de SPARC y la presión intersticial es más elevada que en el tejido normal (Shieh, Rozansky et al. 2011), podemos imaginar una situación donde el centro del tumor es la fuente de SPARC desde donde se genera un gradiente hacia los vasos sanguíneos y linfáticos circundante. Trabajos de otros autores demostraron niveles de $0,14 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{mL}$ de SPARC libre en suero humano de donantes voluntarios ($1,62 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mL}$ de SPARC en sangre total); en pacientes con melanoma la concentración sube significativamente a $0,61 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($2,02 \pm 1,02 \mu\text{g}/\text{mL}$ en sangre total) (Ikuta, Nakatsura et al. 2005); de allí la hipótesis altamente probable de la presencia de un gradiente de SPARC *in vivo* al cual las células endoteliales se deben enfrentar y que podría estar modulando su migración/diferenciación.

En este sentido en nuestros experimentos el medio completo estaría representando al microambiente tumoral (antimigratorio y prodiferenciación) y la dilución a la mitad podría estar representando una situación de transición promigratoria. Como se mencionó anteriormente aunque no hemos encontrados cuales son los mecanismos por los cuales SPARC está ejerciendo este efecto actualmente nos encontramos en la búsqueda de las vías de señalización involucradas.

Modulación de SPARC en hipoxia

Como vimos hasta acá, tiene que existir una regulación fina de SPARC de manera de poder modular la intensidad y los alcances del gradiente propuesto anteriormente. En los tumores frecuentemente existe una disminución en la concentración de oxígeno en comparación con los tejidos normales (Folkman 2002). La baja concentración de oxígeno, o hipoxia, activa al Factor Inducible por Hipoxia 1-alfa (HIF1a) que, en asociación con NFκB inducido por las señales inflamatorias de la necrosis, inducen un programa de expresión génica que a través de la expresión de distintos factores angiogénicos estimulan la angiogénesis y la formación de una vasculatura anormal asociada al tumor. En concordancia con resultados de otros grupos (Yunker, Schultz et al. 2006) encontramos que en melanoma también existe una correlación inversa entre la expresión de SPARC y la zonas de hipoxia (Figura 36). Notablemente esta correlación ocurre principalmente a nivel de arresto traduccional (Figura 34) sin correlación con cambios en la expresión génica (Figura 35). Sobre este punto es interesante notar que la expresión de SPARC está muy regulada a nivel traduccional. Esta regulación ha sido demostrada también en otro modelo completamente diferente, utilizando células de osteoligamento enfrentadas a diversos tratamientos de estrés oxidativo, térmico o proteotóxico. Frente a todos estos tratamientos la proteína disminuyó significativamente sin que los niveles del mensajero variaran (Sauk, Norris et al. 1991) apuntado a un rol de SPARC en los eventos inmediatos de reparación o restablecimiento de la normalidad luego de que el tejido se encuentra frente a una situación de estrés. Aunque aún no se conoce cuál es la función que estaría cumpliendo en esa situación.

En cáncer de ovario, SPARC por si solo es capaz de renormalizar el estroma tumoral y con esta normalización la progresión tumoral se detiene. Aunque esta normalización no es exactamente la misma a la que nos referíamos en el párrafo anterior es notable que ocurra un fenómeno fisiológico de estas características solo con la reexpresión de la proteína. Esta normalización está relacionada con la inactivación de la actividad del ácido lisofosfatídico (LPA) mediante el bloqueo de sus receptores, la disminución de la expresión de VEGF y del eje VEGF-integrinas-MMP.

Terapia Antiangiogénica

Es importante tener en cuenta que la angiogénesis es un proceso de múltiples pasos y SPARC podría facilitar sólo ciertos eventos claves en este proceso. Nuestros experimentos *in vitro* demuestran que para que SPARC posea un efecto promigratorio deben ocurrir condiciones precisas de concentración entre la proteína y otros factores, como el FGFb. En contraste, en trabajos previos de otros grupos, se ha encontrado que SPARC bloquea los efectos de FGFb *in vivo* en ensayos de insertos en córneas de rata (Chlenski, Liu et al. 2004). Podemos especular que estas discrepancias con nuestros resultados se deben que a los insertos estaban embebidos en 25ug/mL de SPARC y 50ng/mL de FGFb, condiciones que son muy desfavorables para la migración endotelial según los resultados obtenidos en esta tesis.

Como se mencionó previamente existe una asociación entre SPARC y VEGF relacionada con la hipoxia. Esta asociación está acompañada de la disminución de la expresión de VEGF por las células tumorales mediada por SPARC (Yunker, Schultz et al. 2006). Por el contrario, VEGF suprime la expresión de SPARC en las células endoteliales. En línea con nuestros resultados en melanoma (Figura 36) se ha demostrado en gliomas que las regiones necróticas, reconocidas como las más hipóxicas, poseen una alta expresión de VEGF y una muy baja de SPARC mientras que en las regiones infiltrantes existe una situación inversa con alta expresión de SPARC y baja de VEGF. Esta situación está relacionada con la creación de un ambiente facilitador de la angiogénesis que favorece el progreso tumoral. Esta

angiogénesis es el blanco de las terapias antiangiogénicas que atacan directamente a la vía estimulada por VEGF, ya sea mediante anticuerpos bloqueantes como Bevacizumab y Ranibizumab (Avastin; Genentech) o pequeñas moléculas inhibitoras de las quinasas relacionadas. Por ejemplo, Bevacizumab demostró poseer un efecto clínico en estudios de fase II en recidiva de glioblastoma de sobrevividas libres de enfermedad a 6 meses de 46 - 50% , comparado con el 21% del control histórico(Vredenburgh, Desjardins et al. 2007). Sin embargo, los ensayos preclínicos posteriores han demostrado que a pesar de la eficacia de la terapia con el anticuerpo anti-VEGF Bevacizumab en la normalización de la vasculatura tumoral, con consiguiente mejora en la respuesta a la quimio y radioterapia, los tumores eventualmente se tornan resistentes y adoptan un fenotipo altamente infiltrante e invasivo(Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004; Casanovas, Hicklin et al. 2005; Miller, Chap et al. 2005).

Notablemente se ha encontrado que el bloqueo de VEGF por Bevacizumab en modelos de glioma, induce la expresión de diversos genes relacionados con la invasividad incluyendo SPARC, MMP2, MMP9, MMP12 y TIMP1. Sumado a esto se encontró que uno de los genes con mayor aumento fue FGFb con lo cual el efecto antiangiogénico inicial de Bevacizumab se estaría perdiendo comenzando una nueva etapa de revascularización que puede superar a la inicial(Lucio-Eterovic, Piao et al. 2009)

La relación entre SPARC y VEGF también se observó en cáncer de colon. En el estroma tumoral existe una correlación negativa en la expresión de SPARC y VEGF y la densidad de la microvasculatura. En aquellos pacientes con menor expresión de SPARC en las células mesenquimales y del estroma tumoral, existe una mayor expresión de VEGF y una mayor densidad de microvasculatura asociada. Notablemente este fenómeno está asociado con una peor supervivencia general y tiempo libre de enfermedad, llevando a SPARC a ser postulado como un factor de mal pronóstico(Liang, Wang et al. 2010). Sin embargo, debemos tener en cuenta que los efectos de SPARC sobre la densidad de la microvasculatura es muy probable que dependa de la acción concertada junto a otras proteínas. En este sentido

existen estudios previos que demuestran que la sobreexpresión de SPARC en células tumorales HEK293, que normalmente expresan niveles indetectables de SPARC, provoca una reducción del 50% de la densidad microvascular en el tumor implantado(Liu, Tian et al. 2005). Sin embargo, trabajos de nuestro grupo demostraron que la sobreexpresión de SPARC en células de melanoma produce un aumento de tres veces de la microvasculatura peritumoral en los primeros días de la inoculación de las células tumorales(Prada, Benedetti et al. 2007). Esto sugiere que SPARC posee un efecto protumoral solo cuando se encuentra con otros efectores potenciando sus actividades tumorigénicas, que en este caso pueden estar presentes en células de melanoma pero no HEK293. Un efecto similar al demostrado en los trabajos de Minn y colaboradores donde demuestran que SPARC es un factor de virulencia en la metástasis de cáncer de mama en pulmón solo si también se expresa junto a MMP2 e IL13R α 2(Minn, Gupta et al. 2005).

En otro modelo de angiogénesis, donde también se muestra la actividad promigratoria de SPARC sobre células endoteliales, se propone que esta actividad está relacionada con el bloqueo de los efectos antiangiogénicos de VEGF-R1 en la neovascularización coroidea (NVC) inducido por lesión(Nozaki, Sakurai et al. 2006). Este efecto, que aparentemente depende del secuestro de VEGF-A, sería bloqueado por la inhibición de la fosforilación del VEGF-R1 inducida por SPARC predisponiendo a las células endoteliales a migrar(Kupprion, Motamed et al. 1998). Esto apoya la importancia de los cambios temporales y espaciales en los niveles de SPARC en el proceso angiogénico.

Dada la importancia de SPARC en la modulación del comportamiento de las células endoteliales descrita hasta aquí, es muy interesante pensar de qué modo esto ocurre en aquellos tumores que no expresan SPARC. En este sentido, un reporte que podría aclarar este punto es un estudio realizado en cáncer de pulmón de células no pequeñas (en inglés NSCLC)(Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2003) que reveló que este tipo de tumores que son esencialmente negativos para la expresión de SPARC poseen zonas hipóxicas donde se detecta expresión de SPARC producida por los fibroblastos periféricos al tumor. Esto sugiere que en los tumores negativos

para SPARC el estroma podría ser la fuente de SPARC que favorece los eventos proangiogénicos en las áreas hipóxicas. Aunque es incierto si los niveles detectados de SPARC es efectivamente promigratorio para las células endoteliales en el contexto de estos tumores es interesante resaltar que los peores pronósticos están fuertemente asociados con la capacidad del estroma tumoral de expresar SPARC. Estos datos nos hacen especular que SPARC podría ser un factor relevante cuyos niveles (fruto de la producción concertada o no de células epiteliales y las del estroma periférico) están finamente regulados en áreas hipóxicas para promover la vascularización.

Conclusión

Los resultados presentados en esta tesis arrojan luz sobre el rol de SPARC en el proceso angiogénico, demostrando que las discrepancias en el rol pro- o anti-angiogénico encontrados podrían deberse a diferencias en las concentraciones locales de SPARC que se generan teniendo a las células tumorales como fuente productora.

Nuestros datos avalan el posible rol central de SPARC en eventos angiogénicos tempranos. Hemos demostrado que SPARC es un componente clave en la red regulatoria que controla la migración y diferenciación endotelial. La concentración de SPARC en las inmediaciones de las células endoteliales modula la migración hacia bFGF así como hacia VEGF. Además de actuar sobre la células endoteliales modulando su comportamiento, SPARC también interacciona directamente con los factores quimiotácticos utilizados por el tumor para inducir la angiogénesis necesaria.

Esto demuestra un escenario complejo donde bajos niveles locales de SPARC favorecerían la migración endotelial inducida por otro factor angiogénico. Esto está evidenciado por los efectos opuestos y completamente dependiente de SPARC sobre la migración celular obtenidos con las diluciones seriadas de medios condicionados en condiciones de normoxia donde el medio condicionado por células productoras de SPARC disminuye el efecto de los quimio-atractantes pero al ser diluido al medio se convierte en un estimulador de la migración. Y este efecto es

completamente dependiente de SPARC, demostrados con células con expresión forzada.

En sentido inverso, los gradientes negativos de SPARC hacia las áreas tumorales hipóxicas serían utilizados por el tumor para redirigir la migración endotelial hacia estas zonas, promoviendo la vascularización de las zonas con menor tenor de oxígeno.

Es interesante recordar que SPARC por sí mismo no es capaz de alterar la migración endotelial pero puede generar una predisposición en ellas para este proceso. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la concentración de SPARC en contacto directo con las células endoteliales juega un rol importante en las capacidades migratorias de las células endoteliales. Posiblemente esto esté relacionado con la capacidad anti-adhesiva de SPARC; en presencia de niveles altos, se promueve el despegado celular y por lo tanto el aislamiento de las señales del ambiente. Niveles intermedios promoverían una estructura del citoesqueleto más dinámica, pro-migratoria. Considerando que la angiogénesis es un proceso con múltiples pasos, SPARC podría estar actuando de manera diferencial promoviendo o modulando algunos eventos del proceso. De hecho nuestros experimentos in vitro requieren una concentración y una localización precisa de SPARC para lograr condiciones promigratorias. En cualquier caso, cuando es una ventaja, SPARC podría promover la tumorigénesis y la metástasis a través de efectos positivos directos sobre la angiogénesis.

Dada la importancia de SPARC en la modulación de la señalización descrita hasta aquí, es muy interesante pensar que ocurre en aquellos tumores que no lo expresan. En los tumores donde las células epiteliales tumorales no expresan SPARC, generalmente el estroma es la fuente de SPARC que favorece los eventos proangiogénicos hacia las áreas hipóxicas. Aunque es incierto si los niveles detectados de SPARC son efectivamente promigratorios para las células endoteliales en el contexto de estos tumores es interesante resaltar que los peores pronósticos están fuertemente asociados con la capacidad del estroma tumoral de expresar SPARC. Estos datos nos hacen especular que SPARC podría ser un factor

relevante cuyos niveles están precisamente regulados en áreas hipóxicas para promover la vascularización.

Durante el desarrollo de esta tesis proponemos un escenario donde los niveles intermedios de SPARC solo existen en áreas confinadas de los tumores positivos para SPARC, para que en combinación con otros factores solubles pudiera ser central en los eventos iniciales de la angiogénesis (Figura 45).

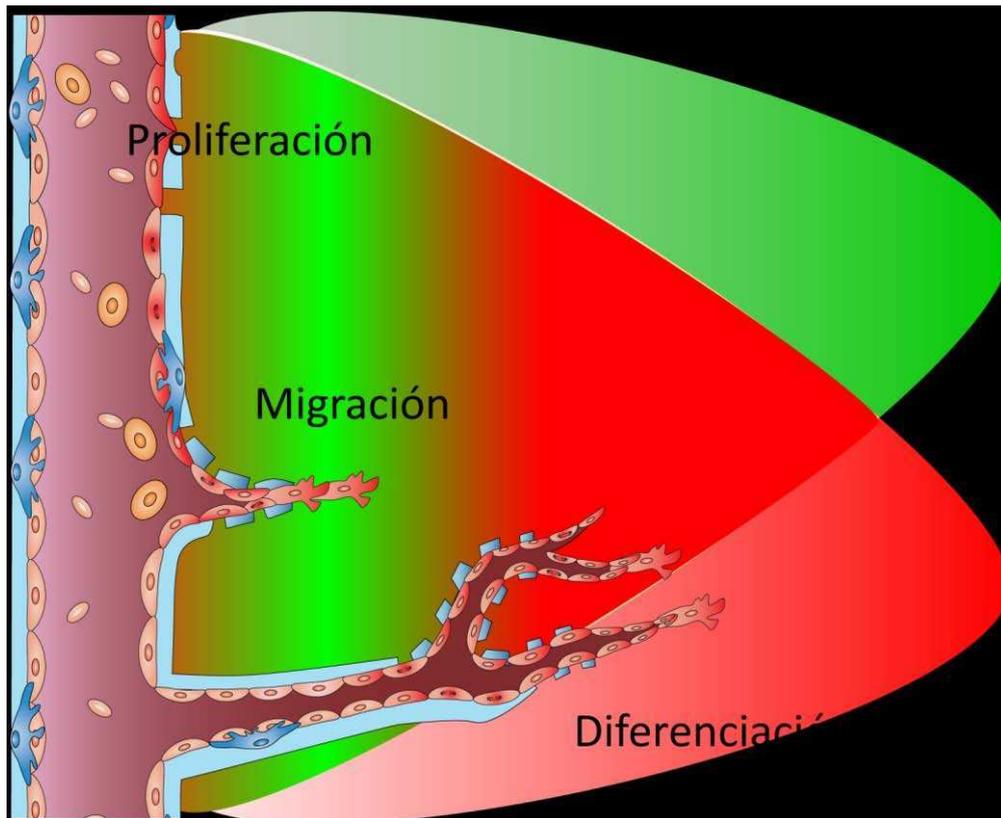


Figura 45 MODELO DE ACCIÓN DE SPARC. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SE ENCUENTRAN CON DISTINTAS CONCENTRACIONES LOCALES DE SPARC Y FACTORES ANGIOGÉNICOS, COMO VEGF. A BAJAS CONCENTRACIONES, ES DECIR ALEJADOS DEL TUMOR Y EN NORMOXIA, SPARC ACTÚA DE MANERA SINÉRGICA CON LOS FACTORES PRO-ANGIOGÉNICOS ESTIMULANDO LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN DEL ENDOTELIO HACIA LA FUENTE ANGIOGÉNICA. A MEDIDA QUE SE ACERCAN A LA FUENTE AUMENTA LA CONCENTRACIÓN LOCAL Y COMIENZAN LOS EFECTOS BLOQUEANTES DE SPARC SOBRE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN FAVORECIENDO LA FORMACIÓN DE VASOS FUNCIONALES.

Por esta razón, la contribución de SPARC al proceso de vascularización debería ser tomada en cuenta para el desarrollo de nuevas terapias antiangiogénicas o antiestromales.

Materiales y métodos

Materiales y reactivos

Descripción general de los materiales utilizados

Los reactivos generales de cultivo de células eucariotas fueron obtenidos de Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), parte de Invitrogen. En general, los reactivos químicos fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos secundarios y los reactivos de detección fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) y Dako Corporation (Carpinteria, CA, USA). El material de plástico necesario para el cultivo de las células eucariotas fue importado de las firmas Greiner (Frickenhausen, Germany) y Orange (Braine-l'Alleud, Bélgica), mientras que los filtros de policarbonato y las membranas para la esterilización de soluciones pertenecen a Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Las membranas de nylon, PVDF y nitrocelulosa para Southern y Northern Blot, micro-secuenciación y Western Blot respectivamente fueron obtenidas de la empresa GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA).

Las enzimas de restricción, enzimas de modificación y polimerasas de ADN y ARN fueron compradas en Invitrogen (Grand Island, NY, USA) y NEB (Ipswich, MA, USA).

Técnicas de cultivo celular eucariota y ensayos funcionales

Líneas celulares de mamífero y sus medios de cultivo

Las líneas celulares derivadas de melanomas humanos, A375N(Ledda, Bravo et al. 1997), SB2(Ledda, Bravo et al. 1997), MEL 888 (gentilmente cedidas por el laboratorio de la Doctora Estela Medrano, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX), IIB Mel Les(Kairiyama, Slavutsky et al. 1995) y IIB Mel IAN (Kairiyama, Slavutsky et al. 1995), fueron crecidas en Medio Melanoma (Mel). Cada litro de medio Mel está compuesto por: DMEM/F12, 3.6 g de HEPES, 1.2 g de NaHCO₃, 5 mg insulina, 17.6 g ácido ascórbico y 0.3 g de galactosa. Línea IIB-MEL-J (Kairiyama, Slavutsky et al. 1995)Un litro de Mel-J se compone de Mel suplementado con 5 ug de EGF, 500 ug de transferrina y 0.92 g adicionales de NaHCO₃.

Las líneas de melanoma derivadas de IIB-Mel Les con expresión modificada mediante anti-sentido de SPARC humano, L-CMV y L1D (Ledda, Adris et al. 1997) o ARN de interferencia L-Blast y L2F6 fueron mantenidas en medio Mel suplementado con 500ug/ml G418 (Invitrogen) y 5ug/ml de Blastidina (Invitrogen) respectivamente.

Las líneas de fibroblastos diploides normales WI38, HLF1, las carcinoma de colon LoVo y de glioma U-87 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células HCT116 fueron provistas por B. Volgestein, (John Hopkins Medical Institute, Baltimore, MD) crecidas en el medio correspondiente según las especificaciones del proveedor.

En el caso de las células de aorta bovina (BAEC, cedidas gentilmente por la Dra. Helene Sage (hsage@benaroyaresearch.org))(Sage, Vernon et al. 1989), microendoteliales humanas transformadas (HMEC1)(Ades, Candal et al. 1992), microendoteliales murinas transformadas (MEC1, cedidas gentilmente por I. Fidler, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX)(Ades, Candal et al. 1992) y endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se utilizó DMEM alta glucosa suplementado con 5% v/v de SFB inactivado por calor (Natocor, Córdoba, Argentina) y antibióticos (penicilina: 2.5 unidades/ml y estreptomina: 2.5 mg/ml).

Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C, en atmósfera saturada de agua y 5% CO₂ y regularmente fueron probados con Hoechst 1ug/ml para verificar la ausencia de contaminación con micoplasma.

Obtención de células endoteliales de cordón umbilical

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de bajo pasaje (4 a 10), fueron obtenidas según el procedimiento descrito por Jaffe y col(Jaffe, Nachman et al. 1973). Brevemente, el cordón umbilical fue limpiado con una gasa humedecida con etanol 70% y los extremos fueron cortados en forma estéril y lavados con etanol 70%. Una llave de tres vías fue colocada en uno de los extremos de la vena y atada firmemente con hilo de algodón humedecido en etanol 70%. Se lavó el lumen de la vena con solución Ringer lactato filtrado por 0,22 µm,

masajeando el cordón para eliminar coágulos. A continuación se introdujo una solución de 0,5 mg/ml colagenasa (C9722, Sigma) en Ringer lactato, filtrada por 0,22 μm , hasta que cayeron 2-3 gotas. El extremo opuesto a la llave de tres vías fue atado firmemente con hilo de algodón humedecido en etanol 70/ y 10 ml de solución de colagenasa fueron introducidos en la vena mientras se masajeaba el cordón. La llave de tres vías fue cerrada y el cordón incubado a 37°C por 20 min en una cámara húmeda estéril. El contenido del cordón fue vaciado en un tubo de 15 ml conteniendo 4 ml de RPMI1640 suplementado con 10/ SFB. Luego de centrifugar durante 10 min a 200 xg y TA, las células fueron resuspendidas en medio HUVEC y sembradas en botellas de cultivo previamente tratadas con gelatina. Luego de una incubación de 12 hs en estufa de cultivo, el medio fue removido y clarificado por centrifugación para remover las células no adherentes.

Medios condicionados

Los medios condicionados (MC) se obtuvieron a partir de células crecidas en monocapas semi-confluentes mantenidas en ausencia de suero. Las células fueron sembradas en medio completo. A las 24 hs se lavaron 3 veces con PBS y fueron mantenidas en ausencia de suero durante 12, 24 o 48 hs, según correspondiera. Seguidamente, los MC se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm en centrífuga clínica para eliminar las células no adheridas y los detritos remanentes. Finalmente, los MC así clarificados se trataron con inhibidores de serín-proteasas y metaloproteasas (PMSF 1 mM, EDTA 1 mM respectivamente) y se almacenaron alicuotados a -70 °C hasta su uso.

En caso de condicionamiento en hipoxia se utilizó una cámara incubadora modular (Billups-Rothenberg) durante 16 a 24hs a 0,1/ de concentración de O₂ a 37°C y el medio condicionado fue procesado de igual manera a la descripta anteriormente.

Arresto del ciclo celular

Para acumular las células en fase G1 del ciclo celular, todas las líneas fueron crecidas a confluencia en medio completo. Posteriormente se retiró el medio, se lavo dos veces con medio sin suero y fueron mantenidas en sus respectivos medios

sin suero (“Hambreadas”) por 48-72hs dependiendo del tipo celular. Para verificar el arresto las células fueron lavadas con PBS a 4°C, resuspendidas en 50 µl de PBS, y fijadas por agregado de 200 µl de etanol absoluto a 4°C con agitación. Luego de una incubación de 20 min. a 4°C, las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 600 xg durante 8 min. y resuspendidas en 50µl de PBS conteniendo 1 mg/ml RNAsa A. Luego de 30 min. de incubación a TA y en oscuridad se agregaron 75µl de yoduro de propidio (50µg/ml) y las muestras se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur System, Becton Dickinson).

Se verificó el arresto del ciclo mediante tinción con yoduro de propidio y recuento mediante FACS determinándose el tiempo requerido para obtener una población con más del 90% de las células en fase G1, sin aumento significativo de la fracción sub-G1 indicadora de apoptosis.

Ensayo de síntesis de ADN por incorporación de timidina

Se ensayó el efecto de SPARC sobre el ciclo celular mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada (Funk and Sage 1991). Para ello se tomaron 5×10^4 células arrestadas en G1 por hambreado y se las sembró en pocillo de 96 en medio completo con 2,5% de SFB en presencia de las concentraciones de hSPARC a analizar. Como control se agregó el mismo volumen de PBS de diálisis (ver Purificación de hSPARC). Se incubaron las células a 37°C con 5% CO₂ en estufa de cultivo y a las 20hs de sembrado se agregó 1µl de metil-³H-timidina (84Ci/mmol, PerkinElmer Life and Analytical Science, Inc) y se incubó 4hs mas.

A las 24hs de sembrado, se lavaron las células dos veces con 150 µl de PBS y se precipitó con tres cambios de 150µl de TCA en hielo. Se lavó con etanol absoluto en frío y se solubilizó en 150µl de NaOH 0,5M. Se mezclaron 100µl de esta solución en 2ml de líquido de centelleo (OptiPhase HiSafe 3, PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc.) y se contaron las cuentas por minutos en un contador de centelleo 1214 RackBeta (Wallac).

Se normalizaron los datos contra el promedio de los controles de PBS y se analizaron estadísticamente.

Ensayos de migración/invasión in vitro

La migración celular in vitro fue medida utilizando una cámara de Boyden modificada de 48 pocillos (Neuroprobe Inc.)(Funk and Sage 1993). Se utilizaron membranas de policarbonato con poros de 8µm de diámetro recubierta con 10µm/ml de Colágeno tipo I (SIGMA) en agua, 1µm/ml de Fibronectina humana (SIGMA) o polímero tipo Fibronectina (SIGMA) en PBS durante 12-16hs a 4°C con posterior secado al aire en esterilidad. Dicha membrana se colocó entre dos compartimientos estancos. En el compartimiento inferior se colocaron los factores atractantes o los controles en las concentraciones indicadas y en el compartimiento superior se colocaron 12.000 células en 50µl del medio de dilución (DMEM, 0,1/ovo-albumina o medio condicionado) por pocillo. En cada experimento se sembraron tres pocillos por condición. Se incubó 5hs a 37°C con 5% de CO₂ y se procedió a desarmar el dispositivo fijando la membrana con las células migradas en una solución de paraformaldehído 4% durante 5min. Posteriormente se removieron con hoja de rasurar las células remanentes de la cara superior y se tiñeron los núcleos de las células migradas con una solución de 1µg/ml Hoechst en PBS durante 20min. a temperatura ambiente.

Se montaron las membranas teñidas en solución de montaje (Gelvatol) entre dos portaobjetos y se tomaron imágenes digitales por pocillo capturadas con un sistema de cámara Olympus DP71 montado sobre un microscopio de fluorescencia con aumento de 20X. Obteniéndose 9 imágenes por tratamiento por experimento. Se contaron los núcleos enteros presentes en cada imagen mediante recuento automático utilizando el programa CellProfiler(Carpenter, Jones et al. 2006) con parámetros apropiados para dicho recuento (Ver Anexo).

Se realizó el análisis estadístico utilizando el promedio de células migradas por pocillo como variable.

Para determinar la concentración óptima de quimioatracción de células endoteliales, se realizó el ensayo de migración descrito utilizando una curva de

concentraciones crecientes de bFGF humano (PeProtech, México) o VEGF₁₆₅ humano (PeProtech, USA) diluido en 0,1% ovo-albumina en DMEM (Figura 10 y)

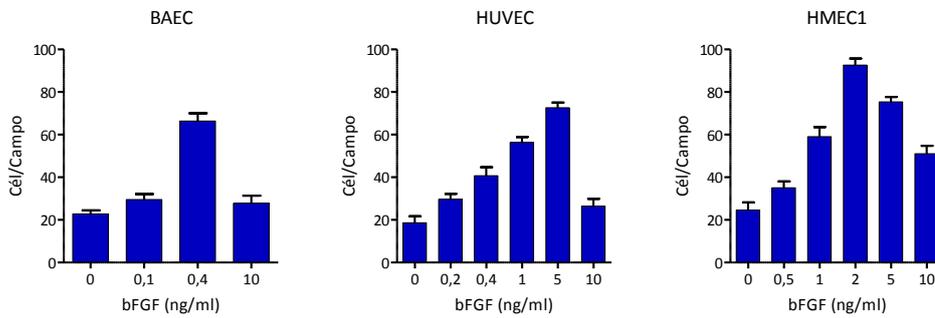


Figura 10 Curva de bFGF

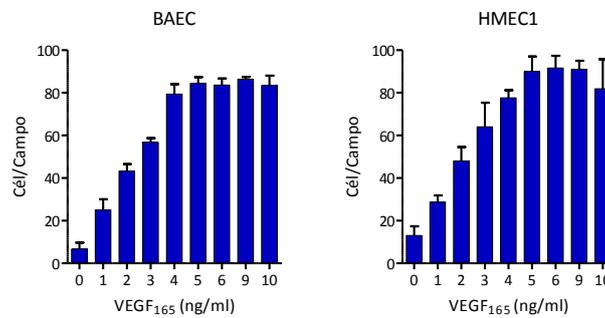


Figura 11 Curva VEGF₁₆₅

En los ensayos de neutralización los medios condicionados y la proteína SPARC fueron pre-incubado a 4°C por 12-16hs con anticuerpos neutralizantes descritos en la Tabla 3 y utilizados en las diluciones que figuran en el texto.

Tabla 3 Proteínas y anticuerpos neutralizantes utilizados

Proteína	Concentración de trabajo	de Anticuerpo neutralizante	Concentración (mm/ml)	Isotipo	Referencia
SPARC	1-20µg/ml	Ab236 Ab293	50µg/ml	IgG1 murino	(Sweetwyne, Brekken et al. 2004)
bFGF	BAEC: 0,4ng/ml HMEC1: 2ng/ml	Anti-FGF básico (Peprotech)	5µg/ml	IgG1	Cat100-18B

VEGF165	BAEC: 5 ng/ml HMEC1: 5ng/ml	Anti-VEGF165 (Peprotech, 500- M88)	5µg/ml	IgG2b	Cat100-20
---------	--------------------------------	--	--------	-------	-----------

Ensayo de diferenciación endotelial (Tubulogénesis)

Para determinar el potencial diferenciador de los distintos medios y proteínas se utilizó el ensayo de tubulogénesis(Kubota, Kleinman et al. 1988) sobre membrana basal reconstituida (BD Matrigel™)(Kleinman, McGarvey et al. 1982). Se agregó 80µl de Matrigel en hielo, en placa de 96 pocillos fría manteniendo la esterilidad. Rápidamente se centrifugó a 750 xg en centrifuga de placa fría sin refrigeración, de manera que llegue a 30°C durante 45-60min. Durante este periodo el Matrigel gelifica logrando una superficie plana.

Dicha placa se mantuvo hasta 2hs a 37°C en incubadora hasta comenzar el ensayo de diferenciación. Para ello se sembraron 12.000 células en 150µl de DMEM, 0,1/ BSA o medio condicionado a probar y se observó en microscopio con contraste de fase a 2, 5, 8 y 12hs con aumento de 10X. Cada imagen de 8hs fue cuantificada utilizando el plugin NeuronJ(Meijering, Jacob et al. 2004) del programa ImageJ (NIH, Bethesda, USA) (Rasband 1997-2005) midiendo la longitud total en pixeles de los todos los túbulos formados. Se analizó el promedio de tres imágenes por tratamiento en al menos cuatro experimentos independientes.

Se analizó estadísticamente mediante ANOVA de un factor con observaciones pareadas por experimento.

Ensayo de redondeamiento

Se arrestaron las células BAEC según el protocolo anteriormente descrito. Se sembraron 4000 células en medio completo, con el agregado de 0 o 20µg/ml de SPARC en 40µl sobre portaobjetos pintados con pocillos de 8mm de ø (ICN Biomedicals) de acuerdo a protocolos preestablecidos(Sage 1992). A 30, 60, 90min y 12hs se fijaron con paraformaldehído 4/ y teñidos con faloidina-Alexa594 (Invitrogen, Molecular Probes) para marcar el citoesqueleto de actina. Se evaluó el estiramiento expresando el porcentaje de células no estiradas (redondeadas) sobre

el total de células observadas en un campo microscópico de 20X. Se realizaron entre 3 y 6 ensayos por triplicado cada uno para las proteínas estudiadas expresando el valor promedio y su respectivo desvío estándar.

Purificación de SPARC nativa de melanoma humano

Como fuente de SPARC nativa de melanoma humano se condicionó medio libre de suero de las células A375N crecidas a un 80% de confluencia durante 48 hs. Luego de centrifugar el medio para retirar las células muertas y los detritos se le agregó 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, y 0.01% de azida sódica antes de continuar con el procesamiento. Para la purificación de proteína a partir de un litro de medio condicionado, se concentró 20 veces mediante un sistema comercial (Amicon Ultrafiltration Cell Model N202) que utiliza una membrana de 10 000 kDa como límite inferior de retención (YM10; Millipore, Billerica, MA). El concentrado fue dializado en 20 mM Tris-HCl (pH: 7.8). Posteriormente la muestra fue corrida en una columna HiTrap Q de intercambio iónico (GE Healthcare, NJ, USA). La proteína retenida fue eluída mediante un gradiente continuo de 100 mM a 500 mM de NaCl (la elución de SPARC se produce a los 325 mM). Las fracciones colectadas con un grado de pureza cercano al 80% fueron mezcladas y dializadas.

Seguidamente, las muestras se corrieron en un tamiz molecular (Superdex 200, GE Healthcare, NJ, USA) para terminar obteniendo un grado de pureza cercano al 95% verificado mediante SDS-PAGE. El rendimiento final alcanzado fue cercano al miligramo de proteína nativa por litro de medio condicionado. La concentración de proteína fue determinada por absorbancia a 280 nm, asignando una absortividad molar a 280 nm de $0.875 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Por último la proteína purificada fue dializada contra PBS y concentrada en sistemas Centricon 10 (Millipore, Billerica, MA, USA) hasta obtener una concentración de aproximadamente 1 mg/ml de SPARC humana. La solución final se filtró por 0.22 µm, se alícuotó en volúmenes pequeños y se congeló a -80 °C hasta su utilización. Las preparaciones de SPARC nativa fueron rutinariamente testeadas para la presencia de endotoxina bacteriana utilizando el ensayo del lisado de Limulus

amebocyte (Sigma Co, St. Louis, MO, USA). En ninguna de las preparaciones se detectaron niveles de endotoxina.

Producción y purificación de SPARC humana recombinante

Se construyó un vector de expresión para SPARC humana mediante amplificación por PCR utilizando ADNc de SPARC como templado. Para esta PCR se utilizaron cebadores flanqueados por sitios de restricción SstI y BamHI en el extremo 5' y 3' respectivamente.

El cebador directo: 5' GCATCTACGAGCTCATGCGGGCCTGGATC 3' y reverso: 5' GATGGTG-AGAACCGCGTGGCACCAGGATCACAAGATCC 3' y 5'GCATCTGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGG-TGAGAACC 3', fueron utilizados para incluir la secuencia de clivaje por trombina ((Leu- Val-Pro-Arg-Gly-Ser) al final de la secuencia del C-amino terminal de SPARC seguidos por un codón de terminación (TAA). El producto de PCR fue clonado en el vector de expresión pRmHA-3 conteniendo un promotor de metalotioneína de *Drosophila* inducible por cobre denominado pBshHA-rh-SPARC.

Las células de *Drosophila* Schneider SL-3 fueron crecidas en medio para insecto HyQ SFX (HyClone) suplementado con glutamina 18mM. Se las transfectó utilizando Cellfectin (Invitrogen) combinado con el plásmido de expresión pBshHA-rh-SPARC y el plásmido de selección pBsh-PURO o pBsh-BLAST, para resistencia a puomicina o blastidina respectivamente. Luego de 10 días de expansión en medio selectivo se seleccionaron clones por dilución límite.

Para la producción de SPARC, se indujeron 1×10^9 células con 1mM de sulfato de cobre. Luego de 72hs se tomó el sobrenadante y se le agregó 0,01% de azida sódica, 1mM PMSF y 1mM de EDTA para inhibir proteasas y se lo dializó contra 20 volúmenes de PBS 2M ClNa. Este sobrenadante se agregó a una columna de NTA-nNi de 1ml (Qiagen) equilibrada contra PBS 2M ClNa. Se lavó dos veces con PBS-ClNa y se eluyó con 250mM de Imidazol en 50mM H_2NaPO_4 pH8, 300mM ClNa.

Posteriormente se dializó contra Tris-Cl 20mM pH7,8 y se purificó en una columna de intercambio aniónico HiTrapQ (GE Healthcare) equilibrada en el mismo búfer. Se eluyó en un gradiente de 0 a 600mM de ClNa. Las fracciones reactivas para SPARC fueron concentradas en columnas Centriprep-10 (Millipore) obteniéndose entre 12 y 30 mg de rh-SPARC por litro de sobrenadante. La concentración fue determinada por absorbancia a 280nm utilizando un coeficiente E280 de 0,875 mL mg⁻¹ cm⁻¹.

Preparación de medio condicionado por células de melanoma

Un número determinado de células (Tabla 4) fue sembrado en medio completo e incubado a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas. El medio fue retirado, las células adheridas lavadas 2 veces con PBS, e incubadas nuevamente a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo libre de suero. El medio condicionado utilizado en los ensayos de migración y diferenciación. Luego de 24hs, el medio de cultivo fue retirado y centrifugado a 450 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (medio condicionado), fue alicuotado y conservado a -70°C hasta su uso.

Tabla 4 Característica de las placas de cultivo

Placa	Ø mm	Superficie cm ²	Volumen crecimiento ml	Vol. condicionado ml	Cel. Confluencia	Cel. condicionado
P150	150	148	20	10	1,5x10 ⁷	7,5x10 ⁶
P100	96	55	10	5	5x10 ⁶	2x10 ⁶
P60	60	21	3	1,5	1,5x10 ⁶	7,5x10 ⁵
P35	35	9,7	2	1	9x10 ⁵	5x10 ⁵
6 pocillos	34,8	9,5	2	1	9x10 ⁵	5x10 ⁶
24 pocillos	15,6	1,9	0,5	0,3	2x10 ⁵	1x10 ⁵
96 pocillos	6,4	0,32	0,1	0,05	4x10 ⁴	2x10 ⁴

Cuantificación de proteínas totales en medios condicionados

Para estandarizar la carga proteica de Western blots se cuantificaron proteínas totales de medios condicionados mediante el kit fluorimétrico de alta sensibilidad NanOrange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), siguiendo las instrucciones del

fabricante. Brevemente, se incubó el reactivo NanoOrange en una dilución apropiada junto con una alícuota de 100 µl del medio condicionado puro y otra de medio diluido a la mitad con agua destilada, por 10 min a 96 °C. Luego de 20 min del enfriamiento, se midió la fluorescencia en un fluorímetro de placa GENius (Tecan Instruments, Salzburg, Austria), utilizando como longitud de onda de excitación 485 nm y de emisión 590 nm. La concentración se determinó por comparación con una curva estándar construida con BSA entre 10 ng/ml y 10 µg/ml.

Sándwich ELISA para SPARC nativa

Placas de ELISA (MaxiSorp, Nunc) fueron incubadas durante 16 hs a 4°C con 50 µl de 5 µg/ml IgG de conejo anti-SPARC329 en PBS. La placa fue lavada 5 veces con PBSTw y bloqueada con 100 µl de 2% BSA en PBS durante 2 hs a 37°C. La solución de bloqueo fue descartada y la placa fue incubada durante 16 hs a 4°C con 50 µl de medio condicionado de la línea de celular estudiado. Luego de 5 lavados con PBSTw, la placa fue incubada durante 2 hs a 37°C con 50 µl de medio condicionado de hibridoma AON-1. Como referencia se utilizó una curva de SPARC nativa humana disuelta en medio de cultivo a concentraciones conocidas. Posteriormente, las placas fueron lavadas 5 veces con PBSTw e incubadas a 37°C durante 1 h con una dilución 1/1000 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón IgG+IgA+IgM H+L conjugado con HRP (Gibco BRL) en 2% BSA en PBS. La placa fue lavada 5 veces con PBST1 e incubada con 100 µl de OPD 0,4 mg/ml con 0,03 vol. H₂O₂ en buffer OPD a temperatura ambiente en oscuridad, hasta aparición de color (aproximadamente 10 min). La reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 4N y la absorbancia fue cuantificada a 490 nm con un lector de placas (Microplate reader 550, BioRad).

Geles de poliacrilamida y Western blotting

Tanto las proteínas totales pertenecientes a los medios condicionados, como las fracciones provenientes de las columnas de purificación de SPARC nativa se mezclaron directamente (sin precipitación o dilución previa) con buffer muestra 6x (10 / v/v glicerol, 62.5 mM Tris-HCL (pH 6.8), 2 / w/v SDS, 0.01 mg/mL ABF) conteniendo 400 mM de DTT como agente reductor (Sambrook and Russell 2001).

De cada muestra se sembraron 25 μ l en geles de SDS-PAGE al 10-12 / según el caso, y se corrió la electroforesis a 180 V hasta que el ABF llegue al 95/ de la longitud del gel. Los geles resultantes se tiñeron con coloración de Azul Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham GE) para su posterior procesamiento por Western blot (Sambrook and Russell 2001). Luego de trasferir los geles, se bloquearon las membranas con 3 / w/v de leche descremada en PBS por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente, las membranas bloqueadas se incubaron durante 16 hs a 4 °C en agitador con el anticuerpo monoclonal AON-1 (dilución 1/400 del medio condicionado de hibridoma en PBS, 0.05 / Tween-20) o el antisuero de conejo (dilución 1/2000 en PBS, 0.05 / Tween-20). Luego de lavar las membranas en PBS, Tween 0.05 / se realizó por 30min a temperatura ambiente la incubación del anticuerpo secundario de cabra anti-IgGs de ratón acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) o un anticuerpo secundario de cabra anti IgGs de conejo (Jackson immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA), ambos en las diluciones recomendadas por el laboratorio comercial. Las bandas reactivas se detectaron mediante la utilización de un sustrato quimioluminiscente de la HRP siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Dot-blot semicuantitativo

Se prepararon soluciones estándares con 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016pg totales de VEGF₁₆₅ (PreProtech, Tabla 3) en medio de cultivo sin suero. Se transfirieron 500ul de cada medio condicionado y de cada concentración estándar de VEGF mediante Dot-blot (BioRad) en membrana de nitro celulosa. Posteriormente, se bloqueó dicha membrana en leche 5/ en PBST durante 60min y se incubó con 0.2 ug/ml de anticuerpo específico contra VEGF (indicado en la Tabla 3) en PBST durante toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados de 15min cada uno se incubo con anticuerpo de cabra anti-IgGs de ratón acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) y revelado con ECL-Plus (Amersham). Se capturó la imagen de 16bit de profundidad con irradiado máxima intensidad de laser. Mediante cuantificación de la intensidad de los spots mediante ImageJ (NHI) y se graficó la curva Intensidad vs

Cantidad de VEGF, de la cual se obtuvo el valor para los medios condicionados medidos. Dicho valor se dividió por los μl sembrados y se obtuvo la concentración.

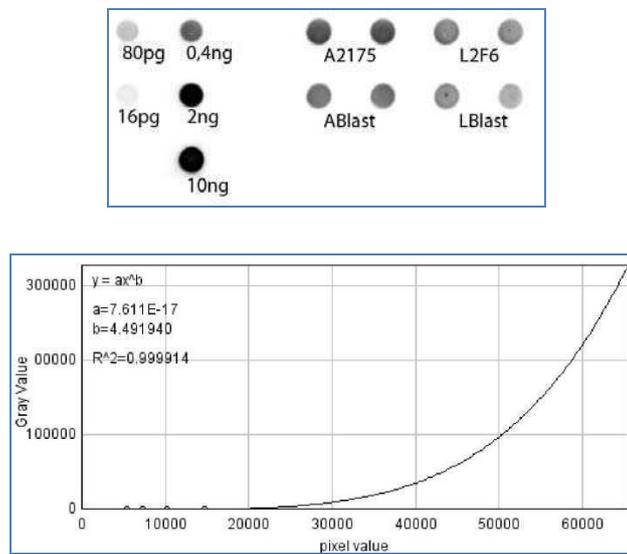


Figura 12 Curva de calibración Dot-Blot VEGF. Arriba: Imagen de membrana revelada contra VEGF, en la figura se indica las cantidades sembradas de la proteína de calibración y 500 μl de medio condicionado. Abajo: Curva de calibración obtenida de la imagen de arriba. Se observa un ajuste cuadrado de superior a 0.99, para una curva exponencial.

Referencias

Ades, E. W., F. J. Candal, et al. (1992). "HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line." J Invest Dermatol **99**(6): 683-690.

Aeschlimann, D., O. Kaupp, et al. (1995). "Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate." The Journal of Cell Biology **129**(3): 881-892.

Aeschlimann, D., A. Wetterwald, et al. (1993). "Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes." The Journal of Cell Biology **120**(6): 1461-1470.

Ahuja, D., M. T. Saenz-Robles, et al. (2005). "SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation." Oncogene **24**(52): 7729-7745.

Alford, A. I. and K. D. Hankenson (2006). "Matricellular proteins: extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration." Bone **38**(6): 749-757.

Alonso, S. R., P. Ortiz, et al. (2004). "Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study." Am J Pathol **164**(1): 193-203.

Alonso, S. R., L. Tracey, et al. (2007). "A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis." Cancer Res **67**(7): 3450-3460.

Alvarez, M. J., F. Prada, et al. (2005). "Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity." Cancer Res **65**(12): 5123-5132.

Arnold, S. A. and R. A. Brekken (2009). "SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis." J Cell Commun Signal **3**(3-4): 255-273.

- Auerbach, W. and R. Auerbach (1994). "Angiogenesis inhibition: a review." Pharmacol Ther **63**(3): 265-311.
- Ausprunk, D. H., K. Falterman, et al. (1978). "The sequence of events in the regression of corneal capillaries." Lab Invest **38**(3): 284-294.
- Baatout, S. (1997). "Endothelial differentiation using Matrigel (review)." Anticancer Res **17**(1A): 451-455.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-545.
- Barth, P. J., R. Moll, et al. (2005). "Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast." Virchows Arch **446**(5): 532-536.
- Bassuk, J., L. Iruela-Arispe, et al. (1993). "Molecular analysis of chicken embryo SPARC." European Journal of Biochemistry **218**: 117-127.
- Bassuk, J. A., F. Baneyx, et al. (1996). "Expression of biologically active human SPARC in Escherichia coli." Arch Biochem Biophys **325**(1): 8-19.
- Bassuk, J. A., R. Pichler, et al. (2000). "Induction of TGF-beta1 by the extracellular matrix protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis." Kidney International **57**(1): 117-128.
- Beck, K. F., S. Walpen, et al. (2001). "Downregulation of integrin-linked kinase mRNA expression by nitric oxide in rat glomerular mesangial cells." Life Sci **69**(25-26): 2945-2955.
- Bellahcene, A. and V. Castronovo (1995). "Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer." Am J Pathol **146**(1): 95-100.
- Bellon, G., L. Martiny, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 203-220.

Benjamin, L. E., D. Golijanin, et al. (1999). "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal." J Clin Invest **103**(2): 159-165.

Bhoopathi, P., C. Chetty, et al. (2007). "SPARC expression is associated with reduced angiogenesis in medulloblastoma." AACR Meeting Abstracts **2007**(1_Annual_Meeting): 3825-.

Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature **432**(7015): 332-337.

Bingle, L., N. J. Brown, et al. (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." J Pathol **196**(3): 254-265.

Black, A. F., F. Berthod, et al. (1998). "In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent." Faseb J **12**(13): 1331-1340.

Bouck, N., V. Stellmach, et al. (1996). "How tumors become angiogenic." Adv Cancer Res **69**: 135-174.

Bowersox, J. C. and N. Sorgente (1982). "Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin." Cancer Res **42**(7): 2547-2551.

Bradshaw, A. D., J. A. Bassuk, et al. (2000). "Expression and purification of recombinant human SPARC produced by baculovirus." Molecular and Cellular Biology Research Communications **3**(6): 345-351.

Bradshaw, A. D., A. Francki, et al. (1999). "Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation." Molecular Biology of the Cell **10**: 1569-1579.

Bradshaw, A. D. and E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury." J Clin Invest **107**(9): 1049-1054.

Brekken, R. A., P. Puolakkainen, et al. (2003). "Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM." J Clin Invest **111**(4): 487-495.

Brekken, R. A. and E. H. Sage (2000). "SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix." Matrix Biology **19**(7): 569-580.

Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." Ann Surg **172**(5): 902-908.

Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2002). Molecular Biology of the Cell, Garland Science.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.

Cao, Y. (2005). "Tumor angiogenesis and therapy." Biomed Pharmacother **59 Suppl 2**: S340-343.

Cao, Y., C. Chen, et al. (1995). "gro-beta, a -C-X-C- chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice." J Exp Med **182**(6): 2069-2077.

Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.

Carpenter, A. E., T. R. Jones, et al. (2006). "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes." Genome Biol **7**(10): R100.

Casanovas, O., D. J. Hicklin, et al. (2005). "Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors." Cancer Cell **8**(4): 299-309.

Clezardin, P., L. Malaval, et al. (1988). "Complex formation of human thrombospondin with osteonectin." European Journal of Biochemistry **175**(2): 275-284.

Colotta, F., P. Allavena, et al. (2009). "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability." Carcinogenesis **30**(7): 1073-1081.

Cortés Gabaudán, F. (2004). Diccionario médico-biológico (histórico y etimológico) de helenismos. Obras de referencia **20**. Salamanca, Ediciones Universidad de Salamanca: 1 CD-ROM.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.

Chandrasekhar, S., A. K. Harvey, et al. (1994). "Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors." Biochimica et Biophysica Acta **1221**(1): 7-14.

Charest, A., A. Pepin, et al. (2006). "Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis." Heart **92**(12): 1844-1849.

Chlenski, A., L. J. Guerrero, et al. (2007). "SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation." Oncogene **26**(31): 4513-4522.

Chlenski, A., S. Liu, et al. (2004). "Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC." Cancer Res **64**(20): 7420-7425.

Chlenski, A., S. Liu, et al. (2002). "SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis." Cancer Res **62**(24): 7357-7363.

Chlenski, A., S. Liu, et al. (2006). "SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix." Int J Cancer **118**(2): 310-316.

Damjanovski, S., M. H. Huynh, et al. (1998). "Regulation of SPARC expression during early *Xenopus* development: evolutionary divergence and conservation of DNA regulatory elements between amphibians and mammals." Development Genes and Evolution **207**: 453-461.

Damjanovski, S., F. Liu, et al. (1992). "Molecular analysis of *Xenopus laevis* SPARC (secreted protein, acidic, rich in cysteine). A highly conserved acidic calcium-binding extracellular-matrix protein." Biochemical Journal **281**: 513-517.

Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell **87**(7): 1161-1169.

De Craene, B., F. van Roy, et al. (2005). "Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors." Cell Signal **17**(5): 535-547.

De, S., J. Chen, et al. (2003). "Molecular Pathway for Cancer Metastasis to Bone." J. Biol. Chem. **278**(40): 39044-39050.

Delany, A. M. and E. Canalis (1998). "Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts." American Journal of Physiology **274**(3 Pt 1): C734-C740.

Denizot, F. and R. Lang (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." J Immunol Methods **89**(2): 271-277.

Desmouliere, A., C. Guyot, et al. (2004). "The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior." Int J Dev Biol **48**(5-6): 509-517.

Dianalee A. Campo McKnight, D. M. S., Jennifer E. Koblinski, Carol V. Gay, (2005). "Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone." Journal of Cellular Biochemistry **9999**(9999): n/a.

Dimartino, J. F., N. J. Lacayo, et al. (2006). "Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein." Leukemia.

Duff, M. D., J. Mestre, et al. (2007). "Analysis of gene expression in the tumor-associated macrophage." J Surg Res **142**(1): 119-128.

Dvorak, H. F. and I. Gresser (1989). "Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice." J Natl Cancer Inst **81**(7): 497-502.

Eichhorn, M. E., A. Kleespies, et al. (2007). "Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact." Langenbecks Arch Surg **392**(3): 371-379.

Emerson, R. O., E. H. Sage, et al. (2006). "Chaperone-like activity revealed in the matricellular protein SPARC." J Cell Biochem **98**(4): 701-705.

Engel, J., W. Taylor, et al. (1987). "Calcium-binding domains and calcium-induced transition in SPARC (osteonectin/BM40), an extracellular glycoprotein expressed in mineralized bone and nonmineralized tissues." Biochemistry **26**: 6958-6965.

Farrow, B., D. Albo, et al. (2008). "The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer." J Surg Res **149**(2): 319-328.

Fenouille, N., A. Puissant, et al. (2010). "Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC." Cancer Res **70**(23): 9659-9670.

Fink, A. L. (2005). "Natively unfolded proteins." Current Opinion in Structural Biology **15**(1): 35-41.

Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-1186.

Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-18.

Folkman, J., E. Merler, et al. (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." J Exp Med **133**(2): 275-288.

Francki, A., A. D. Bradshaw, et al. (1999). "SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells." The Journal of Biological Chemistry **274**(45): 32145-32152.

Francki, A., K. Motamed, et al. (2003). "SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling." J Cell Biochem **88**(4): 802-811.

Funk, S. E. and E. H. Sage (1991). "The Ca²⁺-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. **88**: 2648-2652.

Funk, S. E. and E. H. Sage (1993). "Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts." Journal of Cellular Physiology **154**: 53-63.

Giudici, C., N. Raynal, et al. (2008). "Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens." J Biol Chem **283**(28): 19551-19560.

Gohring, W., T. Sasaki, et al. (1998). "Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope." European Journal of Biochemistry **255**(1): 60-66.

Gooden, M. D., R. B. Vernon, et al. (1999). "Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix." Journal of Cellular Biochemistry **74**(2): 152-167.

Gradishar, W. J. (2006). "Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane." Expert Opin Pharmacother **7**(8): 1041-1053.

Greenblatt, M. and P. Shubi (1968). "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique." J Natl Cancer Inst **41**(1): 111-124.

Grenard, P., S. Bresson-Hadni, et al. (2001). "Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis." Journal of Hepatology **35**: 367-375.

Haber, C. L., V. Gottifredi, et al. (2008). "SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated." Int J Cancer **122**(7): 1465-1475.

Hafner, M., K. Zimmermann, et al. (1995). "A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription." Matrix Biol **14**(9): 733-741.

Han, Z. C. and Y. Liu (1999). "Angiogenesis: state of the art." Int J Hematol **70**(2): 68-82.

Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**: 57-70.

Hashizume, H., P. Baluk, et al. (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." Am J Pathol **156**(4): 1363-1380.

Hasselaar, P. and E. H. Sage (1992). "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells." Journal of Cellular Biochemistry **49**: 272-283.

Heasley, D. D., S. Toda, et al. (1996). "Pathology of malignant melanoma." Surg Clin North Am **76**(6): 1223-1255.

Hirschi, K. K. and P. A. D'Amore (1996). "Pericytes in the microvasculature." Cardiovasc Res **32**(4): 687-698.

Hohenadl, C., K. Mann, et al. (1995). "Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification." The Journal of Biological Chemistry **270**(40): 23415-23420.

Hohenester, E., P. Maurer, et al. (1996). "Structure of a novel extracellular Ca²⁺-binding module in BM-40." Nature Structural Biology **3**(1): 67-73.

- Hohenester, E., P. Maurer, et al. (1997). "Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40." EMBO Journal **16**(13): 3778-3786.
- Holash, J., S. J. Wiegand, et al. (1999). "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." Oncogene **18**(38): 5356-5362.
- Holmgren, L., M. S. O'Reilly, et al. (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-153.
- Holland, P. W., S. J. Harper, et al. (1987). "In vivo expression of mRNA for the Ca²⁺-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization." The Journal of Cell Biology **105**: 473-482.
- Hong, S. M., D. Kelly, et al. (2008). "Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas." Mod Pathol **21**(12): 1499-1507.
- Hu, Z., C. Fan, et al. (2009). "A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcomes." BMC Med **7**: 9.
- Hunt, T. K., D. R. Knighton, et al. (1984). "Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages." Surgery **96**(1): 48-54.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-2342.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., P. Argani, et al. (2002). "The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types." Cancer Res **62**(18): 5351-5357.

Ikuta, Y., T. Nakatsura, et al. (2005). "Highly Sensitive Detection of Melanoma at an Early Stage Based on the Increased Serum Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine and Glypican-3 Levels." Clin Cancer Res **11**(22): 8079-8088.

Information, N. C. f. B. (2008). "HomoloGene." from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=homologene&cmd=retrieve&list_uids=31132.

Iruela-Arispe, M. L., P. Bornstein, et al. (1991). "Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 5026-5030.

Iruela-Arispe, M. L., P. Hasselaar, et al. (1991). "Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis *in vitro*." Laboratory Investigation **64**(2): 174-186.

Iruela-Arispe, M. L., R. B. Vernon, et al. (1996). "Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function." Dev. Dyn. **207**(2): 171-183.

Iruela Arispe, M. L., T. F. Lane, et al. (1995). "Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*." Molecular Biology of the Cell **6**(3): 327-343.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

Jensen, L. J., M. Kuhn, et al. (2009). "STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D412-416.

Jiang, Y., I. D. Goldberg, et al. (2002). "Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer." Oncogene **21**(14): 2245-2252.

Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.

Jung, Y. D., S. A. Ahmad, et al. (2002). "The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis." Semin Cancer Biol **12**(2): 105-112.

Kairiyama, C., I. Slavutsky, et al. (1995). "Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN." Pigment Cell Research **88**: 121-131.

Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer **6**(5): 392-401.

Kantorow, M., Q. Huang, et al. (2000). "Increased expression of osteonectin/SPARC mRNA and protein in age-related human cataracts and spatial expression in the normal human lens." Molecular Vision **6**: 24-29.

Kapinas, K., C. B. Kessler, et al. (2009). "miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling." J Cell Biochem **108**(1): 216-224.

Karamysheva, A. F. (2008). "Mechanisms of angiogenesis." Biochemistry (Mosc) **73**(7): 751-762.

Kaufmann, B., S. Muller, et al. (2004). "Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity." Glycobiology **14**(7): 609-619.

Kelm, R. J., Jr. and K. G. Mann (1990). "Human platelet osteonectin: release, surface expression, and partial characterization." Blood **75**(5): 1105-1113.

Kelm, R. J., Jr. and K. G. Mann (1991). "The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation." J Biol Chem **266**(15): 9632-9639.

Kelm, R. J. J., G. A. Hair, et al. (1992). "Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC)." Blood **80**: 3112-3119.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, et al. (1982). "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma." Biochemistry **21**(24): 6188-6193.

Koblinski, J. E., B. R. Kaplan-Singer, et al. (2005). "Endogenous Osteonectin/SPARC/BM-40 Expression Inhibits MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Metastasis." Cancer Res **65**(16): 7370-7377.

Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2003). "Enhanced Expression of SPARC/Osteonectin in the Tumor-associated Stroma of Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Markers of Hypoxia/ Acidity and with Poor Prognosis of Patients." Cancer Res **63**(17): 5376-5380.

Kubota, Y., H. K. Kleinman, et al. (1988). "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures." J Cell Biol **107**(4): 1589-1598.

Kudo, H., K. Hirayoshi, et al. (1994). "Two collagen-binding proteins, osteonectin and HSP47, are coordinately induced in transformed keratinocytes by heat and other stresses." Experimental Cell Research **212**(2): 219-224.

Kumar, S. and V. M. Weaver (2009). "Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 113-127.

Kuphal, S., H. G. Palm, et al. (2005). "Snail-regulated genes in malignant melanoma." Melanoma Res **15**(4): 305-313.

Kupprion, C., K. Motamed, et al. (1998). "SPARC (BM-40, Osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells." The Journal of Biological Chemistry **273**(45): 29635-29640.

Lane, T. F., M. L. Iruela-Arispe, et al. (1994). "SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis." The Journal of Cell Biology **125**: 929-943.

Lane, T. F. and E. H. Sage (1994). "The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions." FASEB Journal **8**: 163-173.

Ledda, F., A. I. Bravo, et al. (1997). "The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma." J Invest Dermatol **108**(2): 210-214.

Ledda, M. F., S. Adris, et al. (1997). "Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells." Nat Med **3**(2): 171-176.

Ledda, M. F., A. I. Bravo, et al. (1997). "The expression on the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma." Journal of Investigative Dermatology **108**(2): 210-214.

Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-1309.

Liang, J. F., H. K. Wang, et al. (2010). "Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer." J Exp Clin Cancer Res **29**: 71.

Lien, H. C., Y. H. Hsiao, et al. (2007). "Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition." Oncogene.

Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." Nature **411**(6835): 375-379.

Liotta, L. A., P. S. Steeg, et al. (1991). "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation." Cell **64**(2): 327-336.

Liotta, L. A., W. G. Stetler-Stevenson, et al. (1991). "Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements." Cancer Invest **9**(5): 543-551.

Liu, S., Y. Tian, et al. (2005). "'Cross-talk' between Schwannian stroma and neuroblasts promotes neuroblastoma tumor differentiation and inhibits angiogenesis." Cancer Lett **228**(1-2): 125-131.

- Liu, W., S. A. Ahmad, et al. (2000). "Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature." Apoptosis **5**(4): 323-328.
- Lorusso, G. and C. Ruegg (2008). "The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis." Histochem Cell Biol **130**(6): 1091-1103.
- Lucio-Eterovic, A. K., Y. Piao, et al. (2009). "Mediators of glioblastoma resistance and invasion during anti-vascular endothelial growth factor therapy." Clin Cancer Res **15**(14): 4589-4599.
- Lussier, C., J. Sodek, et al. (2001). "Expression of SPARC/osteonectin/BM40 in the human gut: predominance in the stroma of the remodeling distal intestine." Journal of Cellular Biochemistry **81**(3): 463-476.
- Mahabeleshwar, G. H. and T. V. Byzova (2007). "Angiogenesis in melanoma." Semin Oncol **34**(6): 555-565.
- Maillard, C., L. Malaval, et al. (1992). "Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues." Bone **13**(3): 257-264.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.
- Martinek, N., R. Zou, et al. (2002). "Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in *Drosophila*." Development Genes and Evolution **212**(3): 124-133.
- Mason, I. J., D. Murphy, et al. (1986). "Developmental and transformation-sensitive expression of SPARC gene on mouse chromosome 11." EMBO Journal **5**: 1831-1837.
- Mason, I. J., A. Taylor, et al. (1986). "Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000." Embo J **5**(7): 1465-1472.

Massi, D., A. Franchi, et al. (1999). "Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas." Human Pathology **30**(3): 339-344.

Maurer, P., C. Hohenadl, et al. (1995). "The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domains that binds calcium and collagen IV." Journal of Molecular Biology **253**(2): 347-357.

Maurer, P., E. Hohenester, et al. (1996). "Extracellular calcium-binding proteins." Current Opinion in Cell Biology **8**(5): 609-617.

Maurer, P., U. Mayer, et al. (1992). "High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin)." European Journal of Biochemistry **205**(1): 233-240.

Maurer, P., T. Sasaki, et al. (1997). "Structural and functional characterization of the extracellular calcium-binding protein BM-40/secreted protein, acidic, rich in cysteine/osteonectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*." European Journal of Biochemistry **248**: 209-216.

McCormick, B. A. and B. R. Zetter (1992). "Adhesive interactions in angiogenesis and metastasis." Pharmacol Ther **53**(2): 239-260.

McLaughlin, F., V. J. Ludbrook, et al. (2001). "Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation." Blood **98**(12): 3332-3339.

Meijering, E., M. Jacob, et al. (2004). "Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images." Cytometry A **58**(2): 167-176.

Meyer, P. N., K. Fu, et al. (2011). "The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab." Am J Clin Pathol **135**(1): 54-61.

Miller, K. D., L. I. Chap, et al. (2005). "Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer." J Clin Oncol **23**(4): 792-799.

Minn, A. J., G. P. Gupta, et al. (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." Nature **436**(7050): 518-524.

Mok, S. C., W. Y. Chan, et al. (1996). "SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells." Oncogene **12**: 1895-1901.

Moreno-Bueno, G., E. Cubillo, et al. (2006). "Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition." Cancer Res **66**(19): 9543-9556.

Motamed, K., D. Blake, et al. (2003). "Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: A role for protein kinase A." J Cell Biochem **90**(2): 408-423.

Motamed, K., S. E. Funk, et al. (2002). "Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors." Journal of Cellular Biochemistry **84**: 759-771.

Mundlos, S., B. Schwahn, et al. (1992). "Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **40**: 283-291.

Murphy-Ullrich, J. E. (2001). "The de-adhesion activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?" The Journal of Clinical Investigation **107**(7): 785-790.

Murphy-Ullrich, J. E., T. F. Lane, et al. (1995). "SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca²⁺ binding EF-hand." Journal of Cellular Biochemistry **57**: 341-350.

Nakamura, S., K. Kamihagi, et al. (1996). "Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures." Arthritis & Rheumatism **39**(4): 539-551.

Neri, M., F. Descalzi-Cancedda, et al. (1992). "Heat-shock response in cultured chick embryo chondrocytes. Osteonectin is a secreted heat-shock protein." European Journal of Biochemistry **205**: 569-574.

Ng, K. W., S. S. Manji, et al. (1989). "Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control of pre-osteoblasts." Molecular Endocrinology **3**: 2079-2085.

Nicosia, R. F., E. Bonanno, et al. (1993). "Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro." J Cell Physiol **154**(3): 654-661.

Nomura, S., S. Hashmi, et al. (1990). "Developmental regulation of mouse SPARC (osteonectin) gene expression." Ann N Y Acad Sci **580**: 252-259.

Nomura, S., S. Hashmi, et al. (1989). "Evidence for positive and negative regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the mouse SPARC (osteonectin) gene." The Journal of Biological Chemistry **264**: 12201-12207.

Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.

Nozaki, M., E. Sakurai, et al. (2006). "Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A

10.1172/JCI26316." J. Clin. Invest. **116**(2): 422-429.

Otrock, Z. K., R. A. Mahfouz, et al. (2007). "Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms." Blood Cells Mol Dis **39**(2): 212-220.

Paley, P. J., B. A. Goff, et al. (2000). "Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer." Gynecol. Oncol. **78**(3 Pt 1): 336-341.

Papetti, M. and I. M. Herman (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **282**(5): C947-970.

Parke, A., P. Bhattacharjee, et al. (1988). "Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea." Am J Pathol **130**(1): 173-178.

Parker, B. S., P. Argani, et al. (2004). "Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma." Cancer Res **64**(21): 7857-7866.

Patan, S. (2004). "Vasculogenesis and angiogenesis." Cancer Treat Res **117**: 3-32.

Pawletz, N. and M. Knierim (1989). "Tumor-related angiogenesis." Crit Rev Oncol Hematol **9**(3): 197-242.

Pepper, M. S. (2001). "Extracellular proteolysis and angiogenesis." Thromb Haemost **86**(1): 346-355.

Pepper, M. S., D. Belin, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro." J Cell Biol **111**(2): 743-755.

Perrin, P., S. Ringgaard, et al. (1992). "Modulation of extracellular matrix glycoproteins production by in vitro interacting conditions between rat colonic fibroblasts and tumoral cells." Cell Biol Int Rep **16**(12): 1237-1245.

Pichler, R. H., J. A. Bassuk, et al. (1996). "SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro." American Journal of Pathology **148**(4): 1153-1167.

Podhajcer, O. L., L. Benedetti, et al. (2008). "The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host." Cancer Metastasis Rev.

Polnaszek, N., B. Kwabi-Addo, et al. (2003). "Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer." Cancer Res **63**(18): 5754-5760.

Porter, P. L., E. H. Sage, et al. (1995). "Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **43**(8): 791-800.

Pottgiesser, J., P. Maurer, et al. (1994). "Changes in calcium and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin)." Journal of Molecular Biology **234**(4): 563-574.

Prada, F. (2007). Rol del gen SPARC en la progresión tumoral y su uso como blanco de terapia génica. FBMC. Ciudad de Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. **Doctor: 222.**

Prada, F., L. G. Benedetti, et al. (2007). "SPARC Endogenous Level, rather than Fibroblast-Produced SPARC or Stroma Reorganization Induced by SPARC, Is Responsible for Melanoma Cell Growth." J Invest Dermatol.

Prenzel, K. L., U. Warnecke-Eberz, et al. (2006). "Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA in pancreatic cancer compared to cancer of the papilla of Vater." Oncol Rep **15**(5): 1397-1401.

Rafii, S. (2000). "Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise." J Clin Invest **105**(1): 17-19.

Raines, E. W., T. F. Lane, et al. (1992). "The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. **89**: 1281-1285.

Ramirez, F. and D. B. Rifkin (2003). "Cell signaling events: a view from the matrix." Matrix Biol **22**(2): 101-107.

Rasband, W. S. (1997-2005). ImageJ. N. I. o. Health. Bethesda, Maryland, USA.

Reed, M. J., P. Puolakkainen, et al. (1993). "Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization." J Histochem Cytochem **41**(10): 1467-1477.

Reed, M. J., P. A. Puolakkainen, et al. (1993). "Expression of SPARC and thrombospondin-1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **41**: 1467-1477.

Reed, M. J., R. B. Vernon, et al. (1994). "TGF- β 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors." Journal of Cellular Physiology **158**(1): 169-179.

Rempel, S. A., W. A. Golembieski, et al. (2001). "SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins." Journal of Neurooncology **53**: 149-160.

Rempel, S. A., R. C. Hawley, et al. (2007). "Splenic and immune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of immune response." Genes Immun **8**(3): 262-274.

Risau, W. (1991). "Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation." Ann N Y Acad Sci **633**: 405-419.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.

Robert, G., C. Gaggioli, et al. (2006). "SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development

10.1158/0008-5472.CAN-05-3189." Cancer Res **66**(15): 7516-7523.

Rodriguez-Jimenez, F. J., T. Caldes, et al. (2007). "Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma." Oncol Rep **17**(6): 1301-1307.

Romberg, R. W., P. G. Werness, et al. (1985). "Isolation and characterization of native adult osteonectin." The Journal of Biological Chemistry **260**(5): 2728-2736.

Rosenblatt, S., J. A. Bassuk, et al. (1997). "Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC)." Biochemical Journal **324**: 311-319.

Rumpler, G., B. Becker, et al. (2003). "Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes." Exp Dermatol **12**(6): 761-771.

Sage, E. H. (1992). "Modulation of endothelial cell shape by SPARC does not involve chelation of extracellular Ca²⁺ and Mg²⁺." Biochem Cell Biol **70**(1): 56-62.

Sage, E. H., J. A. Bassuk, et al. (1995). "Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca²⁺ binding EF-hand sequence." Journal of Cellular Biochemistry **57**: 127-140.

Sage, E. H. and P. Bornstein (1991). "Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin." J. Biol. Chem. **266**(23): 14831-14834.

Sage, E. H., C. Johnson, et al. (1984). "Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture." The Journal of Biological Chemistry **259**: 3993-4007.

Sage, E. H., M. Reed, et al. (2003). "Cleavage of the Matricellular Protein SPARC by Matrix Metalloproteinase 3 Produces Polypeptides That Influence Angiogenesis." J. Biol. Chem. **278**(39): 37849-37857.

Sage, E. H., R. Vernon, et al. (1989). "SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading *in vitro* and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix." The Journal of Cell Biology **109**: 341-356.

Sage, E. H., R. B. Vernon, et al. (1989). "Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **37**: 819-829.

Sage, H. (1986). "Culture shock. Selective uptake and rapid release of a novel serum protein by endothelial cells in vitro." J Biol Chem **261**(15): 7082-7092.

Sage, H., J. Decker, et al. (1989). "SPARC: a Ca²⁺-binding extracellular protein associated with endothelial cell injury and proliferation." J Mol Cell Cardiol **21 Suppl 1**: 13-22.

Said, N. and K. Motamed (2005). "Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis." Am J Pathol **167**(6): 1739-1752.

Said, N., M. J. Socha, et al. (2007). "Normalization of the Ovarian Cancer Microenvironment by SPARC." Mol Cancer Res **5**(10): 1015-1030.

Said, N. A., A. A. Elmarakby, et al. (2008). "SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation." Neoplasia **10**(10): 1092-1104.

Said, N. A., I. Najwer, et al. (2007). "SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk." Neoplasia **9**(1): 23-35.

Sambrook, J. and D. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sangaletti, S., A. Stoppacciaro, et al. (2003). "Leukocyte, Rather than Tumor-produced SPARC, Determines Stroma and Collagen Type IV Deposition in Mammary Carcinoma." J. Exp. Med.: jem.20030202.

Sasaki, T., W. Gohring, et al. (1997). "Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens." The Journal of Biological Chemistry **272**(14): 9237-9243.

Sasaki, T., E. Hohenester, et al. (1998). "Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin." The EMBO Journal **17**(6): 1625-1634.

Sato, N., N. Fukushima, et al. (2003). "SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions." Oncogene **22**(32): 5021-5030.

Sato, T. N., Y. Tozawa, et al. (1995). "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation." Nature **376**(6535): 70-74.

Satyamoorthy, K., S. J. Samulewicz, et al. (1997). "Identification of an intronic enhancer that nullifies upstream repression of SPARC gene expression." Nucleic Acids Research **25**(15): 3169-3174.

Sauk, J. J., K. Norris, et al. (1991). "Diverse forms of stress result in changes in cellular levels of osteonectin/SPARC without altering mRNA levels in osteoligament cells." Calcif Tissue Int **49**(1): 58-62.

Savani, R. C., Z. Zhou, et al. (2000). "Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC." American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology **279**(4): L743-750.

Schiemann, B. J., J. R. Neil, et al. (2003). "SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the TGF-beta-signaling system." Molecular Biology of the Cell **14**(10): 3977-3988.

Schwartz, I., D. Seger, et al. (1999). "Vitronectin." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **31**(5): 539-544.

Schwarzbauer, J. E., F. Musset-Bilal, et al. (1994). "Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*." Methods in Enzymology **245**: 257-270.

Schwarzbauer, J. E. and C. S. Spencer (1993). "The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and motility." Molecular Biology of the Cell **4**: 941-952.

Sharp, P. S. (1995). "The role of growth factors in the development of diabetic retinopathy." Metabolism **44**(10 Suppl 4): 72-75.

Shiba, H., T. Fujita, et al. (1998). "Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture." Journal of Cellular Physiology **174**(2): 194-205.

Shiba, H., Y. Uchida, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells." J. Dent. Res. **80**(7): 1653-1659.

Shieh, A. C., H. A. Rozansky, et al. (2011). "Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts." Cancer Res **71**(3): 790-800.

Shing, Y., J. Folkman, et al. (1984). "Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor." Science **223**(4642): 1296-1299.

Sholley, M. M., G. P. Ferguson, et al. (1984). "Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells." Lab Invest **51**(6): 624-634.

Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.

Smit, D. J., B. B. Gardiner, et al. (2007). "Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype." Int J Cancer **121**(12): 2653-2660.

Socha, M. J., N. Said, et al. (2009). "Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer." Neoplasia **11**(2): 126-135.

Sosa, M. S., M. R. Girotti, et al. (2007). "Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells." Proteomics **7**(22): 4123-4134.

Stenner, D. D., R. W. Romberg, et al. (1984). "Monoclonal antibodies to native noncollagenous bone-specific proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. **81**(9): 2868-2872.

Sturm, R. A., K. Satyamoorthy, et al. (2002). "Osteonectin/SPARC induction by ectopic α_3 integrin in human radial growth phase primary melanoma cells." Cancer Research **62**: 226-232.

Sutherland, R. M. (1986). "Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumors." Cancer **58**(8): 1668-1680.

Sutherland, R. M. (1988). "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." Science **240**(4849): 177-184.

Suzuki, M., C. Hao, et al. (2005). "Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers." Br J Cancer **92**(5): 942-948.

Swaroop, A., B. L. M. Hogan, et al. (1988). "Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33." Genomics **2**: 37-47.

Sweetwyne, M. T., R. A. Brekken, et al. (2004). "Functional analysis of the matricellular protein SPARC with novel monoclonal antibodies." J Histochem Cytochem **52**(6): 723-733.

Taghizadeh, F., M. J. Tang, et al. (2007). "Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine-induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy-resistant colorectal cancer cells to chemotherapy." Mol Cancer Ther **6**(1): 309-317.

Tai, I. T., M. Dai, et al. (2005). "Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy." J. Clin. Invest.: JCI23002.

Tartare-Deckert, S., C. Chavey, et al. (2001). "The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor upregulated in obesity." The Journal of Biological Chemistry **In press**.

Termine, J. D., H. K. Kleiman, et al. (1981). "Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen." Cell **26**: 99-105.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

Thomas, R., L. D. True, et al. (2000). "Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression." Clinical Cancer Research **6**(3): 1140-1149.

Tkachuk, V. A., O. S. Plekhanova, et al. (2009). "Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator." Can J Physiol Pharmacol **87**(4): 231-251.

Uversky, V. N. (2002). "Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics." Protein Science **11**: 739-756.

Vajkoczy, P., M. Farhadi, et al. (2002). "Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2." J Clin Invest **109**(6): 777-785.

van Hinsbergh, V. W., M. A. Engelse, et al. (2006). "Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 716-728.

Vernon, R. B. and E. H. Sage (1999). "A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices." Microvasc Res **57**(2): 118-133.

Vernon, R. B. and H. Sage (1989). "The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis." Biology of Reproduction **40**(6): 1329-1340.

Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, et al. (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **13**(4): 1253-1259.

Walpen, S., K.-F. Beck, et al. (2000). "Downregulation of SPARC expression is mediated by nitric oxide in rat mesangial cells and during endotoxemia in the rat." Journal of the American Society of Nephrology **11**(3): 468-476.

Walsh, D. A. (1999). "Angiogenesis and arthritis." Rheumatology (Oxford) **38**(2): 103-112.

Weaver, M. S., G. Workman, et al. (2008). "The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase." J Biol Chem **283**(33): 22826-22837.

Webersinke, G., H. Bauer, et al. (1992). "Comparison of gene expression of extracellular matrix molecules in brain microvascular endothelial cells and astrocytes." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 877-884.

Wernert, N. (1997). "The multiple roles of tumour stroma." Virchows Arch **430**(6): 433-443.

Wewer, U. M., R. Albrechtsen, et al. (1988). "Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation of basement membrane." Am J Pathol **132**(2): 345-355.

Whiteside, T. L. (2008). "The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth." Oncogene **27**(45): 5904-5912.

- Wiese, A. H., J. Auer, et al. (2007). "Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells." Cancer Detect Prev **31**(4): 282-295.
- Wrana, J. L., T. Kubota, et al. (1991). "Regulation of transformation-sensitive secreted phosphoprotein (SPPI/osteopontin) expression by transforming growth factor-beta. Comparisons with expression of SPARC (secreted acidic cysteine-rich protein)." Biochem J **273 (Pt 3)**: 523-531.
- Yan, Q. and E. H. Sage (1999). "SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **47**(12): 1495-1506.
- Yan, Q., M. Weaver, et al. (2005). "Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells." J Cell Physiol **203**(1): 286-294.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-248.
- Yang, E., H. J. Kang, et al. (2007). "Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers." Int J Cancer **121**(3): 567-575.
- Yiu, G. K., W. Y. Chan, et al. (2001). "SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells." Am J Pathol **159**(2): 609-622.
- Yost, J. C. and E. H. Sage (1993). "Specific interaction of SPARC with endothelial cells is mediated through a carboxy-terminal sequence containing a calcium-binding E-F hand." The Journal of Biological Chemistry **268**: 25790-25796.
- Young, M. F., D. M. Findlay, et al. (1989). "Osteonectin promoter: DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells." The Journal of Biological Chemistry **264**: 450-456.
- Yunker, C. K., C. Schultz, et al. (2006). "SPARC suppresses and inversely correlates with VEGF expression and secretion in SPARC-transfected U87MG cells and tumors and in primary xenograft human gliomas." AACR Meeting Abstracts **2006**(1): 656-a-.

Zamir, E., B. Z. Katz, et al. (1999). "Molecular diversity of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **112 (Pt 11)**: 1655-1669.

Zhou, H. Y., E. Salih, et al. (1998). "Isolation of a novel bone glycosylated phosphoprotein with disulphide cross-links to osteonectin." Biochemistry Journal **330(3)**: 1423-1431.