Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio del rol de la proteína en el desarrollo y progresión del melanoma humano

Ledda, María Fernanda

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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:
Ledda, María Fernanda. (1999). Estudio del rol de la proteína en el desarrollo y progresión del melanoma humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3126_Ledda.pdf

Cita tipo Chicago:
Ledda, María Fernanda. "Estudio del rol de la proteína en el desarrollo y progresión del melanoma humano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3126_Ledda.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DEL ROL DE LA PROTEÍNA SPARC EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA HUMANO

Autora

María Fernanda Ledda

Director de Tesis

Dr. Osvaldo L. Podhajcer

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

3126

№ 3126

1999

ABSTRACT

SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) is an extracellular protein associated with tissues exhibiting high rates of cell proliferation and matrix remodelling. The present work shows that the human melanoma cell lines IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN and IIB-MEL-J and different human metastatic melanomas expressed high levels of SPARC mRNA and protein. By western blot analysis we detected a unique secreted 42 kDa band in human diploid fibroblast-conditioned medium and a 40 to 45 kDa doublet in the three melanoma cell lines and all the metastatic melanomas tested. Part of the melanoma samples and cell lines showed an additional doublet of 34-36 kDa. SPARC mRNA was expressed by the three established cell lines, 14 metastatic melanoma samples, and tumors raised in nude mice, and no spliced variants were found. The heterogeneous pattern of SPARC secreted by human melanoma cells is the result of post-translational glycosilation and specific extracellular cleavage. Unlike human fibroblasts, melanoma cells did not overexpress SPARC upon addition of TGF-β. Immunohistochemical analysis showed that SPARC was strongly expressed in 100 % of primary melanomas (7 of 7) and metastatic melanomas (29 of 29), moderately expressed in most of the positive dysplastic nevi (13 of 14), and only weakly expressed in nevocellular nevi (4 of 25). Normal melanocytes did not express SPARC. The data suggest that the expression of SPARC is associated with the neoplastic progression of human melanoma. The present study also reports that the suppression of SPARC expression by 2 human melanoma cell lines using a SPARC antisense expression vector, results in significant decrease in the *in vitro* adhesive and invasive capacity of tumor cells, completely abolishing their *in vivo* tumorigenicity. This is the first evidence that SPARC plays a key role in human melanoma development and progression.

RESUMEN

SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) es una proteína extracelular asociada a tejidos que presentan altas tasas de proliferación celular y remodelación de la matriz. En este trabajo se muestra que las líneas celulares de melanoma humano IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN e IIB-MEL-J así como varios melanomas humanos metastásicos expresan altos niveles de la proteína y del ARNm de SPARC. Mediante análisis por Western Blot, detectamos una única banda de 42 kDa secretada *in vitro* por fibroblastos diploides humanos y un doblete de 40 a 45 kDa secretado por las tres líneas celulares de melanoma y en todos los melanomas metastásicos testeados. Algunas de las muestras de melanomas y de las líneas celulares mostraron un doblete adicional de 34-36 kDa. El ARNm de SPARC fue detectado por ensayos de northern blot en las tres líneas de melanoma estudiadas, en las 14 muestras de melanomas metastásicos y en los tumores inducidos en ratones atímicos. El patrón heterogéneo de SPARC secretado por las células de melanoma humano es resultado de la glicosilación post-traduccional y de un clivaje extracelular específico. A diferencia de lo que sucede con los fibroblastos humanos, las células de melanoma no sobreexpresaron SPARC luego del agregado de TGF-β. El análisis inmunohistoquímico demostró que SPARC se expresó fuertemente en el 100% de los melanomas primarios (7/7) y metastásicos (29/29), con moderación en la mayoría de los nevos displásicos positivos (13/14) y débilmente en los nevos benignos (4/25). No se detectó expresión de SPARC en melanocitos normales. Los datos sugieren que la expresión de de esta proteína está asociada a la progresión neoplásica del melanoma humano. En el presente trabajo también se describe la supresión parcial de la expresíon de SPARC en 2 líneas de melanoma humano utilizando un vector de expresión con la secuencia antisentido para SPARC. La reducción de los niveles de expresión de esta proteína dio como resultado una reducción en la capacidad adhesiva e invasiva *in vitro* de las células tumorales sobre membranas basales reconstituídas, eliminando completamente su capacidad tumorigénica *in vivo*. Esta es la primera evidencia de que SPARC desempeña un papel clave la progresión del melanoma humano.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en :

- **Ledda, MF**., Adris, S., Bravo, AI., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky Y., Mordoh, J. & Podhajcer, OL. (1997) *Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells*. Nature Med. **2**, 171-175.

- **Ledda, MF**., Bravo, AI., Adris,S.,Bover, L., Mordoh,J., Podhajcer, OL. (1997) *The expresion of the secreted protein, SPARC, is associated with the neoplastic progression of human melanoma*. J.Invest. Dermatol **108** : 210-214.

ÍNDICE

Introducción **1**

I-Cáncer *1*

I-1.Definición y Clasificación *1*

I-2. Progresión Tumoral *2*

I-3. Matriz extracelular e invasividad celular *5*

I-3.1. Integrinas *7*

I-3.1.1. Interacción con el citoesqueleto *8*

I-3.1.2. Señalización por integrinas y diferenciación *9*

I-3.1.3. Integrinas y progresión tumoral *9*

I-3.2. Proteasas *10*

I-3.2.1. Proteasas e invasividad celular *11*

I-3.2.2. Metaloproteasas de matriz (MMPs) *13*

I-3.3. Proteínas antiadhesivas *15*

I-3.3.1.Tenascina *15*

I-3.3.2. Trombospondina *16*

I-3.3.3.SPARC *17*

II-SPARC *18*

II-1. Propiedades bioquímicas *18*

II-2. Expresión de SPARC *20*

II-3. SPARC y MEC *21*

II-4. SPARC y factores de crecimiento *22*

II-5. SPARC y proliferación celular *23*

II-6. SPARC y cáncer *23*

III-Melanoma Cutáneo *25*

III-1. Incidencia del Melanoma *26*

III-2. Progresión tumoral en el sistema melanocítico *27*

III-3. Evidencias clínicas y patológicas de la progresión tumoral *28*

III-4.Moléculas expresadas por células de melanoma *31*

III-5. Melanoma y marcadores tumorales *31*

III-6. Líneas celulares de melanoma ..... *32.*

Objetivos.....34

Materiales y Métodos.....35

Expresión de SPARC recombinante en E.Coli.....35

Purificación y caracterización de SPARCr.....36

Líneas celulares.....38

Obtención de RNA y análisis por northern blot.....39

Obtención de medios condicionados.....40

Análisis por Western blot.....40

Tratamiento con tunicamicina.....40

Remoción de azúcares por tratamiento enzimático.....41

Tratamiento con inhibidores de proteasas.....42

Regulación de la expresión del mRNA de SPARC por factores de crecimiento.....42

Expresión de SPARC antisentido.....43

Análisis por ELISA.....44

Ensayos de Invasión y Migración.....45

1.Células tumorales.....45

2.Leucocitos.....46

Ensayos de Adhesión.....46

Inmunofluorescencia indirecta.....47.

Zimografía.....47

Aislamiento de PMNLs.....48

Análisis histológico.....49

Experimentos in vivo.....49

Resultados.....50

Inmunodetección de SPARC en muestras de melanoma humano.....50

Expresión del mRNA de SPARC en melanoma humano.....51

Las distintas formas de SPARC son producto de una glicosilación y clivaje diferencial.....53

Detección inmunohistoquímica de SPARC.....56

Regulación de la expresión del mRNA de SPARC por TGF-β en

líneas de melanoma humano.....61.
Disminución de la expresión de SPARC en líneas de melanoma humano transfectadas con secuencias antisentido.....62
Caracterización de la línea IIB-MEL-LES transfectada con la secuencia antisentido de SPARC.....63
Estudio del comportamiento in vitro de las transfectadas con la secuencia antisentido de SPARC.....68
1.Cinética de crecimiento.....68
2.Capacidad invasiva.....69
3.Capacidad adhesiva y migratoria.....71
La expresión de SPARC antisentido suprime la capacidad tumorigénica en ratones atímicos.....72
Análisis de factores quimiotácticos para leucocitos.....76

Discusión.....**78**
La expresión de SPARC está asociada a la progresión del melanoma humano.....78
Modificaciones post-traduccionales de SPARC expresada en melanoma.....80
SPARC no afecta el crecimiento celular de las líneas de melanoma estudiadas.....82
SPARC como modulador de la capacidad adhesiva.....84
SPARC como modula la capacidad invasiva de las líneas de melanoma estudiadas invasiva.....85
La secuencia antisentido de SPARC suprime la capacidad tumorigénica in vivo.....87
Consideraciones finales.....88.

Conclusiones.....**90**

Referencias.....**91**

Anexos **108**

Anexo 1. Abreviaturas *108*

Anexo 2 ..... *110*

Anexo 3 ..... *111*

Anexo 4 ..... *112*

Agradecimientos **114**

INTRODUCCIÓN

I-CÁNCER

I-1-Definición y Clasificación

El cáncer es una enfermedad de origen genético que resulta de la acumulación de cambios heredables en una célula. Estos cambios llevan a una proliferación descontrolada y a la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos. La mayoría de las mutaciones que originan un cáncer son somáticas, sin embargo aproximadamente el 1 % de todos los cánceres se dan en individuos que presentan una predisposición heredada a la enfermedad (Fearon ER., 1997). Se ha reconocido que existen más de 100 tipos diferentes de cáncer. Cada uno de ellos posee un desarrollo característico, definido por la edad media de los individuos en los que aparece, el ritmo de crecimiento y la tendencia a extenderse y ser letal. Por ello, cada tipo puede ser considerado como una enfermedad distinta.

El crecimiento y renovación de los tejidos de un organismo está homeostáticamente controlado. Los diversos tipos celulares ya diferenciados se mantienen en cantidad y posiciones relativas correctas. Cuando una célula pierde el control de la proliferación se origina un tumor o neoplasia. Sin embargo, esto no necesariamente constituye un cáncer. De acuerdo a su comportamiento los tumores pueden ser clasificados en **"benignos"y "malignos"** :

En un **tumor benigno**, las células neoplásicas permanecen agrupadas en una única masa tumoral en su lugar de origen, sin invadir tejidos adyacentes y las células que los componen están bastante diferenciadas. Estos tumores son generalmente de crecimiento lento, pudiendo alcanzar volúmenes muy grandes. El tejido normal circundante está siempre bien demarcado. Comúnmente puede obtenerse una completa cura por remoción quirúrgica del tumor. Hablamos de **tumor maligno o cáncer**, cuando las células neoplásicas se parecen menos a las del tejido de procedencia, proliferan rápidamente invadiendo tejidos adyacentes y son capaces de migrar hacia otros órganos produciendo **"metástasis"**.

La invasividad tumoral y las metástasis son las mayores causas de fracasos en el tratamiento de pacientes con cáncer

Las neoplasias malignas se clasifican según el tejido y tipo celular del cual se originan:

- ***Carcinomas***: neoplasias de origen epitelial. Estos representan más del 90% de los cánceres humanos, siendo los más frecuentes los carcinomas de pulmón, mama y colon.
- ***Sarcomas***: neoplasias de origen mesenquimático (hueso, músculo, vasos sanguíneos, fibroblastos)
- ***Leucemias y Linfomas***: neoplasias derivadas de células hematopoyéticas.
- Tumores originados en tejido nervioso.

Cada una de estas amplias categorías tiene a su vez múltiples divisiones de acuerdo al tipo celular específico, la localización en el organismo y la estructura del tumor. El valor de dicha clasificación reside en que los diferentes tipos de cáncer se comportan de formas muy distintas.

Las transformaciones que convierten la proliferación celular original (tumor primario) en un tumor maligno e invasivo reciben la denominación general de ***progresión tumoral.*** Mientras que el proceso de transformación ha sido ampliamente estudiado y se sabe que requiere la activación de oncogenes y/o la desactivación de genes supresores de tumores, los mecanismos mediante los cuales una célula transformada comienza a invadir y luego metastatizar (progresión tumoral) permanecen aún poco claros.

I-2-Progresión Tumoral

La progresión neoplásica es un proceso de múltiples etapas que depende de factores propios de la célula tumoral y de factores del huésped. El primer paso de la cascada metastásica consiste en atravesar la matriz extracelular (MEC) que se interpone entre el tumor primario y el sistema circulatorio. Una vez que el tumor ha penetrado la membrana basal y la MEC inmediatamente adyacente, las células deben llegar a la circulación. Este paso es facilitado por el hecho de que las células tumorales pueden secretar una serie de factores angiogénicos capaces de estimular la vascularización del

tumor (Folkman, J. y Klagsbrus, M., 1987). Como los nuevos vasos generados en el tumor tienen generalmente paredes discontinuas, la penetración de las células tumorales en la circulación es un evento altamente probable. Una vez en circulación las células tumorales pueden interactuar con plaquetas y leucocitos. Se postula que la interacción de las células tumorales con las plaquetas sería un paso importante en la metástasis. El rol de las plaquetas en el proceso metastásico sería proteger a las células tumorales que se arrestan en los capilares de un determinado órgano y conferirles mecanismos de adhesión adicionales (Languino, LR. y col., 1993). Las células tumorales también pueden interactuar con leucocitos. Los leucocitos poseen mecanismos adhesivos los cuales favorecerían la localización ("homing") de las células tumorales en ciertos órganos blanco (Lasky, L., 1992). Evadiendo la respuesta inmunológica la célula tumoral sale de la circulación y produce una metástasis, a partir de una nueva interacción generada con su tejido blanco.

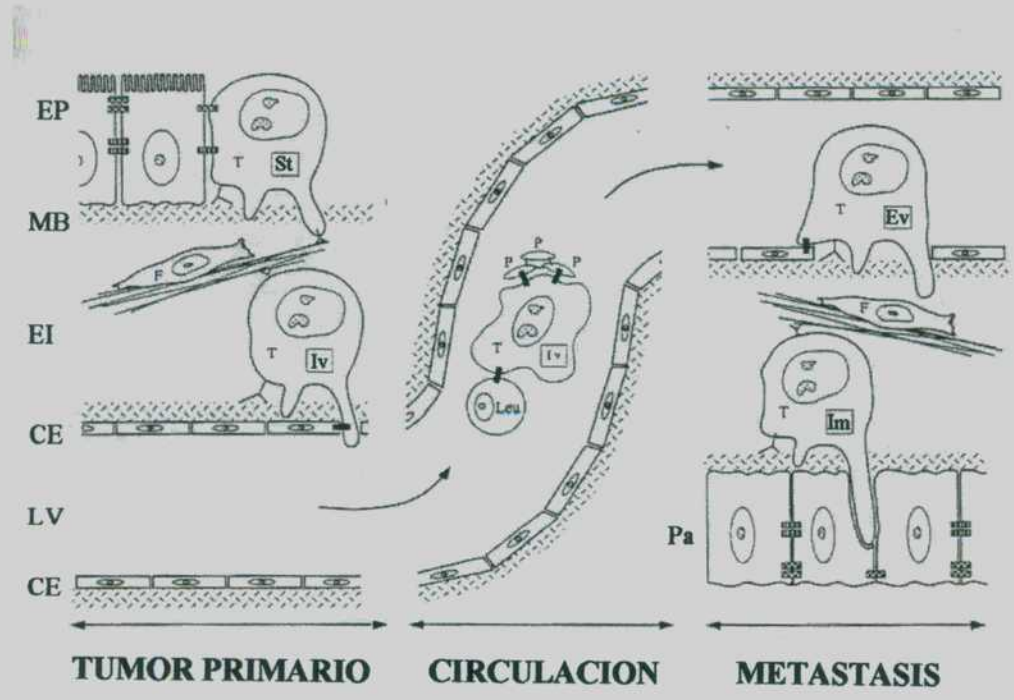


Figura 1: Esquema del proceso de invasión y metástasis. *T-Célula transformada invadiendo el tejido adyacente,* ***St****- invasión del estroma,* ***EI****-estroma intersticial con fibroblastos (****F****),* ***Iv****-intravasación,* ***IV****-transporte a través del aparato circulatorio,* ***Ex****-extravasación,* ***EP****-epitelio normal,* ***BM****-membrana basal,* ***EC****-células endoteliales. Dentro del lúmen vascular (****LV****), células tumorales (****T****) interactuando con leucocitos (****Leu****) y plaquetas (****P****).* ***Im****: invasión desde el*

estroma perivascular al órgano blanco, ***Pa****- parénquima en el sitio de metástasis. Adaptado de Van Rot, F. y Mareel, M (1992).*

A lo largo de este proceso, la célula tumoral debe regular en forma estricta y ordenada (en tiempo y localización) su capacidad de proteólisis y adhesión a la MEC de modo tal de permitirle inicialmente desprenderse del tejido de origen, para finalmente anidarse en otro tejido a distancia produciendo el foco metastásico. Muchas células tumorales metastatizan preferencialmente en ciertos órganos (Alby, L. y Auerbach, R., 1984). Además de la anatomía del sistema circulatorio, existen otros factores involucrados en la selectividad del órgano a invadir. Uno de ellos es el repertorio de moléculas de adhesión expresado por las células metastásicas y el otro es la presencia de los factores de crecimiento apropiados en el parénquima del órgano blanco. Durante la cascada metastásica, las células tumorales deben presentar variaciones en la capacidad adhesiva célula-célula y célula-matriz, dependiendo de la etapa del proceso metastásico.

Para describir los eventos bioquímicos que ocurren durante la invasión de la célula tumoral a la MEC Poste y Fidler (1980) propusieron un proceso de 3 etapas.

1) En la primera etapa la célula tumoral se adhiere a la MEC.

2) El segundo paso consiste en la degradación local de la MEC por proteasas asociadas a la célula tumoral o a las células del estroma adyacente.

3) En la tercera etapa ocurre la migración de la célula tumoral a través de la MEC modificada por la proteólisis.

La invasión tumoral ocurriría por repetición cíclica de estas 3 etapas.

El comportamiento invasivo también se ha descripto en procesos normales como angiogénesis, desarrollo de tejidos embrionarios y extraembrionarios. La adquisición de la capacidad invasiva depende de alteraciones en el control temporal y espacial de la expresión del fenotipo invasivo observado en procesos normales.

El proceso de progresión tumoral involucra tanto interacciones célula-célula, así como interacciones célula-matriz. Las moléculas que modulan las interacciones célula-célula pueden ser agrupadas en cuatro familias: **a)** Superfamilia de las inmunoglobulinas, **b)**

Selectinas, **c)** Caderinas, **d)** Integrinas. Mientras que las moléculas involucradas en las interacciones célula-matriz son fundamentalmente: **a)** las Integrinas, **b)** las proteasas y **c)** una nueva familia de proteínas recientemente descripta como "anti-adhesivas".

I-3-Matriz Extracelular (MEC) e invasividad celular

Durante muchos años, la investigación acerca de los mecanismos que contribuyen al proceso de invasión y metástasis se centraron en la capacidad proteolítica intrínseca de las células tumorales. El paradigma subyacente consistía en aceptar que la célula tumoral se "asienta" sobre una matriz extracelular "estática" que actúa únicamente como "barrera" que debe ser degradada para poder avanzar. Sin embargo, la falta de correlación estricta entre capacidad proteolítica e invasiva/metastásica sugiere que la adquisición de un fenotipo metastásico es el resultado de un complejo mecanismo que involucra la regulación de genes asociados con la interacción global de la célula tumoral con la matriz extracelular. Actualmente se reconoce que la matriz juega un rol mucho más activo y complejo en la regulación del comportamiento de las células que se hallan en contacto con ella, influyendo en su capacidad de adhesión, migración, proliferación, morfogénesis y diferenciación (Adams, JC. y Watt, FRM., 1993; Lelievre, S. y col., 1996).

La matriz extracelular tiene una composición tan compleja como corresponde a sus funciones. Está formada por una serie de macromoléculas que incluyen distintos tipos de colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas (Alberts, B. y col., 1994). En términos generales podemos distinguir dos tipos de MEC. El primero, llamado matriz intersticial, que rodea a las células del tejido conectivo, está compuesta fundamentalmente por glicosaminoglicanos, glicoproteínas (fibronectina) y fibras (colágeno, elastina). El segundo tipo de MEC se denomina membrana basal, separa a las células endoteliales o epiteliales del tejido conectivo y está compuesto fundamentalmente por glicoproteínas (laminina, colágeno IV, entactina) y proteoglicanos. La composición y el recambio de la MEC determina el comportamiento de las células que se asientan sobre ella, las cuales a su vez regulan la composicion de la matriz (Roskelley, CD. y Bisell, MJ., 1995).

A pesar de que el rol de la MEC en el establecimiento de un fenotipo diferenciado en distintos tejidos está bien documentado, las evidencias más fuertes que apoyan el rol de

la MEC provienen de observaciones de que muchas, si no todas las células transformadas, presentan interacciones anormales con el medio extracelular. En algunos tumores de mama, las células epiteliales son incapaces de producir una membrana basal organizada que normalmente induciría el arresto del crecimiento, mientras que en otros cánceres de mama, las células malignas no son capaces de reconocer a la MEC debido a la expresión inadecuada de sus receptores (ver Integrinas). Las causas que subyacen a la comunicación alterada entre la célula tumoral y la MEC que la rodea, es una de las pocas características que tienen en común (junto con la desregulación del ciclo celular) una amplia variedad de tumores. Existen evidencias que demuestran que la corrección de las interacciones célula-MEC permiten restaurar las funciones normales diferenciadas de la célula tumoral, independientemente de las alteraciones genéticas. Un clásico ejemplo sobre el rol que juegan los componentes de la MEC sobre el fenotipo neoplásico es el de fibronectina. Giancotti y Ruoslathi (1990) han descripto que células tumorigénicas CHO (carcinoma de ovario de hamster) transformadas con el receptor de fibronectina son capaces de acumular mayor cantidad de fibronectina en la matriz, reducen su capacidad de migrar y pierden su capacidad tumorigénica. Reciéntemente Pasqualini y col. (1996) han descripto que el tratamiento de células de osteosarcoma y de melanoma *in vitro* con una forma polimérica de fibronectina, la superfibronectina, es capaz de inhibir la capacidad metastásica de estas células *in vivo.*

Actualmente se acepta que ciertos niveles de adhesión al sustrato son requeridos para la migración. Mientras que una adhesión moderada a una MEC pobremente organizada facilitaría la migración, una fuerte interacción con una matriz altamente organizada mantendría a las células que interactúan con ella, inmovilizadas. Podemos decir que el comportamiento de las células malignas invasivas y metastásicas depende tanto de cambios en la composición de la MEC que rodea al tumor primario, como de las propiedades adhesivas de las células tumorales. El estroma intersticial, así como la membrana basal, sirven como barrera para las células tumorales; sin embargo, pueden permitir la migración celular a través de adhesiones transientes. Así, la MEC puede tanto obstruir como asistir el proceso de metástasis. Como señalamos previamente, las moléculas involucradas en la regulación de la adhesión celular a las proteínas de la MEC incluyen principalmente a la familia de las integrinas, las proteasas de la matriz y a las proteínas anti-adhesivas.

I-3.1. Integrinas

El término integrina indica que se trata de moléculas que integran las actividades de la MEC y el citoesqueleto. Estas moléculas no sólo estarían involucradas en procesos de adhesión celular sino también en los procesos de transducción de señales.

Las integrinas constituyen una familia de receptores de superficie celular descriptos por primera vez en 1987. Son heterodímeros de subunidades α y β unidas de forma no covalente. Hasta el momento se han identificado 15 subunidades α y 8 subunidades β, las cuales pueden combinarse para formar más de 20 integrinas conocidas, cada una de las cuales presenta un patrón de expresión específico. Los diferentes tipos celulares ensamblan y expresan distintos complejos αβ. La combinación de subunidades α y β determina la especificidad de ligando (Giancotti, FG. y Mainiero F., 1994). Sin embargo, algunas integrinas son capaces de unir varias glicoproteínas y muchas glicoproteínas son capaces de unirse a distintas integrinas (ver anexo 1). Si bien la mayoría de los ligandos son proteínas de MEC, también participan en interacciones célula-célula uniéndose a distintos miembros de la familia de inmunoglobulinas (Springer, TA., 1990; Chuluyán, HE. e Issekutz, 1993; Ruegg, C. y col, 1992; Piali, L. y col., 1995). Los cationes divalentes son esenciales para la función de estos receptores. Las integrinas, a diferencia de los receptores hormonales unen sus ligandos con menor afinidad. Esto permite a las células interactuar y analizar el microambiente circundante sin perder movilidad ni adhesión.

Estas glicoproteínas pueden presentarse en estado activado o desactivado, los cuales están dados por cambios conformacionales (Hynes, RO., 1992). De esta forma, las células pueden regular su adhesividad a sustratos regulando el nivel de expresión y activación de estas moléculas. Los dominios extracelulares de estas moléculas se unen a los ligandos presentes en la MEC o en la superficie de otros tipos celulares induciendo cambios en la organización del citoesqueleto, fosforilación de proteínas y expresión de genes específicos.

I-3.1.1. Interacción con el citoesqueleto

Las interacciones entre integrinas y los elementos del citoesqueleto lleva a la formación de estructuras especializadas como son las placas de adhesión focal y los hemidesmosomas.

La cara citoplasmática de las placas de adhesión focal contienen enzimas y proteínas estructurales o adaptadoras que establecen el vínculo entre el espacio extracelular y el citoesqueleto. Las integrinas se concentran en las placas de adhesión focal en forma dependiente del ligando. Mientras que en fibroblastos normales, las integrinas están agregadas en contactos focales, los fibroblastos transformados carecen de estas estructuras y las integrinas se encuentran distribuidas en forma difusa en la superficie celular (Keely y col, 1998).

Después de unirse al ligando extracelular, las integrinas sufren cambios conformacionales que llevan a la interacción de la porción intracelular de la subunidad β con el citoesqueleto. Inmediatamente asociado al dominio citoplasmático de las integrinas se encuentran otras proteínas como **talina** la cual interactúa con otra proteína denominada **vinculina**, la cual vincula este complejo con los filamentos de actina a través de la α-actinina.

Los efectos de las integrinas en el comportamiento celular están mediados, al menos en parte, por la capacidad de promover el ensamblado de complejos que contienen elementos del citoesqueleto y de señalización. De esta forma, anormalidades en el citoesqueleto perturbarán los procesos de adhesión y señalización mediados por las integrinas. Algunas células tumorales presentan una serie de defectos a nivel del citoesqueleto (Burridge, K., 1986). Se ha descripto que fibroblastos transformados poseen un citoesqueleto de actina es deficiente en fibroblastos transformados y se cree que este fenómeno estaría dado por un aumento de la fosforilación de talina (Pasquale, EB. y col., 1986) y vinculina (Sefton, BM. y col., 1981; Raz, A. y col., 1986), que son intermediarios entre las integrinas y el citoesqueleto de actina. La contribución del citoesqueleto al fenotipo transformado ha sido evidenciada por estudios que muestran la normalización *in vitro* de fibroblastos transformados luego de la expresión ectópica de α-actinina y vinculina (Gluck, U. y col., 1993; Fernández, JLR. y col., 1993).

I-3.1.2. Señalización por integrinas y diferenciación

La matriz extracelular puede influir en la diferenciación celular. Diversos estudios han demostrado que la presencia de fibronectina puede inhibir la diferenciación de condrocitos (West, CM. y col., 1979) y la fusión de mioblastos (Podleski, TR. y col., 1979) pero también promover la diferenciación de eritroblastos (Patel, VP. y Lodish, HF., 1987). En contraposición, se ha descripto que laminina promueve la fusión de mioblastos (Von der Mark, K. y Ocalan, M., 1989). En cuanto a la regulación de la expresión génica se ha observado que anticuerpos contra el receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1$ inducen la expresión de proteasas en fibroblastos sinoviales (Werb, Z. y col, 1989). En monocitos, la adhesión al sustrato induce la expresión de genes que codifican para citoquinas y factores transcripcionales entre los que se incluyen c-fos, c-jun e Iκ-B (Haskill, S. y col., 1988; Shaw, RJ. y col., 1990). El efecto de las integrinas en la diferenciación depende del tipo celular. Las células epiteliales de mama expresan proteínas de la leche en respuesta a estímulos hormonales sólo si estas células se mantienen en la MEC adecuadas (Streuli, CH. y col., 1991); esto ha llevado a la identificación de "elementos respondedores a la interacción con la MEC" en el promotor del gen de la β caseína (Schmidhauser, C. y col., 1992). Otro ejemplo es la expresión del gen de albúmina en las células hepáticas que es inducido sólo si las células son cultivadas sobre geles de colágeno (Di Persio, CM. y col., 1991).

I-3.1.3. Integrinas y progresión tumoral

Varias líneas de evidencia indican que las integrinas juegan un rol clave en el comportamiento maligno de las células neoplásicas. Existe una abundante literatura dedicada a la comparación de distintas integrinas en tejidos normales y tumorales (ver anexo 2). En general las células tumorales pierden la expresión de integrinas que son esenciales para el mantenimiento de las adhesiones estables y la organización tisular, pero retienen la expresión de otras integrinas que estarían involucradas en la migración.

La integrina α5β1,el clásico receptor de fibronectina, juega un rol complejo e interesante en la regulación del crecimiento tumoral. Los primeros estudios, realizados sobre la línea celular CHO, demostraron una correlación inversa entre los niveles de expresión de α5β1 y la capacidad tumorigénica de estas células (Giancotti, FG. y Ruoslahti, E., 1990). Este mismo resultado fue posteriormente descripto en células de carcinoma de colon que sobreexpresan α5β1 (Varner, JA. y col., 1997). De esta forma α5β1 actuaría como un regulador negativo del crecimiento celular.

Observaciones similares se han llevado a cabo sobre la integrina α2β1, que es expresada en bajos niveles en células poco diferenciadas, con alta capacidad invasiva, de carcinomas de mama. La disminución de los niveles de esta integrina en células de mama frena la diferenciación celular y aumenta la motilidad celular, mientras que la sobreexpresión de α2β1 en células de carcinoma de mama invasivo, poco diferenciadas, restaura la diferenciación y disminuye la motilidad de las mismas (Zutter, MM. y col., 1993).

La familia de integrinas αv también ha sido involucrada en procesos tales como la progresión tumoral y angiogénesis. Se ha descripto que esta integrina está aumentada en melanomas invasivos (Albelda, SM. y col., 1990) y en glioblastomas (Gladson, C. y Cheresh, DA., 1991).

Una serie de observaciones indican que las integrinas también estarían involucradas en la elección del órgano blanco ("homing") de las células metastásicas (Abelda, SM. y col., 1990; Chan, BMC. y col., 1991; Ruiz, P. y col., 1993).

I-3.2. Proteasas

La composición de la MEC y su recambio depende en parte de la concentración, expresión y activación de enzimas capaces de degradar los distintos componentes de la matriz y de la presencia de inhibidores de estas enzimas. Las enzimas proteolíticas regulan el ensamblado de los componentes de la MEC, participan en la remodelación de su estructura y permiten la liberación de fragmentos bioactivos y de factores de crecimiento. Las principales enzimas involucradas en la degradación de la MEC se resumen en la Tabla 1.

I-3.2.1. Proteasas e invasividad celular

La proteólisis de la MEC es un proceso que ocurre en tejidos normales, pero está limitada en duración y está sometida a una estricta regulación a distintos niveles. Es un evento común que tiene lugar durante la implantación del trofoblasto, la morfogénesis embrionaria, la remodelación tisular, la migración controlada de monocitos (Moller, 1993), neutrófilos y linfocitos (Ossowski y col., 1979), la invasión por bacterias o parásitos, la angiogénesis, y en procesos patológicos como artritis reumatoidea y cáncer (Krane, SM., 1994; Birkedal-Hansen, H. 1987; Woessner JF., 1991). Un aspecto general de los neoplasmas malignos es el desbalance de la proteólisis que favorece los procesos invasivos. Esencialmente, las proteasas actúan facilitando la progresión tumoral a través de la degradación de las barreras tisulares, permitiendo la liberación de factores de crecimiento e induciendo la desdiferenciación celular (Coussens y Werb Z., 1996). Se ha descripto que el bloqueo de la función de ciertas proteasas de la MEC puede disminuir el crecimiento tumoral (Martin y col, 1997; Wilson y col, 1997), mientras que su sobreexpresión aumenta la capacidad tumorigénica lo cual sugiere que estas contribuyen al proceso neoplásico. Sin embargo, la producción de enzimas proteolíticas en el microambiente tumoral no es un proceso desenfrenado. La célula tumoral conjuga la proteólisis y la adhesividad adquiriendo la capacidad para ejercer invasión en un lugar y a un tiempo que para una célula normal sería inapropiado.

La pérdida de ciertos componentes de la MEC puede resultar en la pérdida de las señales apropiadas, la morfología y el fenotipo diferenciado. Trabajos llevados a cabo por Talhouk y col.(1992) y Sympson, CJ. y col (1994) han demostrado que la degradación proteolítica de la membrana basal por MMPs resulta en la apoptosis de las células epiteliales mamarias. Por otra parte se ha observado que la proteólisis de laminina por una proteasa de tipo serina, plasmina, también resulta en la apoptosis de neuronas hipocampales *in vivo*. Recientes estudios han sugerido que la laminina procesada proteolíticamente y otros componentes de la membrana basal pueden generar señales que son distintas a las generadas por los componentes de la MEC intactos (Sage HE y col., 1997). En algunos casos, el procesamiento proteolítico de la MEC resulta en la exposición de sitios crípticos en las moléculas de MEC que resultan en cambios en la especificidad de las integrinas que pueden unirse a ellos.

Tabla 1: Proteasas y sus sustratos

Modificado de Werb, Z., 1997

MMP-1	collagenasa-1	Col I, II, III, VII, X, GL,EN,LP
MMP-8	collagenasa-2	AG, TN, L-selectin, IGF-BP
MMP-13	collagenasa-3	Pro-MMP-2, -9, α2M, α1PI
MMP-2	gelatinasa A	GL, Col I, IV, V. VII, X, XI, EL
MMP-9	gelatinasa B	FN, LN, LP, AG, galectin-3, IGF-BP, VN, FGF receptor-1, Pro-MMP-I, -9, -13.
MMP-3	stromelisina-1	PG, LN, FN, GL, Col III, IV
MMP-10	stromelisina-2	V, IX, X, XI, LP, FB, EN, TN, VN.
MMP-7	matrilisina	Pro-MMP-I, -8, -9, -13, α1PI, α2M, L-selectina.
MMP-12	metaloelastasa	EL, FB, FN, LN, PG, MBP, PL, α1PI
MMP-14	MT1-MMP	Col I, II, III, GL, FN, LN, VN
MMP-16	MT2-MMP	PG, Pro-MMP-2, -13, α1PI, α2M.
MMP-11	stromelisina-3	LN, FN, AG, α1PI, α2M
[illegible]		
[illegible]		
uPA		PL, FN, HGF
tPA		
Plasmina		FB, FN, TN, LN, AG, PG, Pro-MMP-1, -3, -9, -14, C1, C3, C5
Trombina		FB, Pro-MMP-2,syndecan

***Abreviaturas**: Colágeno tipo, Col; Agrecan, Ag; Tenascina, TN.; Gelatinas, GL.; entactina, EN; Fibronectina, FN.; Laminina, LN;Vitronectina, VN.; Proteoglicanos, PG.; Elastina, EL ; Fibrina/Fibrinógeno, FB ; proteína básica de mielina, MBP ; factor de crecimiento de hepatocitos, HGF.; α1-inhibidor de proteasa, α1PI ; α2-macroglobulina α2M.*

I-3.2.2. Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Dentro de las proteasas se considera que las MMPs cumplen un rol clave en la diseminación de las células tumorales. Numerosos estudios han encontrado correlación entre la secreción de MMPs por distintas líneas celulares y el potencial metastásico de estas células (Liotta, L.A., 1980b; Nakajima, M., 1987; Pozzatti, R., 1986; Stettler-Stevenson, W.G., 1990).

Las MMPs constituyen una familia de proteasas secretadas y de membrana, dependientes de zinc, con características catalíticas y estructurales bien definidas (Birkedal-Hansen H, 1995). Estas enzimas son secretadas como pro-enzimas latentes que luego de sufrir un clivaje del dominio NH_2 terminal se activan. Hasta el momento se han descripto 13 miembros dentro de la familia, los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a la especificidad de sustrato (Tabla 1). La actividad de las metaloproteasas está altamente regulada; esto apoya la idea de que estas proteínas cumplirían funciones biológicas importantes en procesos normales. En la MEC, la actividad de las MMPs está estrictamente regulada por una familia de inhibidores naturales conocidos como TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Hasta el día de hoy se han identificado 3 miembros dentro de esta familia : TIMP-1 (Cawston, T.E. y col, 1981; Stricklin, G.P. y Welges H.G., 1983), TIMP-2 (De Clerck, Y.A., 1989; Stetler-Stevenson, W.G. y col, 1989; Goldberg, G.I. y col, 1989) y TIMP-3 (Uria, J.A. y col, 1994). Estos inhibidores son capaces de regular la actividad de las MMPs a distintos niveles y con diferentes afinidades (Birkedal-Hansen H, 1995). Varios grupos han descripto la disminución de la capacidad invasiva de células tumorales *in vitro* y la capacidad de formar metástasis *in vivo* como consecuencia del agregado exógeno o sobreexpresión de inhibidores de MMP (Alvarez, O.A. y col, 1990; Albini, A. y col, 1991; De Clerck y col., 1989).

Dentro de los miembros de la familia de las MMPs existen evidencias que sostienen una correlación positiva entre la actividad de la MMP-2 y la capacidad invasiva celular. Esta proteasa se caracteriza por la capacidad de clivar colágeno IV, uno de los principales componentes de las membranas basales. Nakajima y colaboradores (1993) han descripto una correlación directa entre la capacidad metastásica y la actividad gelatinolítica de MMP-2 en adenocarcinomas mamarios. Por otra parte, los análisis inmunohistoquímicos han demostrado una elevada expresión de MMP-2 en carcinomas colorectales y gástricos (D'Enrico, A. y col., 1991; Monteagudo, C. y col, 1993; Levy,

AT., 1991). Por otraq parte Garbisa y col. (1992) han informadoaltos niveles de MMP-2 en plasma de pacientes con carcinoma de pulmón metastásico.

Las células tumorales no serían las únicas responsables del aumento de la producción de MMPs en el microambiente tumoral. Observaciones recientes sugieren que, en algunos carcinomas, los fibroblastos peritumorales serían los responsables de la producción de algunas MMPs, (Basset P. y col., 1990; Pyke, C. y col., 1993)

La activación de MMP-2 está asociada a la membrana plasmática y hay varias moléculas que han sido propuestas como activadores. Sato y col. identificaron la primera MMP de membrana como un activador de la MMP-2 (gelatinasa A) en la cascada proteolítica. Otros autores sostienen que el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y el receptor de vitronectina tipo integrina, $\alpha v\beta 3$ serían activadores de esta metaloproteasa (Brooks, PC. y col., 1996). La presencia de estos activadores sobre la membrana plasmática permite localizar la digestión de la matriz en el frente de invasión.

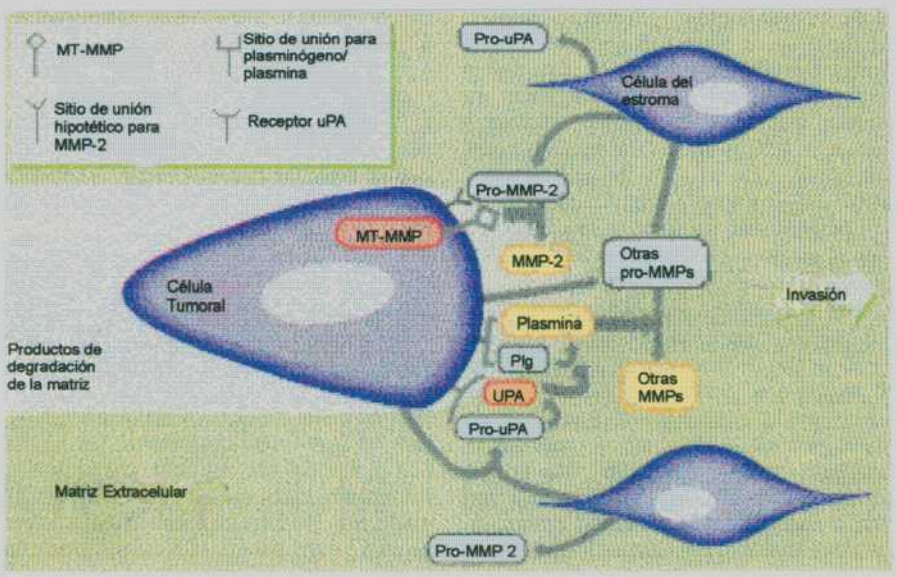


Figura 2: Esquema del proceso de proteólisis de la MEC mediado por células tumorales. *Modificado de Vassalli JD y Pepper MS, 1994*

I-3.3. Proteínas antiadhesivas

Como mencionamos previamente, las interacciones entre las células y la MEC son las principales determinantes de procesos como proliferación, migración y diferenciación. La MEC permite la adhesión, el estiramiento y la formación de contactos focales principalmente a través de las integrinas. Alternativamente, algunos componentes de la MEC pueden promover la desestabilización de los contactos focales e inducir el redondeamiento celular. SPARC (**S**ecreted **P**rotein **A**cidic and **R**ich in **C**ysteine) es el prototipo de una familia de proteínas asociadas a la MEC con características antiadhesivas. Junto con trombospondina y tenascina constituyen un grupo funcional de proteínas capaces de interactuar con receptores de la superficie celular, factores de crecimiento y proteínas de la MEC, pero no son componentes estructurales estables de la MEC de organismos adultos.

Las células invasivas son capaces de modular la MEC a través de mecanismos no degradativos. Estos incluyen la modulación de los receptores de moléculas de la matriz extracelular, así como también la secreción alterada de proteínas antiadhesivas que actuarían inhibiendo las interacciones de las moléculas de matriz con sus receptores. Como no existen similitudes estructurales entre SPARC, tenascina y trombospondina, se cree que estas proteínas ejercerían sus efectos antiadhesivos a través de distintos mecanismos. Las posibilidades incluyen: **1)** la activación de vías de señalización intracelulares (Janken, S. y col, 1989), **2)** la interferencia con los procesos de adhesión a moléculas de MEC (por ej: FN) (Erickson, H.P. y Bourdon M.A., 1989; Chiquet-Ehrismann, R., 1990; Lightner, V.A. and Erikson, H.P.; 1990), **3)** presentación o secuestro de factores de crecimiento y citoquinas (Lane, TF y col, 1991 ; Murphy-Ullrich, JE y col., 1990) y **4)** modulación de la actividad de proteasas.

I-3.3.1.Tenascina

Tenascina (TN)-C fue el primer miembro de la familia de tenascinas en ser descripto y es por lo tanto el más conocido y estudiado hasta el momento. Descripta por primera vez, en forma independiente, por distintos laboratorios a principios de los años 80 recibió distintas denominaciones: citotactina, hexabraquion, J1-200/220. Es una

glicoproteína que se expresa durante el desarrollo embrionario en diferentes áreas del cerebro, en cartílago y en células mesenquimáticas. A pesar de que la expresión de esta proteína en adultos está restringida y es mínima, se han descripto incrementos transientes en la expresión de tenascina durante los procesos cicatrización de heridas y oncogénicos (Erickson, HP. y Bourdon MA., 1989; Janken, S. y col., 1989; Mackie, EJ. y col, 1988; Daniloff, JK. y col , 1989). Tenascina-C es una proteína compleja con distintos dominios funcionales que presenta propiedades adhesivas y antiadhesivas. El agregado de tenascina soluble a células tumorales en cultivo resulta en la pérdida de contactos focales e intercelulares así como también en la inhibición de la migración celular y estiramiento sobre distintas proteínas de matriz extracelular (Chiquet-Ehrismann, R., 1990).

I-3.3.2.Trombospondina

Trombospondina participa en la agregación de plaquetas activadas (Mackie, EJ. y col., 1988) pero también es secretada por células mesenquimáticas y epiteliales. La naturaleza y las consecuencias de la interacción de trombospondina con las células es compleja y controvertida. Esta proteína ha sido descripta inicialmente como una proteína de adhesión para queratinocitos, melanoma y plaquetas (Asch, AS. y Nachmann, RL., 1989; Roberts, DD. y col., 1987; Varani, J. y col, 1988). Sin embargo, también es capaz de reducir las adhesiones focales en células endoteliales y fibroblastos (Murphy-Ullrich, JE. y Hook, M., 1989), las cuales son capaces de adherirse, pero no de estirarse en presencia de trombospondina (Lawler, J. y col., 1988). También se ha demostrado que esta proteína es capaz de inducir la quimiotaxis de neutrófilos y células endoteliales (Mansfield, PJ. y col., 1990; Taraboletti, G y col., 1990) e inhibir la migración de células endoteliales hacia factores angiogénicos, como bFGF (Good, DJ. y col., 1990). En embriones murinos, trombospondina es expresada en áreas de activa organogénesis y morfogénesis tisular (O'Shea, KS. y Dixit, VM., 1988).

I-3.3.3.SPARC

La proteína SPARC (**S**ecreted **P**rotein **A**cidic and **R**ich in **C**ysteine), también denominada Osteonectina, BM40 y 43 kDa, es una proteína de la MEC asociada con procesos de morfogénesis, proliferación y migración celular (Lane, TF. y Sage, H., 1994b). Esta proteína fue descripta por primera vez en 1981 por Termine y col. Inicialmente fue caracterizada como la proteína mayoritaria de hueso exceptuando el colágeno. Aunque su rol específico sigue siendo difícil de determinar se ha observado que se encuentra ampliamente distribuída en tejidos de origen humano y murino y fuertemente conservada a nivel evolutivo, sugiriendo una fuerte presión evolutiva para conservar intacta la función de esta proteína.

II-SPARC

II-1.Propiedades bioquímicas de SPARC

El peso molecular de la proteína madura deducida a partir del cDNA es de 32.517 Da, con un PI de 4.7. Las modificaciones postraduccionales resultan en una glicoproteína secretada con un PM aparente de 40-43 kDa en geles de SDS-PAGE (Hughes, RC. y col., 1987). SPARC es capaz de unir cationes divalentes, como Ca^{2+} y Cu^{2+}, así como también varios tipos de colágenos (Termine, J. y col, 1981; Sage, H. y col, 1984; Lane, TF. y Sage, EH., 1990; Mayer, U. y col, 1991), albúmina, trombospondina (Sage, H., 1984; Clezardin, P. y col, 1988) y vitronectina (Rosenblatt y col., 1997). También es capaz de unirse a membranas de plaquetas y células endoteliales (Yost, JC y Sage EH, 1993; Breton-Gorius J y col, 1992).

En cuanto al estado de fosforilación de SPARC, existen controversias sobre la existencia de fosforilación fisiológicamente relevante de SPARC. Esta modificación parecería ser específica de tejido. SPARC secretada por células bovinas y por fibroblastos no está fosforilada (Tracy, RP. y col., 1988; Sage EH. y col., 1989; Nagata, T. y col., 1991) y contiene carbohidratos complejos (Hughes, RC. y col., 1987). Se sabe que las modificaciones tejido específicas pueden influir en la afinidad de SPARC por la MEC. Se ha descripto que la proteólisis parcial de SPARC en hueso resulta en un aumento de la capacidad de unión de la proteína a fibras de colágeno tipo I (Tyree, B., 1989). También se ha observado que SPARC aislada de células en cultivo y de plaquetas difiere de SPARC derivada de huesos. La principal diferencia reside en la naturaleza y el grado de las modificaciones post-traduccionales. SPARC derivado de plaquetas y aislada de células en cultivo contiene carbohidratos complejos (Hughes, RC. y col., 1987), mientras que la proteína aislada de hueso contiene principalmente azúcares con alta manosa (Kelm, RJ. y col, 1991).

El cDNA de SPARC de vertebrados codifica para una proteína de 298-304 aa, donde los primeros 17 aa constituyen el péptido señal. La proteína está compuesta por 3 dominios estructurales con distintas funciones. (Maurer, P. y col.,1995).

Dominio I (aa 3-51): codificado por los exones 3 y 4, es altamente ácido y une Ca^{2+} con baja afinidad (Kd 10^{-3}-10^{-5}M), lo cual le confiere sensibilidad a cambios en la concentración de Ca^{2+} (Mayer, U. y col, 1991)

Dominio II: codificado por los exones 5 y 6, contiene 10 Cisteínas (Cys). Este dominio contiene sitios de unión a Cu^{2+} y la secuencia GHK. Este dominio está involucrado en la regulación de la proliferación celular y de procesos angiogénicos (Funk, SE. y Sage, EH., 1993; Funk, SE. y Sage, EH., 1993; Lane, TF. y col, 1994), así como también en la disociación de los contactos focales (Murphy-Ullrich JE. Y col., 1993).

Dominio III (aa 133-285): codificado por los exones 7, 8 y 9. Péptidos correspondientes a este dominio están involucrados en la regulación de la producción de metaloproteasas en células endoteliales y/o fibroblastos sinoviales de conejo (Tremble, PM. y col., 1993). Contiene un motivo "EF-hand" y une Ca^{2+} con un Kd de aproximadamente 10^{-7} M. Esta estructura está estabilizada por uniones puente disulfuro y estaría involucrada en la unión a colágeno dependiente de Ca^{2+}, en la disociación de los contactos focales (Murphy-Ullrich, JF. y col, 1995) y en la inhibición de la proliferación de células endoteliales (Sage, EM. y col., 1995).

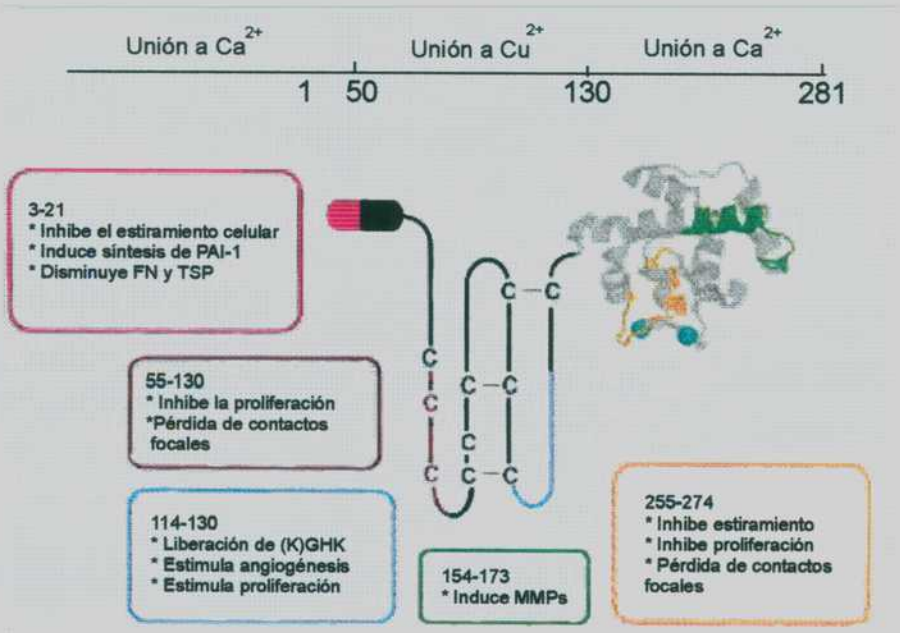


Figura 3 : Representación esquemática de la proteína SPARC.

II-2.Expresión de SPARC

Tanto en vertebrados como en gusanos nematodes, SPARC ha sido descripto como un gen de copia única. A pesar de que no existen evidencias de variantes de "splicing" (empalme) alternativo, en varias especies se observan mRNAs diferentes que aparcen como consecuencia de una poliadenilación alternativa (Lane, TF. y Sage, EH., 1994).

La localización de SPARC por técnicas de inmunohistoquímica y por hibridización *in situ* ha demostrado que la expresión de SPARC está espacial y temporalmente regulada durante el desarrollo (Nomura, S. y col, 1988; Holland, PWH. y col, 1987)

En ratones se observó una elevada expresión de SPARC al día gestacional 9 (G9) del desarrollo y esta se localiza en el primordio del corazón, en los somitos y en las membranas extraembrionarias (Holland, PWH. y col, 1987; Sage, EH. y col, 1989). Al día G14, la expresión de SPARC se asocia a huesos en desarrollo, epitelios (piel e intestino) y vasos sanguíneos. En el adulto, la expresión se limita a glándulas, intestino y hueso, lo cual indica que SPARC estaría asociado a la remodelación tisular, al movimiento celular y a la proliferación en ciertos órganos (Lane, TF. y Sage, EH., 1994).

Durante los procesos de osteogénesis la expresión de SPARC es mayor en la región adyacente al "collar óseo" que rodea al cartílago en todos los huesos largos (Mundlos, S. y col, 1992; Oshima, O. y col, 1989). Es expresada por osteoblastos (Otsuka y col, 1984; Whitson y col, 1984) y odontoblastos (Fujisawa y Kuboki, 1989 ; Sage, EH. y col., 1992). A pesar de que la mayoría de las células hematopoyéticas no expresan SPARC, los megacariocitos (Kelm, RJJ. y col, 1992) y ciertas poblaciones de macrófagos involucrados en procesos de reparación (Raines, EW. y col, 1992; Reed, MJ. y col, 1993) contienen a dicha proteína. En el sistema nervioso central, SPARC ha sido detectada en ciertas células neuroendócrinas especializadas (Bergson, C. y col, 1993), en células gliales de Bergmann en el cerebelo (Mendis, DB. 1995) y en astrocitos del hipocampo (Mendis, DB. y col., 1994), pero no se ha observado expresión en neuronas corticales ni cereberales (Holland, PW. y col., 1987; Sage, EH. y col., 1989). La sobreexpresión de SPARC en vertebrados e invertebrados resulta en trastornos en el desarrollo del eje corporal que son consistentes con el rol de la proteína en los procesos de morfogénesis de estructuras (Schwarzbauer y Spencer, 1993). La perturbación de la expresión de SPARC en *Xenopus* y *C. elegans* resultó en anomalías durante el desarrollo y en algunos casos en la muerte del embrión (Purcell, L. y col.,

1993; Schwarzbauer, J. y Spencer, CS., 1993). La expresión de SPARC es inducida en células endoteliales durante la formación de cordones endoteliales *in vitro* (Iruela-Arispe, ML. y col., 1991) y durante los procesos de angiogénesis *in vivo* (Reed, MJ. y col., 1992). El agregado de SPARC purificada sobre células endoteliales induce cambios en la morfología celular, en la síntesis proteica y en la proliferación (Sage, EH. y Bornstein, 1991) indicando que esta proteína cumple un rol importante sobre las funciones endoteliales.

En cuanto a la regulación de la expresión de SPARC, varios factores han sido descriptos como inductores específicos durante el desarrollo. Entre ellos el más estudiado ha sido TGF-β, dado que este factor está involucrado en la regulación de varias proteínas de MEC. Existen evidencias de regulación positiva de la expresión de esta proteína por TGF-β en fibroblastos humanos (Wrana, JL. y col, 1991; Lankat-Buttgereit, B. y col, 1991).

III-3-SPARC y MEC

SPARC, junto con otras glicoproteínas de secreción como trombospondina y tenascina han sido denominadas antiadhesinas (Lane, TF. y Sage, EH., 1994). El mecanismo por el cual trombospondina, tenascina y SPARC influyen el estiramiento celular parecería ser diferente ya que mientras trombospondina y tenascina tienen propiedades adhesivas y antiadhesivas (Sage, EH. y Bornstein, 1991; Chiquet-Ehrismann, R., 1991), SPARC no ha demostrado tener características adhesivas para células. La actividad anti-adhesiva de SPARC residiría en elementos de los dominio I y IV (Lane, TF. y Sage, EH., 1990).

SPARC inhibe el estiramiento celular sobre colágeno e induce redondeamiento de células endoteliales y fibroblastos cultivados (Sage, H. y col, 1989), disminuye los contactos focales (Murphy-Ullrich, JE. y col, 1991) y promueve el rearreglo del citoesqueleto (Goldblum, SE. y col, 1994). Estudios con la línea celular de carcinoma embrionario murino, F9, transfectada en forma estable con el cDNA codificante para SPARC en orientación sentido o antisentido evidencian que SPARC estaría involucrado en la morfología celular (Everitt, EA. y Sage, EH., 1993; Everitt, EA. y Sage, EH., 1992).

SPARC es liberada durante la degranulación de plaquetas y es sintetizada por fibroblastos y macrófagos en los sitios de reparación de heridas (Kelm RJJ y col, 1992 ; Reed MJ y col, 1993). La expresión transiente de la proteína en este proceso indicaría que SPARC podría actuar regulando la deposición o el ensamblado de las proteínas de MEC. Se ha descripto que SPARC se une a varias proteínas de la MEC, entre ellas : trombospondina (Sage, HE., 1984), vitronectina (Rosenblatt, S. y col., 1997) y distintos tipos de colágeno, incluyendo el colágeno tipo I, III, IV y V y se localiza en membranas basales especializadas durante el desarrollo.

La exposición de células endoteliales a SPARC exógena induce cambios en la síntesis de proteínas asociadas a la matriz extracelular. Se ha observado que SPARC estimula la producción del inhibidor del activador de plasminógeno I (PAI-I) (Hasselaar, P. y col, 1991) y también está asociado a una disminución en la síntesis de fibronectina y trombospondina durante procesos de angiogénesis (Lane TF y col, 1992). Kamihagi, K. y col. (1994) han reportado que en líneas celulares de osteosarcoma, fibrosarcoma y carcinoma de vejiga, SPARC regula negativamente la secreción de fibronectina y laminina. También se ha descripto que en fibroblastos SPARC induce la expresión de metaloproteasas involucradas en procesos de morfogénesis y remodelación de tejidos: colagenasa, estromelisina y gelatinasa MMP-9 (Tremble PM y col, 1993). De esta forma SPARC regularía la expresión de componentes de la matriz y la actividad de enzimas que actuarían regulando las interacciones con la MEC.

III-4-SPARC y factores de crecimiento

Se ha descripto que SPARC es capaz de regular la respuesta celular a distintos factores de crecimiento, como PDGF, bFGF y VEGF. Se ha observado que SPARC es capaz de interactuar con dímeros de PDGF AB y BB con alta afinidad (Kd : 10^{-9}M) inhibiendo la unión de este factor a su receptor en fibroblastos por lo cual SPARC regularía la actividad y distribución de PDGF (Raines, EW. y col., 1992; Floege, J. y col, 1992). También ha sido reportado que SPARC antagoniza el efecto del bFGF sobre la migración de células endoteliales (Hasselaar, P. y Sage, EH., 1992). En este caso SPARC no interactúa con bFGF ni bolquea la unión de este a su receptor. Aún no se conoce cuál sería su mecansimo de acción. Recientemente se ha descripto que SPARC es capaz de inhibir el efecto mitogénico del factor de crecimiento vascular,

VEGF, sobre células endoteliales. Este efecto sería mediado en parte, por la interacción directa de VEGF con SPARC (Kupprion, Ch. y col, 1998).

II-5-SPARC y proliferación celular

Trabajos recientes indican que SPARC funcionaría en forma directa o indirecta regulando la proliferación celular (Funk, SE. y Sage, EH., 1991; Funk, SE. y Sage, EH., 1993; Sage, EH., 1992). SPARC exógeno es capaz de inhibir la incorporación de ^{3}H timidina en un 90 % en cultivos sincronizados de células endoteliales de aorta bovina. Experimentos llevados a cabo con péptidos sintéticos que representan la primera región catiónica del dominio II (aa 54-73) mostraron el mismo efecto inhibitorio (Funk SE y Sage EH, 1991), mientras que un péptido correspondiente a la secuencia de aa 113-130 estimuló la proliferación de estas células (Funk SE y Sage EH, 1993), evidenciando que la actividad proliferativa estaría enmascarada en la proteína completa.

III-6-SPARC y cáncer.

Mediante el uso de bancos de cDNA substractivos preparados a partir de mRNA de cáncer de mama, se clonó un cDNA cuya secuencia completa demostró ser codificante para SPARC (Podhajcer OL y col, 1996). Utilizando técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica se observó que la expresión de SPARC estaba asociada a las células tumorales localizadas en el frente de expansión de la masa tumoral y a los fibroblastos en contacto directo con las células malignas del carcinoma mamario humano y murino. Estos trabajos iniciados por el Dr. Podhajcer en 1992 junto con las evidencias que indican la expresión de SPARC en los procesos de remodelación de tejidos y durante el desarrollo embrionario, nos llevó a plantear el estudio de la expresión de esta proteína en melanoma, uno de los cánceres cuya incidencia más se ha incrementado en los últimos años.

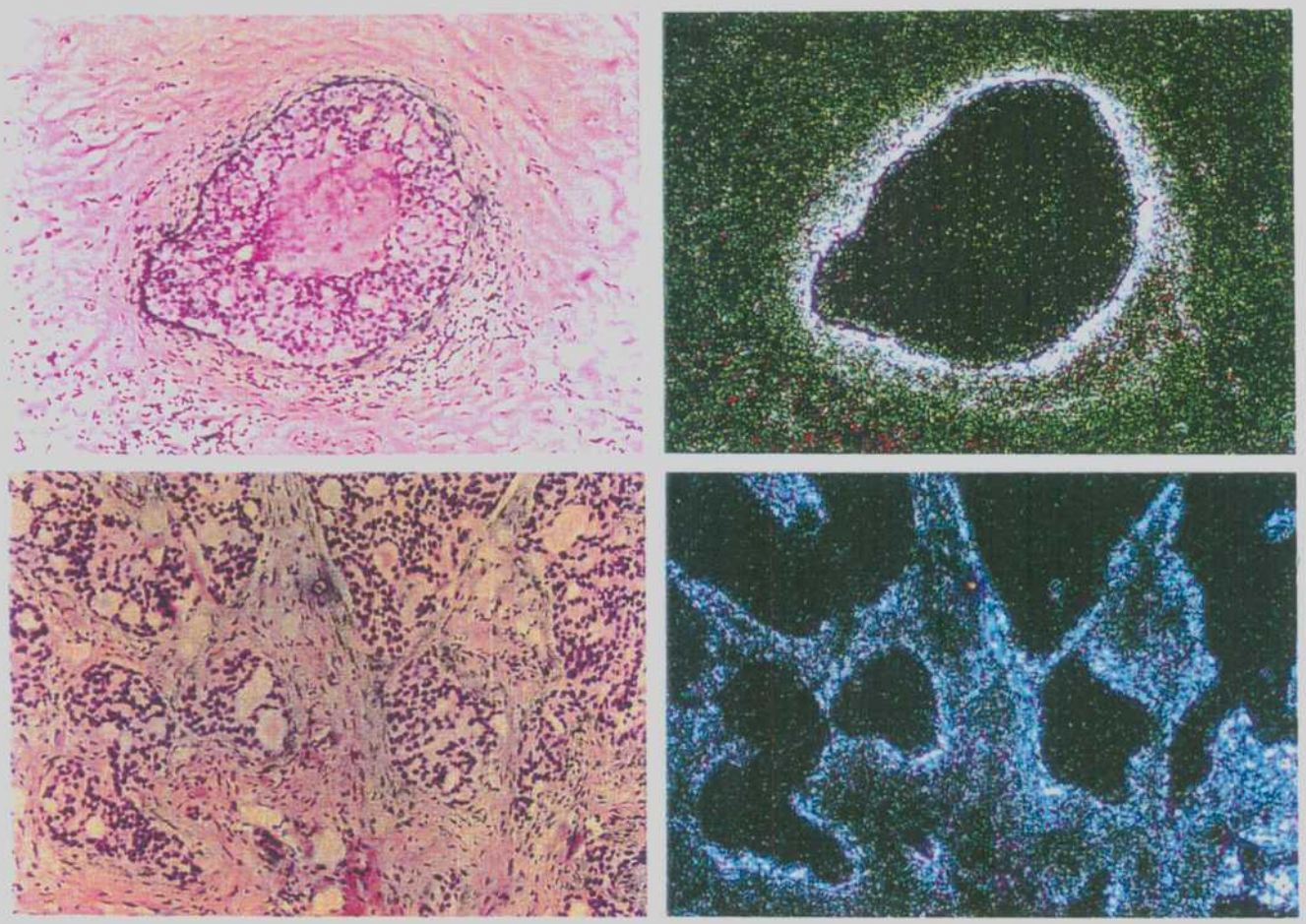


Figura 4: Expresión de SPARC en cáncer de mama.

***A** y **B)** Carcinoma in situ; **C** y **D)** Carcinoma invasivo.*

***A** y **C)**Tinción con hematoxilina-eosina, **B** y **D)** hibridización in situ utilizando una sonda de cDNA de SPARC marcada ^{35}S.*

Reproducido de Podhajcer y col, 1996.

III-MELANOMA CUTÁNEO

El melanoma resulta de la transformación maligna de las células pigmentadas de la piel, los melanocitos y es uno de los tumores más intensamente estudiados en los últimos años.

Históricamente, la descripción más temprana sobre el melanoma se remonta a los escritos de Hipócrates en el siglo V a.c. y la enfermedad ha sido descripta en varias momias incaicas. La figura 3 muestra un dibujo de un melanoma maligno, que data de aproximadamente 1835 (Ehring F, 1995). Esta ilustración acompañaba a la descripción del profesor de cirugía Cruveilhier (1797-1874) : *"...La escición se vió seguida de una recidiva. La subsiguiente amputación de la mano consiguió una curación local, pero aparecieron metástasis en los pulmones, el corazón, estómago..."* Sin embargo, el término melanoma fue sugerido por primera vez por Carswell en 1938 en un trabajo que describe las características malignas del tumor (Balch CH.M. y col., 1993).

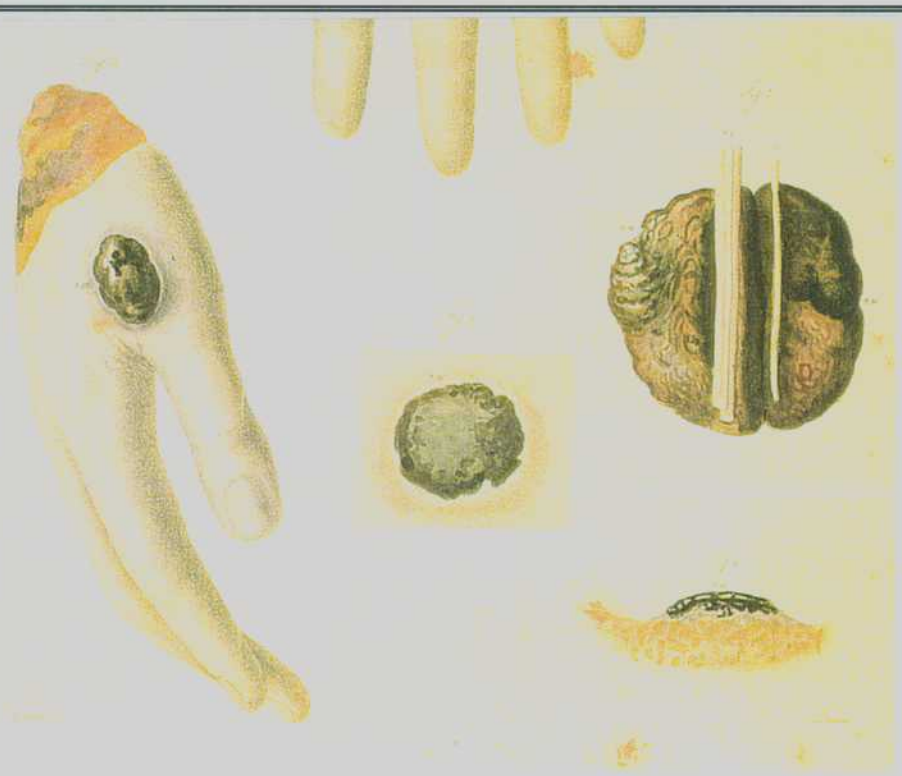


Figura 5 : Melanoma maligno. *Reproducido deBailliere, JB; 1829-1835)*

El melanoma cutáneo es considerado un tumor de comportamiento impredecible ya que el pronóstico puede variar entre una remisión espontánea (en un porcentaje menor al 2 % de los casos de los casos) a una rápida progresión y muerte del paciente.

El interés sobre la investigación en melanoma tanto por investigadores clínicos como experimentales se ha desarrollado por una serie de razones:

1) El aumento de la incidencia de esta patología en los últimos 40 años.

2) La resistencia de los melanomas avanzados a las terapias convencionales, lo cual resulta en una alta tasa de mortalidad.

3) La accesibilidad a nevos cutáneos o lunares y a los melanomas para llevar a cabo estudios experimentales.

4) La facilidad de crecer células de melanoma metastásico *in vitro.*

III-1.Incidencia del Melanoma

El melanoma representa aproximadamente el 1 % de los cánceres de los Estados Unidos. Si bien corresponde al 3 % de los neoplasmas cutáneos, su potencial maligno se refleja en el hecho de que resulta en el 65 % de las muertes por cáncer de piel. La incidencia del melanoma es prácticamente igual entre hombres y mujeres. Sin embargo, se observan diferencias en la distribución de las lesiones. Mientras que en las mujeres la mayor parte de las lesiones se dan en las extremidades inferiores, en los hombres las lesiones son mas frecuentes en el tronco. Aproximadamente el 50 % de los melanomas se detectan en pacientes de menos de 55 años de edad y la aparición de melanoma en niños es extremadamente baja.

La incidencia del melanoma está creciendo en mayor proporción que cualquier otro tipo de cáncer, a excepción del cáncer de pulmón en mujeres, en los estados Unidos, Australia, el norte de Europa y en Canadá (Herlyn, M., 1993). Afortunadamente, el aumento en la incidencia de la enfermedad supera al aumento en la mortalidad como consecuencia de la misma. La creciente diferencia entre la incidencia y la mortalidad sugiere que las mejoras en el diagnóstico temprano y los protocolos de tratamientos han logrado retrasar la mortalidad de los pacientes como consecuencia de esta enfermedad.

Aún no se conocen los factores etiológicos que llevan al desarrollo del melanoma, Sin embargo hay 3 factores que deben ser considerados. **1)** La incidencia del melanoma es mayor en la población blanca que en cualquier otra raza y es 10 veces mayor en individuos blancos que en negros. Existe una correlación negativa entre el grado de pigmentación de la piel y el melanoma (Crombie IK, 1979). **2)** Estudios epidemiológicos y clínicos señalan un rol fundamental de la irradiación solar sobre el desarrollo del melanoma (Rigel DS, 1992). **3)** El melanoma puede ser hereditario. La suceptibilidad genética al melanoma fue descripta por primera vez en 1978 por Clark y Green en 2 familias (Greene MH y Fraumeni JF, 1979). Actualmente los melanomas familiares representan el 5-10% del total de casos de melanomas estudiados.

II-2-Progresión tumoral en el sistema melanocítico

El melanoma cutáneo resulta de la transformación maligna de los melanocitos. Los melanocitos residen en la piel, en la capa basal de la epidermis y son los responsables de la síntesis del pigmento "melanina". La síntesis de melanina ocurre en los "melanosomas".

Embriológicamente los melanocitos derivan de una población troncal de melanoblastos que se originan en la cresta neural inmediatamente luego del cierre del tubo neural. Los melanoblastos son células precursoras inmaduras que no producen pigmentos hasta el momento del nacimiento, con algunas excepciones como los genitales. Ultraestructuralmente estas células poseen premelanosomas (organelas precursoras de los melanosomas, que no poseen melanina) pero no presentan actividad de tirosinasa (enzima involucrada en la síntesis de melanina). La migración de los melanoblastos comienza muy temprano, entre la segunda y tercera semana de gestación del embrión humano y migran hacia la dermis embrionaria para alcanzar la epidermis a las 8-10 semanas. Los melanoblastos ya están comprometidos a diferenciarse en melanocitos antes o durante la migración desde el tubo neural. Los melanoblastos *in vivo* comienzan a melanizarse justo antes de llegar a su destino (Nordlund, JJ., 1986; Rawles, M., 1947; Weston, JA., 1970). La vía de maduración de los melanocitos no está muy clara pero se cree que habría 2 estadíos intermediarios entre melanoblastos y melanocitos maduros. En el lugar de destino, los melanocitos son células multidendríticas pigmentadas que se localizan principalmente en la base de la

epidermis. Los melanocitos maduros son positivos para tirosinasa. La melanina, el pigmento sintetizado por la enzima tirosinasa es transportada en melanosomas a través de las prolongaciones dendríticas hasta los queratinocitos. En el adulto, los melanocitos se dividen infrecuentemente, aproximadamente una vez al año (Pawelek, J., 1979). La población de melanocitos en la piel es particularmente densa en los nevos, comúnmente llamados lunares. También se encuentran en el ojo y otros epitelios, incluyendo oreofaringe, esófago, intestino delgado y grueso, vejiga, ano y vagina. También se han encontrado melanocitos en la cápsula de ganglios linfáticos dando lugar a la especulación de que algunos melanomas de origen primario desconocido podrían derivar de ganglios linfáticos.

Las células de melanoma crecen independientemente de los factores de crecimiento, poseen anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, son capaces de invadir otros tejidos y de metastatizar. Avances recientes en técnicas de cultivo han permitido delinear cuales son los factores que controlan el crecimiento de melanocitos normales y de células de melanoma. El estudio de los requerimientos para la proliferación *in vitro* de los melanocitos normales ha ayudado a identificar factores que están activados en células malignas y que serían potencialmente responsables de la independencia que exiben las células malignas a factores exógenos de crecimiento y diferenciación. Se han descripto cuatro grupos de factores que estimulan el crecimiento in vitro de melanocitos normales humanos: **1**-hormonas peptídicas: b-FGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina-1), insulina, EGF; **2**- cationes y proteínas que unen cationes: calcio, hierro, cobre, tirosinasa; **3**-agentes que incrementan los niveles intracelulares de cAMP: α-MSH (hormona estimulante de melanocitos alfa), subunidad β de la toxina del cólera, toxina del tétanos y prostaglandina F2a; **4**-activadores de la proteína kinasa C: ésteres de forbol (Herlyn, M. y Houghton, AN., 1992).

III-3-Evidencias clínicas y patológicas de la progresión tumoral

Las características clínicas e histopatológicas de la progresión tumoral en el sistema de melanocitos humanos ha sido ampliamente descripto.

Los **"nevos melanocíticos"** (lunares) pueden ser considerados como neoplasias benignas. Están presentes en casi todos los seres humanos, desde la infancia, alcanzando

su mayor número en jóvenes adultos y declinando en la vejez. Las observaciones histopatológicas sugieren que los nevos pueden regresar debido a una activa respuesta inmune (Wayte DM y col, 1968) o debido a la diferenciación y senescencia o atrofia (Goovaerts G y Buyssens N, 1988).

El término **"nevo displásico"** representa una lesión intermedia y está descripto como un nevo con una disposición arquitectónica desordenada. Las características clínicas de un nevo se describen en función de su tamaño, bordes y color. Los nevos displásicos usualmente tienen un diámetro de al menos 5 mm, con bordes poco claros y color irregular. Histológicamente, las lesiones contienen melanocitos atípicos distribuídos al azar con núcleos grandes, y cambios arquitectónicos debido al irregular arreglo del tejido conectivo que lo rodea (Clark, WH. Jr, 1991). Uno de los factores de riesgo que mejor correlaciona con el melanoma son los nevos displásicos en individuos con historia de melanoma familiar. Los nevos displásicos son considerados precursores de melanoma ya que el 30 % de los melanomas espontáneos y el 70 % de los melanomas familiares (Greene, MH y col, 1985 a y b) se desarrollan en la cercanía de nevos displásicos. También se cree que los nevos congénitos gigantes pueden derivar en melanomas.

En cuanto a los **"melanomas primarios"**, Clark (1991) ha distinguido entre los *melanomas in situ* que poseen grandes células epiteloides con núcleos hipercromáticos y los *melanomas con fase de crecimiento radial* (*RGP*). Estos tienen las mismas características que los melanomas *in situ,* pero algunas células melanocíticas individuales han invadido la dermis. Los melanomas RGP generalmente tienen más de 10 mm de diámetro y son asimétricos. Se pueden observar células en mitosis en la epidermis, pero no en la dermis. Según Clark (1991), de 147 casos estudiados durante más de 10 años, ninguno recurrió ni metastatizó.

El crecimiento del **"melanoma invasivo"** puede darse con 2 tipos de patrones :

- Crecimiento bifásico
- Crecimiento monofásico

El patrón de crecimiento bifásico se caracteriza porque el melanoma presenta ***fase de crecimiento radial (RPG) y fase de crecimiento vertical (VPG).*** La fase de crecimiento radial se caracteriza por el crecimiento intraepidérmico. La lesión crece en forma autónoma e invade la dermis papilar, pero carece de potencial metastásico (Clark, W.H.Jr, 1987; Elder D.E., 1984). La fase de crecimiento vertical difiere del crecimiento radial desde el punto de vista citológico y arquitectónico. La fase de crecimiento vertical

generalmente presenta células de mayor tamaño, con mayor grado de atipía y aumento del tamaño nuclear, respecto de la fase de crecimiento radial. A diferencia de los melanomas RGP, los melanomas que presentan fase de crecimiento vertical son capaces de metastatizar. Las lesiones VPG crecen alrededor de un círculo imperfecto y se expanden en la dermis. La fase de crecimiento vertical implica un cambio cualitativo que resulta en la selección de una población de células que tiene ventajas proliferativas respecto a las demás células. Las células que presentan fase vertical de crecimiento pueden reducir o perder la síntesis de pigmentos, de allí que estos melanomas sean frecuentemente amelanóticos. Los melanomas con crecimiento monofásico proceden puramente en fase vertical, sin fase de crecimiento radial.

Los melanomas invasivos pueden dividirse en 4 subtipos de acuerdo a su patrón de crecimiento (Barnhill RL y Mihm MC Jr., 1989). Cada uno de estos subtipos presentan características clínicas únicas con diferente pronóstico (ver anexo 3). Los melanomas de tipo extensivo superficial (SSM), lentigo maligno (LMM) y acral lentiginoso (ALM) presentan un patrón de crecimiento bifásico. Este patrón de crecimiento se caracteriza por la proliferación de melanocitos intraepidérmicos (fase de crecimiento radial), seguida de un crecimiento del nódulo expansible en la dermis (fase de crecimiento vertical). Los melanomas de tipo nodular (NM) presentan un patrón de crecimiento monofásico, donde el crecimiento del melanoma se realiza puramente en fase vertical, sin fase de crecimiento radial.

Como mencionamos previamente la metástasis es el paso final del proceso de progresión tumoral. Los pacientes con metástasis sistémicas de melanoma, tienen un pronóstico muy poco alentador con una sobrevida promedio de 6 meses (Balch CM y col., 1992). Generalmente, el paciente con metástasis fallece por el compromiso anatómico directo y las alteraciones fisiológicas causadas por las metástasis en los órganos comprometidos. Pulmón, cerebro e hígado son los sitios más comunes donde se encuentran metástasis de melanomas, sin embargo, estas pueden encontrarse en cualquier sitio del cuerpo

III-4-Moléculas expresadas por células de melanoma

Los antígenos de superficie están involucrados en las interacciones célula-célula o célula-matriz. Estos receptores pueden ejercer múltiples funciones a través de su rol como intermediarios de eventos de señalización.

Las células de melanoma expresan una serie de integrinas diferentes, y la expresión de algunas integrinas es mayor en células de melanoma metastásico que células de melanoma primario. Este aumento de la expresión de integrinas con la progresión tumoral es una caracteríastica de los melanomas ya que los tumores derivados de células epiteliales en general suprimen la expresión de los receptores de adhesión (Herlyn M y col, 1991). Diversos ensayos in vitro e in vivo muestran que las integrinas juegan un rol importante en la tumorigenicidad, invasión, angiogénesis y metástasis de melanoma (Danen, EH. y col, 1995). Cambios en el nivel de expresión de integrinas, tales como el aumento en la expresión de $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, así como la disminución en la expresión de $\alpha 6\beta 1$ están relacionados con la progresión del melanoma (Edward M, 1995). La integrina $\alpha v\beta 3$ jugaría un rol muy importante durante los procesos de invasión y metástasis de melanoma (Seftor REB y col, 1992 ; Nip J y col, 1992). El el aumento de la expresión de esta integrina en el melanoma coincide con la transición de fase de crecimiento radial a fase de crecimiento vertical y por lo tanto estaría relacionado con la adquisición de un fenotipo maligno y la penetración de la membrana basal por las células tumorales. Aún no están totalmente claros los mecanismos de transducción de señales mediados por estas integrinas en melanoma. Es importante investigar cómo ocurre esta señalización ya que los antagonistas de adhesión podrían resultar en un nuevo punto de vista terapéutico para prevenir la formación de metástasis.

III-5-Melanoma y marcadores tumorales.

Algunos marcadores antigénicos han sido utilizados para investigar la diferenciación de los melanocitos y la patogénesis del melanoma (Duray, P., 1988; Balch Ch.M., 1992). Dos marcadores ampliamente usados son las proteínas S-100 y HMB-45, las cuales pueden ser detectadas por anticuerpos específicos sobre secciones de tejido embebidas en parafina. S-100 es expresada por casi todos los melanomas, pero es expresada

además por sarcomas y un subgrupo de carcinomas. Por su parte HMB-45 es un marcador más específico de células melanocíticas, pero no es siempre positivo en melanomas metastáticos. Por lo general ambos marcadores son más efectivos cuando se aplican formando parte de una batería de marcadores. Otros marcadores de superficie celular pueden ser exitosos en el pronóstico de la enfermedad (ejemplo: propensión para metástasis distantes), incluyendo la molécula-1 de adhesión intercelular, el ganglióside GD2 y la subunidad β3 de las integrinas (Purkel, CS. y col, 1982; Albelda, SM. Y col, 1990).

Los estudios del crecimiento, adhesión y diferenciación del melanoma pueden llevar al desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas y/o aproximaciones biológicas para estrategias terapéuticas. Al respecto, el presente trabajo de tesis puede enmarcarse en esta búsqueda, a través del estudio del rol de la proteína SPARC y la progresión del melanoma humano.

III-6-Líneas celulares de melanoma

El comportamiento de las células neoplásicas puede ser estudiado mediante la utilización de cultivos celulares. Los cultivos celulares "inmortalizados" constituyen una **"línea celular"**. Estas representan un modelo simplificado para realizar estudios a nivel celular, subcelular y/o molecular. Las líneas celulares son muy útiles como fuente constante de células bien caracterizadas y de un tipo relativamente uniforme. Estas son capaces de crecer en medios de cultivo definidos y permiten realizar experimentos para medir las respuestas celulares a distintos factores externos. Las líneas de melanoma en cultivo constituyen una herramienta muy importante en el estudio del melanoma. En esta tesis se utilizaron diferentes líneas celulares, derivadas de metástasis de melanomas humanos: IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN (Kairiyama, C. y col., 1995) e IIB-MEL-J (Guerra, L. y col, 1989). Estas 3 líneas fueron establecidas y caracterizadas en el laboratorio del Dr. Mordoh de la Fundación Campomar.

Estudios previos, llevados a cabo por la Dra. Claudia Kairiyama con el objeto de comparar la capacidad invasiva *in vitro* de las distintas líneas celulares mencionadas, mostraron que la línea IIB-MEL-LES presentó una capacidad de atravesar membranas basales reconstituídas (Matrigel) 5-10 veces mayor que las otras 2 líneas (Figura 6A). Cuando los medios condicionados por estas células fueron analizados por zimografía se

observó que la mayor capacidad invasiva observada in vitro correlacionaba con un aumento en la expresión de la actividad de MMP-2 (72 kDa, metaloproteasa de matriz-2, o gelatinasa A) (Figura. 6B y C). Además, se observó que el antisuero anti-MMP-2 fue capaz de bloquear completamente la actividad gelatinolítica de las células y redujo su capacidad invasiva en un 50 %. Estas líneas también presentaron diferencias en la tasa de crecimiento en ratones atímicos. Cuando los ratones fueron inyectados con un inóculo tumorigénico de 3 x 10^6 células, la aparición de tumores con un volumen medio de 0,1 cm^3 se observó al cabo de 34 ± 3,3 días (media ± d.s.), 42,5 ± 6,5 días y 51,5 ± 5,7 días, en ratones inyectados con células IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN e IIB-MEL-J, respectivamente.

Estas 3 líneas fueron utilizadas en esta tesis para el estudio del rol de SPARC en melanoma.

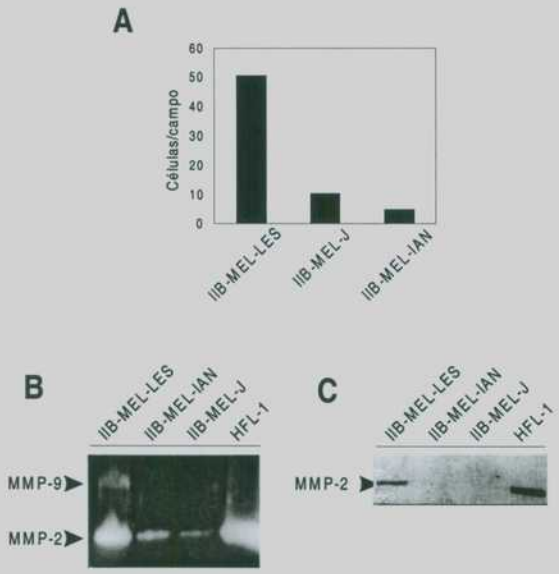


Figura 6: Análisis de la capacidad invasiva in vitro de células de melanoma humano. A) *Ensayo de invasividad de membranas basales reconstituidas (Matrigel).*

B y C) *Expresión de MMP-2 en líneas de melanoma humano y fibroblastos HFL-1.* ***B)*** *Análisis de la actividad gelatinolítica y* ***C)*** *análisis por western blot, de medio condicionado libre de suero obtenido de las distintas líneas celulares.*

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue determinar el rol de la proteína de matriz extracelular, SPARC, en el desarrollo y la progresión del melanoma humano. Para ello, planteamos:

* Caracterizar la expresión de SPARC en muestras de melanoma humano y en distintas líneas celulares de melanoma.

* Evaluar los niveles de expresión de SPARC en los distintos estadíos que llevan al desarrollo del melanoma maligno.

* Analizar el rol de SPARC en distintos procesos involucrados en el desarrollo y progresión tumoral mediante la utilización de secuencias antisentido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Expresión de SPARC recombinante en E. Coli

El cDNA de longitud completa que codifica para SPARC humana (-55 al +1704) fue clonado en el sitio Sali I del vector pBlue Script II SK+. Por mutagénesis dirigida se generó un codón de iniciación ATG, río arriba de Ala 18 en la secuencia codificante que fue posteriormente subclonada en el vector de expresión pET-3b en los sitios Nde I-BamH I. Células BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET-3b o con el plásmido pET-3b/SPARC fueron crecidas a 37 °C hasta una OD_{600}: 0.5, inducidas con 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) e incubadas a 28 °C durante 3 horas.

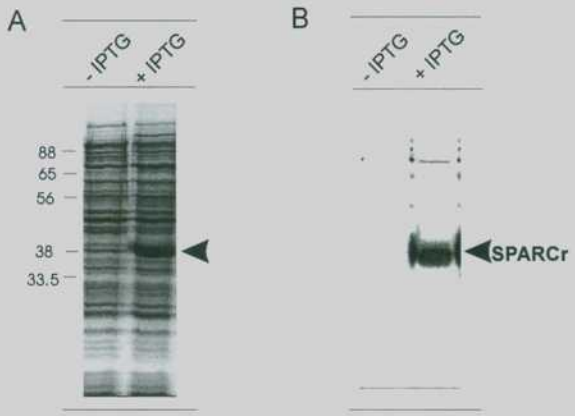


Figura 7: Inducción de la expresión de SPARCr dependiente de IPTG. *Cultivos de la cepa de E.coli BL-21 transformadas con el plásmido pET-3b/SPARC fueron crecidos a 37 °C e inducidos o no, con IPTG 1 mM. Al cabo de 3 hrs. a 28 °C, alícuotas de 1 ml de cultivo fueron removidas, centrifugadas a 16.000 x g durante 1 min, resuspendidas en buffer 50 mM Tris ClH, pH: 8 y sonicados. Las muestras fueron centrifugadas y 15 µg de proteína total fueron sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 % en condiciones reductoras.* ***A)*** *Tinción con azul de Coomasie.* ***B)*** *Western blot. Se utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra SPARC humana cedidos gentilmente por el Dr. Paul Basset (Estrasburgo, Francia).*

Purificación y caracterización de SPARCr

Los precipitados bacterianos fueron lisados y sonicados como se describió previamente (Podhajcer y col, 1996). Los lisados celulares fueron centrifugados a 100.000 x g durante 1 hr. y el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio al 80%. Después de la centrifugación el precipitado fue resuspendido en buffer 50 mM Tris ClH, pH: 8 en presencia de 6 M de Urea y sembrado en una columna de DEAE-Sephacel (Pharmacia, Suecia). La columna fue lavada con 3 volúmenes de 150 mM NaCl y la proteína eluída con un gradiente continuo de NaCl (150-400 mM). SPARC recombinante (SPARCr) eluyó a 250-300 mM NaCl y fue dializada contra PBS en presencia de concentraciones decrecientes de urea hasta que ésta fue completamente eliminada (Figura 8).

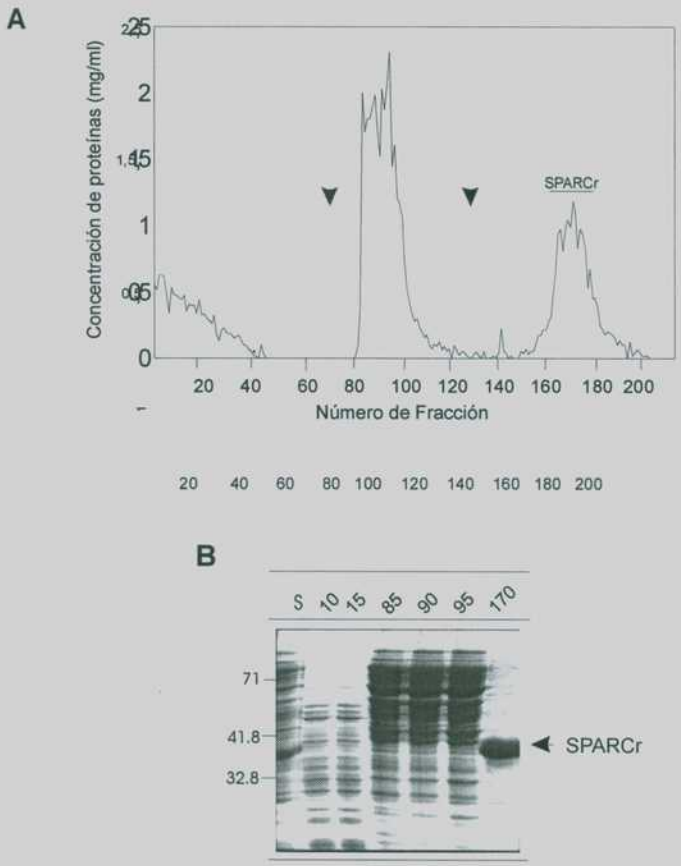


Figura 8: Purificación de SPARCr.

A) Patrón de elución de la columna de DEAE-Sephacel. La concentración de proteínas fue ceterminada en cada fracción por el método de Bradford (1976). Felcha gris: indica el inicio del lavado con 150 mM. de NaCl. Flecha negra: indica el inicio del gradiente continuo de NaCl (150-400 mM). Se indica el pico de elución de SPARCr.

***B)** Análisis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 % . Las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones reductoras y el gel fue teñido con azul de Coomasie. El número de fracción de la columna se indica en la parte superior de cada calle y los valores de los marcadores de peso molecular se muestran en la columna de la izquierda.*

Esta muestra fue utilizada para obtener el antisuero anti-SPARCr en conejo de acuerdo a un protocolo estándar de inmunización (Harlow y Lane, 1988). Este suero es capaz de reconocer una única banda de 42 kDa, correspondiente al peso molecular descripto para SPARC humana nativa (Sage, EH. y col., 1989), en medio condicionado en ausencia de suero, por fibroblastos HFL-1. No se observó inmunoreactividad cuando el suero fue ensayado sobre medio condicionado por líneas celulares de mama como MCF-7 que no expresan el mRNA de SPARC (Podhajcer, OL., 1996) (Figura 9). El suero pre-inmune n o fue capaz de detectar la expresión de SPARC en el medio condicionado de células HFL-1. La expresión de SPARC en tumores de mama fue analizada por la Dra. Inés Bravo (Hospital Castex) utilizando este suero. La localización de la proteína fue detectada en los fibroblastos vecinos a las células malignas, de acuerdo a lo descripto previamente por Podhajcer y col (1996).

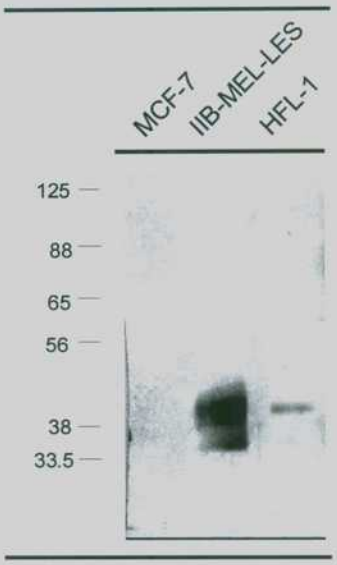


Figura 9 :Inmunodetección de SPARC. *30 µg de proteína total obtenida a partir de medio condicionado libre de suero (obtenido como se detalla a continuación) por las líneas celulares indicadas fueron sembrados en cada calle. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamidadesnaturalizante al 10 % en condiciones reductoras. El inmunoblot fue realizado de acuerdo a lo descripto más adelante (Western blot, sección Materiales y Métodos) usando el suero anti-SPARCr, dilución 1 : 1000. Los valores de los marcadores de peso molecular se muestran en la columna de la izquierda*)

Líneas celulares

Las líneas celulares IIB-MEL-LES, IIB-MEL-J e IIB-MEL-IAN fueron establecidas a partir de melanomas metastásicos humanos (Guerra, L. y col., 1989; Kairiyama, C. y col., 1995) y fueron crecidos en medio "melanoma". Este consiste en una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco: medio F-12 (DMEM : F-12, 1 :1) suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB) (Gibco), 20 nM de selenito de sodio, 100 µM de ácido ascórbico, 0,3 mg/ml de galactosa, 0,15 mg/ml de piruvato de sodio y 5 µg/ml de insulina. Los fibroblastos de pulmón humano de origen fetal, HFL-1 (ATCC, CCL 153) y las células mesoteliales IIB-FI (establecidas a partir de ascitis de mama humano en el laboratorio del

Dr. J. Mordoh), fueron crecidas en medio DMEM en presencia de 10 % SFB y antibióticos (penicilina: 2,5 unidades/ml y estreptomicina: 2,5 μg/ml). La línea celular de cáncer de mama humano, MCF-7 fue crecida en DMEM :F12 (1 :1) suplementado con 2 mM de glutamina, 10 μg/ml de insulina, 10 % SFB y antibióticos. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C y 5 % CO_2.

Obtención de RNA y análisis por Northern blot

El RNA total de las líneas celulares fue preparado por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Los melanomas humanos o los inducidos en ratones atímicos fueron limpiados, cortados en pequeños fragmentos, lavados con PBS y resuspendidos en buffer en presencia de isotiocianato de guanidina. Después de homogeneizar los tejidos con un Politron (Janke & Kunkel KGIKA-WERK, Staufen im Breisgau, Alemania), el RNA total también fue extraído por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Este fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 1 % y transferido a membranas de Nylon (Hybond N, Amersham, Arlington Heights, IL). Después de fijar el RNA a las membranas con radiación UV, estas fueron hibridizadas con sondas de cDNA marcadas con ^{32}P por la técnica de "random priming" (1 x 10^6 cpm/ml) (Promega) en presencia de 50 % de formamida a 42 °C. Las membranas fueron lavadas 2 veces, 15 minutos cada lavado, con 2X SSC, 0,1 % SDS a temperatura ambiente y 4 veces a 55° C, 15 minutos cada lavado, con 0,1X SSC y 0,1 % SDS. La cantidad e integridad del RNA fue confirmada después de la transferencia por tinción de la membrana con azul de metileno y también mediante hibridización con un cDNA correspondiente al gen 36B4 (Basset y col, 1990), el cual codifica para una fosfoproteína ribosomal (Laborda, 1991). Para detectar la expresión de SPARC se usó un cDNA de SPARC humano que se extiende desde el nucleótido (+) 110 al (+) 1150 (Podhajcer y col, 1996). La presencia del mRNA de MMP-2 fue detectada utilizando una sonda que se extiende desde el nucleótido (+) 142 a (+) 2150 provisto gentilmente por el Dr. P. Chambon (Estrasburgo, Francia). La expresión de fibronectina fue detectada usando una sonda de cDNA cedida gentilmente por el Dr. Alberto Kornblihtt (Bs.As., Argentina).

Obtención de Medios Condicionados (MC)

Los medios condicionados (MC) se obtuvieron a partir de células semiconfluentes mantenidas en ausencia de suero durante 24 hrs. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y mantenidas en ausencia de suero durante 24 hrs. Luego de este período, el medio fue centrifugado durante 10 minutos a 1.500 rpm en centrífuga clínica, para eliminar los restos celulares. Los MC fueron precipitados con sulfato de amonio al 80% de saturación durante 1 hr. a 4 °C y centrifugados a 10.000 x g durante 2 hrs. El precipitado se disolvió en PBS en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, EDTA 1 mM) y se dializó contra el mismo buffer. Las muestras dializadas fueron alicuotadas y conservadas a -70 °C hasta ser utilizadas.

Análisis por Western blot

La presencia de SPARC fue analizada en medios condicionados y en extractos proteicos de líneas celulares y muestras de melanoma humano. Los extractos proteicos de líneas celulares se obtuvieron a partir de monocapas de células confluentes. Después de lavar 2 veces con PBS, las células fueron lisadas con buffer 10 mM Tris-ClH, pH: 8.0; 150 mM NaCl; 0,1 % NP-40 en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, EDTA 1 mM). Después de centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, los sobrenadantes fueron recuperados y posteriormente utilizados en los ensayos de western blot. Las muestras de melanomas humanos fueron cortados en pequeños fragmentos, pulverizadas en nitrógeno líquido y resuspendidas en buffer 10 mM Tris-ClH, pH: 7.4; 0,5 mM DTT e inhibidores de proteasas. Los lisados fueron homogeneizados con un Politron y centrifugados a 4 °C durante 10 minutos a 1.000 x g. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 100.000 x g durante 2 horas para obtener la fracción soluble. Después de lavar, el precipitado fue resuspendido en 50 mM Tris-ClH, pH: 8.0, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ e inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas presente en las distintas muestras fue cuantificada por el método de Bradford (1976). Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10 % en condiciones reductoras y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear con leche descremada al

3% en PBS, las membranas fueron incubadas durante 16 hrs. a 4 °C con el antisuero anti-SPARC (dil 1/1000). Después de lavar con 0.05 % Tween-20 en PBS a temperatura ambiente las membranas fueron incubadas durante 2 hrs. con IgGs de cabra anti IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina (Jackson immnuno Research Laboratories, West Grove, PA). Las bandas fueron detectadas en presencia de Nitro-blue tetrazolium y 5-bromo-4-chloro-3-indoil fosfato (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD).

Tratamiento con tunicamicina

Células IIB-MEL-LES en 80% de confluencia fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas en medio melanoma libre de suero. Al cabo de 5 horas, este medio fue descartado y reemplazado por medio fresco en presencia o no de 4 μg/ml de tunicamicina. Después de una incubación de 16 hrs., los medios fueron recuperados, concentrados con sulfato de amonio y analizados por Western blot.

Remoción de azúcares por tratamiento enzimático

El medio condicionado libre de suero obtenido a partir de células IIB-MEL-LES fue concentrado con sulfato de amonio como ha sido descripto previamente. Treinta μg de proteína total fueron tratados con endo H (endo-β-N-acetilglucosaminidasa H, Sigma Chemical Co), PNGasa F (péptido: N-glucosidasa F, Biolabs, Beverly, MA) o con Neuraminidasa (Biolabs). Las digestiones enzimáticas con endo H y PNGasa F fueron realizadas bajo condiciones desnaturalizantes. Muestras control sin enzima fueron incubadas en el mismo buffer que las muestras que contenían las glicosidasas. El tratamiento con endo H (5 μl de 1.0 unidad/ml) fue llevada a cabo en 60 μl de 0,05 M de citrato de sodio pH 5,3. La mezcla de reacción fue incubada durante 16 horas a 37° C. La digestión enzimática con PNGasa F (3 unidades en un volúmen final de 60 μl) fue llevada a cabo en 0,05 M fosfato de sodio, pH 7,5 en presencia de 1% NP-40. El tratamiento con neuraminidasa se realizó en 0,15 M de acetato de sodio, pH 5,0; usando 10 mU de enzima a

37 °C durante 16 horas. Las reacciones se frenaron por el agregado de buffer conteniendo SDS y β-mercaptoetanol, y calentamiento. Las muestras fueron analizadas por western blot. Como control de la actividad endo H y PNGasa F se utilizó RNAsa B. Como control de la actividad de neuraminidasa utilizamos 2'-(4 methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid (4 MU-NANA).

Tratamiento con inhibidores de proteasas

Células en 80 % de confluencia fueron lavadas con PBS e incubadas durante toda la noche en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. Las concentraciones finales de los inhibidores de proteasas utilizados fueron: leupeptina, 0.01 mM; EDTA, 0.5 mM y pepstatina A, 0.001 mM. Al terminar la incubación los medios condicionados fueron concentrados con sulfato de amonio y dializados contra PBS en presencia de los inhibidores correspondientes en presencia de PMSF y EDTA. Treinta μg de proteína total fueron separados por SDS-PAGE 10 % y transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser analizadas por western blot.

Regulación de la expresión del mRNA de SPARC por factores de crecimiento

Células de melanoma en 80% de confluencia fueron lavadas 2 veces con PBS y mantenidas en medio sin suero. Al cabo de 24 horas las células fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas en medio libre de suero suplementado con 5 ng/ml de TGF-β recombinante (gentileza del Dr Santa Coloma, Bs As, Argentina), 5 ng/ml EGF o 10 ng/ml de TPA (phorbol 12 myristate 13-acetate, Sigma Chemical Co, San Diego). Después de los tiempos indicados, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en buffer en presencia de isotiocianato de guanidina para la extracción de RNA. Un procedimiento similar fue utilizado para las células HFL-1.

Expresión de SPARC antisentido

El cDNA completo de 1,6 Kb (15-1698) codificante para SPARC humana fue inicialmente aislado de un banco de cDNA de cáncer de mama y clonado en el sitio Sal I del plásmido pBlue Script II SK+, en orientación antisentido. Un clon conteniendo el cDNA de SPARC en la orientación antisentido fue escindido con Hind III y Apa I y subclonado en la misma orientación en los sitios Hind III/Apa I del vector de expresión de mamíferos Rc/CMV (Invitrogen), bajo el promotor de citomegalovirus para crear el plásmido pCMV/SPas (Figura 10). Las células de melanoma fueron transfectadas con pCMV/SPas por coprecipitación del DNA con fosfato de calcio. Las transfectantes estables fueron seleccionados con geneticina (0,5 mg/ml; GIBCO-BRL, Garthersberg, MD.) Los clones fueron obtenidos por aislamiento de colonias (ring cloning) o por dilución límite.

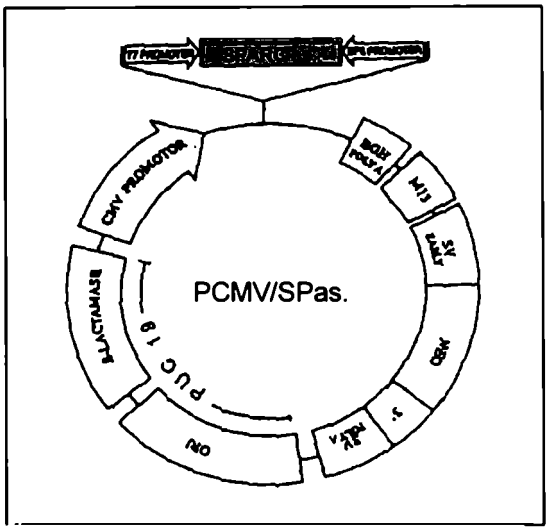


Figura 10 : Vector de expresión en mamíferos pCMV/SPas.
El cDNA de SPARC antisentido fue subclonado en el sitioHindIII/Apa I.

Análisis por ELISA

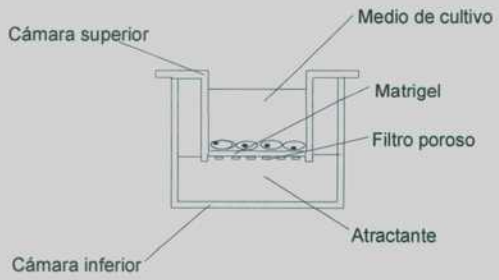
30 µl de medio condicionado concentrado fueron sembrados por duplicado en placas de 96 pocillos y secados durante 16 hrs. a 37 °C. El pegado inespecífico fue bloqueado con leche descremada al 5 % durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas durante 16 hrs. a 4 °C con el suero anti-SPARC (dilución 1/250). Después de lavar con PBS-BSA al 0,1 %, la presencia de SPARC fue detectada usando un suero de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa (Dako, Carpinteria, CA). Después de lavar, la reacción se llevó a cabo en presencia de O-fenildiamina, y la absorbancia se leyó a 415 nm. Los resultados se obtuvieron a partir de una curva estándar usando SPARCr purificada (rango: 0-50 µg/ml). El ensayo se realizó por triplicado a partir de distintos lotes de MC.

Ensayos de Invasión y Migración

1. Células tumorales

La capacidad invasiva de las células tumorales parentales y de las células transfectadas fue determinada utilizando "cámaras de Boyden" modificadas de 24 pocillos (Transwell, Costar, Cambridge, MA). Filtros de policarbonato (Nucleopore) libres de polivinilpirrolidona (PVP), de poro de 8 μm de diámetro fueron cubiertos con 5 μg de Matrigel (Collaborative Research Bedford, MA) y secados en flujo laminar. El medio condicionado por fibroblastos HFL-1, libre de suero (DMEM : 0,1 % BSA) fue utilizado como quimioatractante en los ensayos de invasión y migración. Las células utilizadas en estos ensayos fueron cosechadas con buffer citrato (0,13 M citrato de sodio y 0,015 M KCl), lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en DMEM : 0,1 % BSA (1×10^6 células/ml). Las células fueron mantenidas 1 hr. a temperatura ambiente y sembradas en el interior del transwell (100.000 células por pocillo). Luego de ser incubadas durante 16-18 hrs. a 37 °C en 5% CO_2, las células de la fase superior del filtro fueron removidas con un isopo de algodón, los filtros fueron fijados en metanol y teñidos con hematoxilina. Se contó el número de células de por lo menos 10 áreas distintas en la superficie inferior del filtro (aumento 400 X). Cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos fueron repetidos 3 veces. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de Tukey Kramer.

A



B

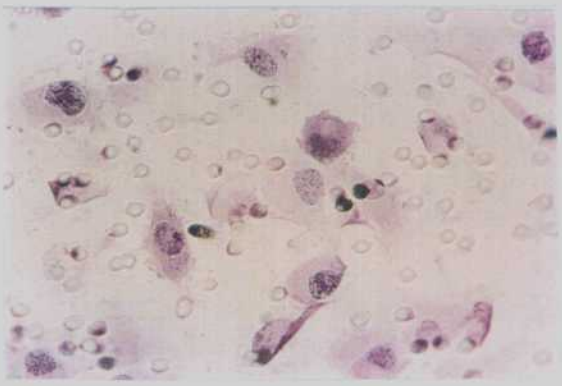


Figura 11: *A) Esquema de la cámara de Boyden empleada en los ensayos de invasividad con matrigel.* ***B)*** *Microfotografía de un ensayo de invasividad realizado en presencia de Matrigel durante 24 hs. Las células fueron teñidas con hematoxilina y fotografiadas con objetivo de 400 X.*

Los ensayos de migración se llevaron a cabo por un procedimiento similar al descripto anteriormente, en ausencia de Matrigel y utilizando filtros embebidos en gelatina para aumentar la adhesión de las células a filtros (Yabkowitz y col, 1993).

2.Leucocitos

La migración de PMNLs fue determinado utilizando "cámaras de Boyden" modificadas. En este caso se utilizó como quimioatractante medio condicionado llibre de suero en presencia de 0,5 % seroalbúmina humana (HAS) (Universidad de Cordoba, Córdoba, Argentina). 100 µl de PMNLs a una densidad de 1,25 x 10^6 células/ml en medio RPMI 1640 y 0,5 % HAS fueron sembrados sobre filtros de policarbonato (Nucleopore) libres de PVP con poros de 3 µm de diámetro y montados sobre la cámara. Luego de ser incubados durante 45 minutos a 37 °C y 5 % CO_2, el número de células que migró hacia la cámara inferior fue determinado por citometría de flujo (Cyton Absolute, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ). Cada ensayo se realizó por triplicado y fueron repetidos 3 veces. Los datos fueron analizados por ANOVA, y Test de Tuckey Kramer.

Ensayos de adhesión

En los ensayos de adhesión, placas de 96 pocillos fueron recubiertas con 5 µg de Matrigel, secadas en flujo laminar durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Las células fueron cosechadas con buffer citrato, lavadas con PBS y resuspendidas en DMEM (2,5 x 10^5 células/ml). Se sembraron 25.000 células/pocillo. A distintos tiempos, las placas fueron

lavadas con PBS para remover las células no adheridas y fijadas con paraformaldehido. Se contó el número de células adheridas en 10 áreas diferentes en la superficie inferior del filtro. Cada ensayo se realizó por triplicado y fue repetido 3 veces. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de Tukey Kramer.

Inmunofluorescencia indirecta sobre células en suspensión

Las células de melanoma fueron cultivadas en medio melanoma hasta confluencia. Las células adheridas fueron lavadas con solución fisiológica (SF: 0,9 % NaCl) y despegadas por incubación a 37 °C con SF/EDTA 0,05 %. La suspensión celular resultante fue diluída y centrifugadas a 450 x g durante 8 minutos. El precipitado fue resuspendido en un volúmen adecuado de PBS / 0,5 % BSA/),01 % azida sódica (PBA) para obtener una suspensión de 10^7 células/ml. 50 µl de la suspensión celular fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti α5, (clon VC5, 6^{th} Workshop on Human Leukocytes Differentiation Antigens), dilución 1:100 durante 45 minutos en hielo. Las células fueron lavadas dos veces con PBA e incubadas en 50 µl de $F(ab')_2$ de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceina (FITC) (DAKO A/S, Dinamarca) dilución 1:50. Luego de 45 minutos, las células fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas en el mismo buffer frío.

La intensidad de fluorescencia fue cuantificada, sobre células vivas, con un citómetro de flujo (FAC-Star Plus, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los resultados fueron analizados con el software WinMDI V2.3 (Trotter J, 1996).

Zimografía

El análisis de la actividad gelatinolítica se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS al 10 % copolimerizados con 0,2 % de gelatina (Sigma, St. Louis, MO). Una parte del medio condicionado libre de suero obtenido como se describió anteriormente fue mezclado con una parte de buffer de Laemmli (sin β-Mercaptoetanol) e

incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser sembrado en el gel. Después de la electroforesis, los geles fueron lavados durante 30 minutos con cada uno de las siguientes soluciones:

1) 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 2.5% Tritón X-100.
2) 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 2.5% Tritón X-100, 5 mM $CaCl_2$; 1 μM $ZnCl_2$
3) 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 5 mM $CaCl_2$; 1 μM $ZnCl_2$.

Finalmente los geles fueron incubados a 37 °C durante 16 hr. en el último buffer. La tinción de los geles fue realizada con una solución de azul de Coomasie R-250 1 % en metanol 40 % y ácido acético 10 %. El exceso de colorante fue eliminado con una solución de metanol 40 % y ácido acético 10%. La actividad gelatinolítica de las enzimas fue detectada como bandas transparentes sobre un fondo azul.

Como control de expresión de la enzima MMP-2 se uso medio condicionado de la línea de fibroblastos fetales HFL-1. Para una mejor caracterización de las bandas gelatinolíticas, el ensayo se realizó en forma paralela en ausencia de $CaCl_2$ y $ZnCl_2$, y en presencia del agente quelante EDTA (20 mM).

Aislamiento de PMNLs

Los leucocitos utilizados en los ensayos de migración y adhesión, fueron aislados a partir de sangre perisférica de donantes sanos. La sangre fue extraída en presencia de heparina (3,4 U/ml). Los eritrocitos fueron separados por sedimentación con dextrán 6 % en solución salina (1:5 de sangre) durante 1 hr. a temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante fue centrifugado a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en buffer T1(0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,005 % Na_2PO_4 - H_2O; 0,1 % Glucosa) conteniendo plasma pobre en plaquetas (PPP) 10 % y sembrado sobre un gradiente de percoll (Sigma, St. Louis, MO) discontinuo, 62 %- 77 % para obtener fracciones enriquecidas en PMNLs y MNLs (leucocitos mononucleares). El gradiente fue centrifugado a 200 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La banda ubicada en la interfase Percoll 62 %-77 % enriquecida en PMNLs fue recuperada, diluída en buffer T1 y centrifugada a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el

precipitado fue resuspendido en medio RPMI 1640 y 0,5 % HAS y las células fueron cuantificadas en cámara de Neubauer. Se utilizó azul tripán 0,5 % para determinar viabilidad celular y cristal violeta para diferenciar PMNLs de MNLs. Los ensayos se llevaron a cabo con preparaciones de PMNLs con un 95 % de pureza.

FCE y N BIBLIOTECA

Análisis histológicos

Para la detección de SPARC por inmunohitoquímica, se utilizaron fragmentos de tejido incluídos en bloques de parafina. La detección inmunohistoquímica de SPARC fue realizada sobre cortes de 5 μm. La peroxidasa endógena fue eliminada con 2 % H_2O_2 en metanol. La eliminación melanina se hizo por procedimientos descriptos previamente (Luna, 1960) y fue chequeada usando un control de PBS en lugar del primer anticuerpo. Después de bloquear con 10 % de suero normal de cabra, durante 15 min. a temperatura ambiente, los cortes fueron incubados durante 16 hrs. a 4 °C con el suero policlonal de conejo anti-SPARC o con suero no inmune (dilución 1/750 en PBS). Después de lavar, los cortes fueron incubados con suero de cabra anti-conejo biotinilado. Se utilizó un complejo avidina-biotina-peroxidasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La reacción de revelado fue desarrollada en presencia de 0,02 % diaminobenzidina y H_2O_2.

Experimentos in vivo

Ratones Balb/c nu-nu de 8-12 semanas de edad fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos in vivo. Todos los animales fueron provistos por el bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CONEA). Se utilizaron 6-10 ratones por grupo experimental.

RESULTADOS

Inmunodetección de SPARC en melanoma humano.

Con el objeto de estudiar la expresión de SPARC, 6 extractos de melanoma metastásico humano de distintos orígenes fueron analizados por ensayos de western blot. En todas las muestras estudiadas se observó un doblete de 40-45 kDa, mientras que 2 de los casos estudiados presentaron un doblete de menor peso molecular que la proteína recombinante (Figura 12A). No se detectó inmunoreactividad cuando las mismas muestras fueron enfrentadas a un suero preinmune.

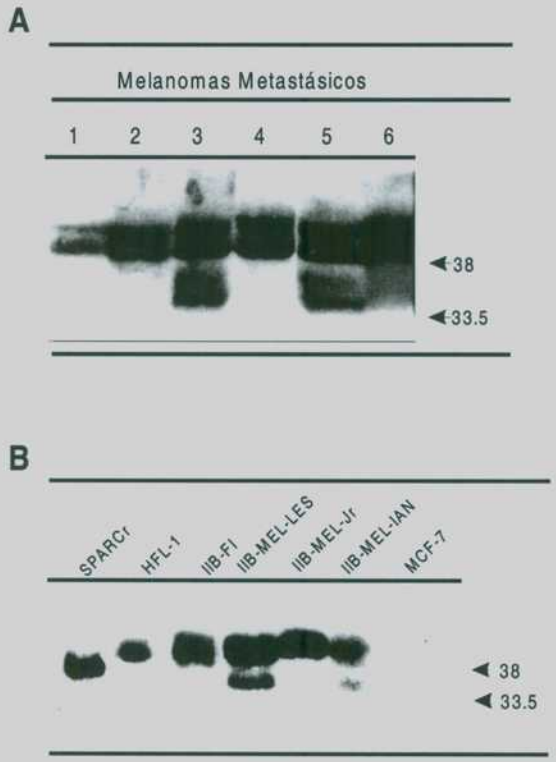


Figura 12: Inmunodetección de SPARC en melanomas metastásicos y líneas celulares de melanoma.

A) *100 µg de proteína total obtenida a partir de extractos tumorales fueron sembrados en cada calle. Sitio de orígen de metástasis: nódulo linfático: muestras 1, 2, 4 y 5; dermis: muestra 6; vísceras: muestra 3.* ***B)*** *Cada calle fue sembrada con 30 µg de proteína total obtenida a partir*

de medio condicionado libre de suero (ver Materiales y Métodos). Se muestra la movilidad de SPARC recombinante (SPARCr). Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 % en condiciones reductoras. El inmunoblot fue realizado de acuerdo a los descripto en Materiales y Métodos usando el suero anti-rSPARC (dil 1 : 1000). Los valores de los marcadores de peso molecular se muestran en la columna de la derecha. Se indica la migración de láctico deshidrogenasa y triosafosfato isomerasa.

Cuando se estudió la expresión de SPARC en líneas de melanoma humano se observó que la proteína era principalmente secretada. Las 3 líneas de melanoma estudiadas mostraron una forma mayoritaria de 40-45 kDa. En 2 de las líneas analizadas (IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN) se observó un segundo doblete de 34-36 kDa (Figura 12B). Como control positivo se corrió medio condicionado por fibroblastos humanos HFL-1 que secretan una forma de 42 kDa correspondiente al tamaño descripto SPARC glicosilada (Sage, EH. y col. 1984). En la figura 12 B también se observa la expresión de SPARC en células mesoteliales obtenidas a partir de ascitis humano (IIB-FI). Como control negativo se corrió medio condicionado por células de cáncer de mama MCF-7 que no expresan mRNA de SPARC (Podhajcer y col, 1996).

Expresión del mRNA de SPARC en melanoma humano

Con el objeto de confirmar que las distintas formas de SPARC observadas por ensayos de western no eran resultado de "splicing alternativo", analizamos la expresión del mRNA de SPARC por northern blot.

En la figura 13 se muestra que las tres líneas de melanoma humano estudiadas expresan constitutivamente altos niveles de mRNA de SPARC, asi como también los tumores obtenidos a partir de estas líneas en ratones atímicos. Solo se observaron las 2 formas del mRNA de SPARC humana descriptas previamente de 3.0 y 2.2 Kb (Howe CC. y col, 1990; Podhajcer y col, 1996). No se observaron variantes resultado de splicing alternativo en ninguna de las muestras testeadas.

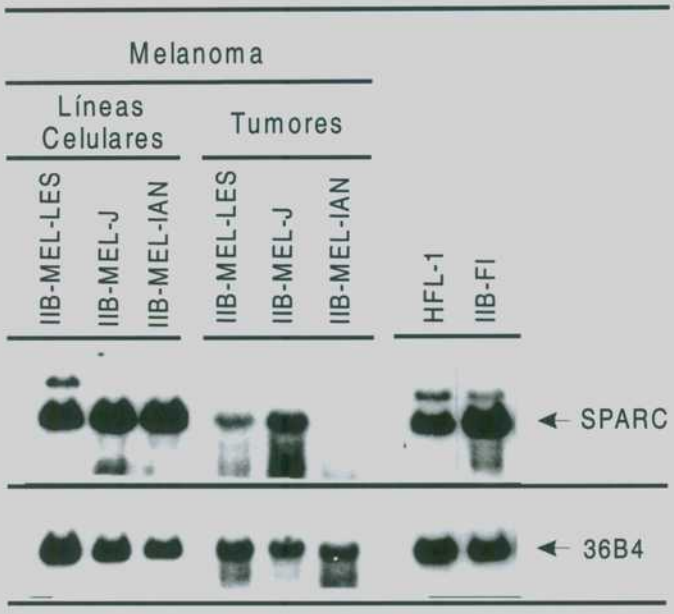


Figura 13: Análisis por northern blot de la expresión de SPARC en líneas de melanoma humano y en tumores experimentales. *12 μg de RNA total correspondiente a las líneas celulares indicadas o a tumores obtenidos por inyección de estas líneas en ratones atímicos fueron sembrados en cada calle. Las membranas fueron hibridizadas utilizando como sonda cDNA de SPARC marcado con ^{32}P, deshibridizadas y rehibridizadas con el cDNA de 36B4. Las placas autorradiográficas fueron expuestas durante 72 y 24 hrs. respectivamente a -70° C.*

La expresión del mRNA de SPARC fue estudiada en 14 melanomas metastásicos humanos de distinto origen. Como se observa en la figura 14, el 100% de los tumores analizados mostró niveles variables de expresión del transcripto de SPARC de 2.2 Kb. No se observaron variantes resultado de splicing alternativo en ninguna de las muestras testeadas. Las diferencias en los niveles de expresión no están relacionados con el sitio de orígen de las metástasis (Figura 14).

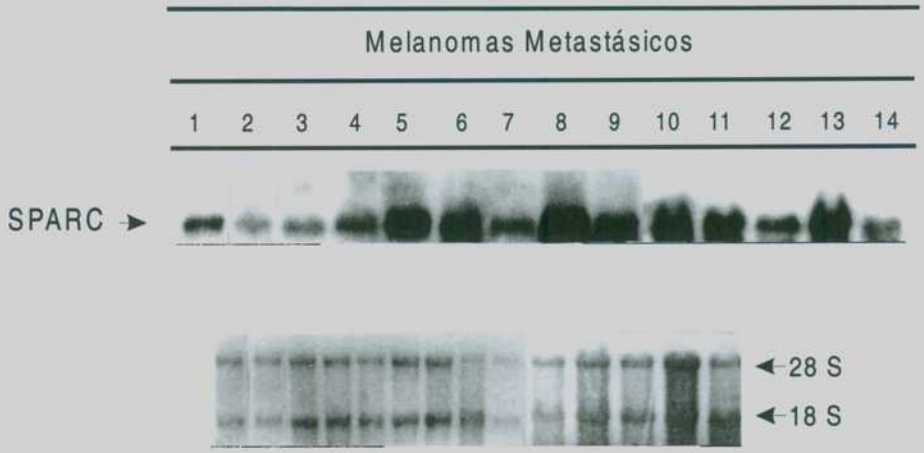


Figura 14: Análisis por northern blot de la expresión de SPARC en melanomas metastásicos: *8 μg de RNA total obtenido a partir de diferentes melanomas metastásicos fueron sembrados en cada calle. Sitio de orígen de la metástasis: pulmón: muestra 1; nódulo linfático: muestras 3, 4, 6, 8, 11, 12 y 14; dermis: muestras 2, 5, 7 y 13; cerebro: muestra 10; víceras, muestra 9. Panel superior: La membrana fue hibridizada utilizando como sonda cDNA de SPARC marcado con ^{32}P. Tiempo de exposición de la placa autorradiográfica: 72 horas a -70° C. Panel inferior: Tinción con azul de metileno.*

Las distintas formas de SPARC son producto de una glicosilación y clivaje diferencial

Los resultados obtenidos en los ensayos de northern nos llevaron a plantear que las distintas formas de SPARC secretadas por células de melanoma humano serían resultado de distintas modificaciones post-traduccionales. En base a evidencias previas que indican que SPARC es una glicoproteína N-glicosilada, determinamos inicialmente si las diferencias en el peso molecular de las diferentes bandas de SPARC secretada por líneas de melanoma humano se debían a una glicosilación diferencial. La incubación de las células IIB-MEL-LES con tunicamicina dio lugar a la detección en el medio condicionado de especies de menor peso molecular : 40-37-33 y 31 kDa (Figura 15A), sugiriendo que todas las formas están glicosiladas. La banda de SPARC de mayor peso

molecular, luego del tratamiento con tunicamicina, comigró con SPARCr sugiriendo que aquellas bandas de menor peso molecular serían producto de un clivaje proteolítico.

Con el objeto de caracterizar el tipo de glicosilación que presenta SPARC utilizamos 2 endoglicosidasas con distintas especificidad de sustrato. Las endoglicosidasas utilizadas fueron: endoglicosidasa H (endo-H) y N-glicosidasa F (PNGasa F). Estas enzimas clivan oligosacáridos unidos a asparagina; sin embargo difieren en la especificidad del oligosacárido. Mientras PNGasa-F cataliza la hidrólisis de oligosacáridos de alta manosa, híbridos o complejos; endo-H cliva exclusivamente oligosacáridos de alta manosa y algunos oligosacáridos híbridos. Cuando el medio condicionado de IIB-MEL-LES fue tratado con PNGasa-F se observó la misma disminución del peso molecular que la observada después del tratamiento con tunicamicina (Figura 15B), lo cual confirma que las distintas formas secretadas por las células de melanoma están glicosiladas. Sin embargo, SPARC secretada al medio condicionado resultó ser resistente al clivaje por endo-H y neuraminidasa, ya que no se observaron diferencias en la movilidad electroforética de las diferentes formas de SPARC después del tratamiento con estas enzimas (Figura 15B).

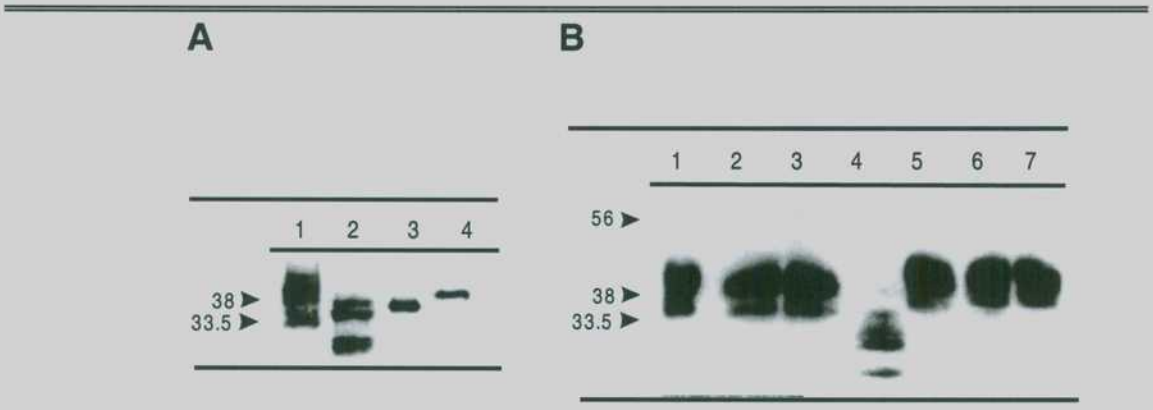


Figura 15: Deglicosilación de SPARC en células de melanoma humano

El medio condicionado fue obtenido como se describe en la sección Materiales y Métodos. ***A)*** *Calles 1, 2 y 4 contienen 12 µg de proteína total; calle 3 contiene 0,25 µg de SPARCr. El medio condicionado fue obtenido a partir de células de melanoma tratadas sin (calle 1) o con (calle 2) tunicamicina; calle 4: medio condicionado por células HFL-1. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante 10 % en condiciones reductoras* ***B)*** *Cada calle contiene 30 µg de proteína total obtenida a partir del medio condicionado por células IIB-MEL-LES en ausencia de suero. Calle 1: células no tratadas; calle 2: tratadas con neuraminidasa; calle 3: incubadas en buffer de neuraminidasa, calle 4: tratadas con PNGasa*

F; calle 5: incubadas en buffer de PNGasa F; calle 6: tratadas con endo H; calle 7: incubadas en buffer de endo H. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante en gradiente (8-18 %) en condiciones reductoras. Los valores de los marcadores de peso molecular se muestran en la columna de la izquierda.

El clivaje de SPARC es específico de algunas células de melanoma, ya que no se observaron diferentes formas en los medios condicionados por HFL-1 e IIB-FI. Para determinar que tipo de proteasa sería la responsable del clivaje de la proteína se testeó el efecto de diferentes inhibidores de proteasas: EDTA (inhibidor de metaloproteasas), Leupeptina (inhibidor de proteasas de tipo serina y cisteina) y Pepstatina A (inhibidor de aspartil proteasas). Como se muestra en la figura 16 sólo leupeptina, fue capaz de inhibir la aparición del dobelte de menor peso molecular de SPARC. Debido a las distintas funciones asignadas a los diferentes dominios de SPARC y con el objeto de identificar se el clivaje mediado por estas proteasas corresponde a la región N-terminal o C-terminal, utilizamos anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido M4.2 que corresponde a los aa: 254-273 de la región C-terminal de la proteína. Como se observa en la figura 16 estos anticuerpos fueron capaces de detectar tanto las formas de mayor movilidad como las de menor movilidad, sugiriendo que como consecuencia del clivaje sería liberado un péptido correspondiente a la región NH_2 de la proteína. Esto fue observado tanto en la línea IIB-MEL-LES como en la línea IIB-MEL-IAN.

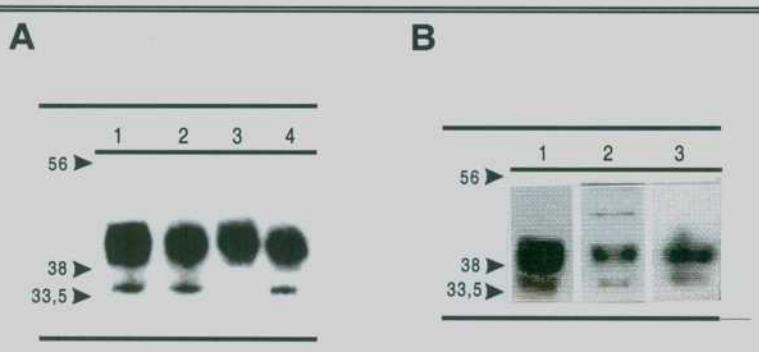


Figura 16 : Clivaje específico de SPARC en células de melanoma humano : A) *Cada calle contiene 30 µg de proteína proveniente de medio condicionado por células IIB-MEL-LES libre de suero en presencia de diferentes inhibidores de proteasas, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Calle 1: en ausencia de inhibidores de proteasas; calle 2: en presencia de EDTA (0.5 mM); calle 3: en presencia de leupeptina (0.01 mM); calle 4: en presencia de*

*pepstatina A (0.001 mM). **B)** 30 µg de proteína total obtenida a partir de medio condicionado libre de suero fueron sembrados en cada calle. El inmunoblot fue revelado con distintos anticuerpos. Calle1: suero anti-SPARCr (dil 1/500), calle 2 y 3: suero anti-péptido M4.2 (aa :254-273, dil 1/400.) Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10 % en condiciones reductoras. Los valores de los marcadores de peso molecular se muestran en la columna de la izquierda.*

Detección inmunohistoquímica de SPARC

Estudios previos en carcinoma de mama demostraron que SPARC es expresada sólo por los fibroblastos que rodean a las células malignas (Podhajcer y col, 1996). La expresión de SPARC por las líneas de melanoma demuestran que en este tipo de cáncer son las células neoplásicas las responsables de la expresión. Con el objeto de determinar si la expresión de SPARC está relacionada con la progresión del melanoma se compararon los niveles de expresiónde esta proteína en nevos benignos, nevos displásicos y melanomas primarios e invasivos.Como se describe en la tabla 2, SPARC fue detectada por inmunohistoquímica en el 100% (29/29) de los melanomas metastásicos (Figura 19) y en todos los tumores primarios analizados (14/14). No se observaron diferencias entre los melanomas primarios con fase de crecimiento radial y aquellos que presentaron crecimiento vertical.

Tabla 2: Detección inmunohistoquímica de SPARC

Patología	Número de casos positivos/ Numero de casos estudiados
Nevo benigno	4/25
Nevo displásico	16/16
Tumor primario	14/14
Metástasis	29/29

Se observó que SPARC está principalmente localizada en el citoplasma de las células malignas, asociado con microgránulos y vesículas localizadas cerca de la membrana plasmática. También se observó tinción en el estroma, lo cual indica que SPARC es secretada y estaría asociada con componentes de la matriz extracelular. Se observó positividad en fibroblastos cercanos al tumor, en células endoteliales, en glándulas sebáceas y sudoríparas, mientras que no se observó reactividad en los linfocitos infiltrantes (Figura 19). Se observó positividad en el 93.3 % de los nevos displásicos analizados (Figura 18). En contraste el 84 % (21/25) de los nevos benignos analizados fueron negativos y sólo el 16 % de las muestras analizadas mostraron una baja inmunoreactividad con el suero anti-SPARC (Figura 17). Los melanocitos normales y foliculares no reaccionaron con el antisuero. Estos resultados evidencian que la expresión de SPARC por células de melanoma está asociado con la progresión maligna del melanoma humano.

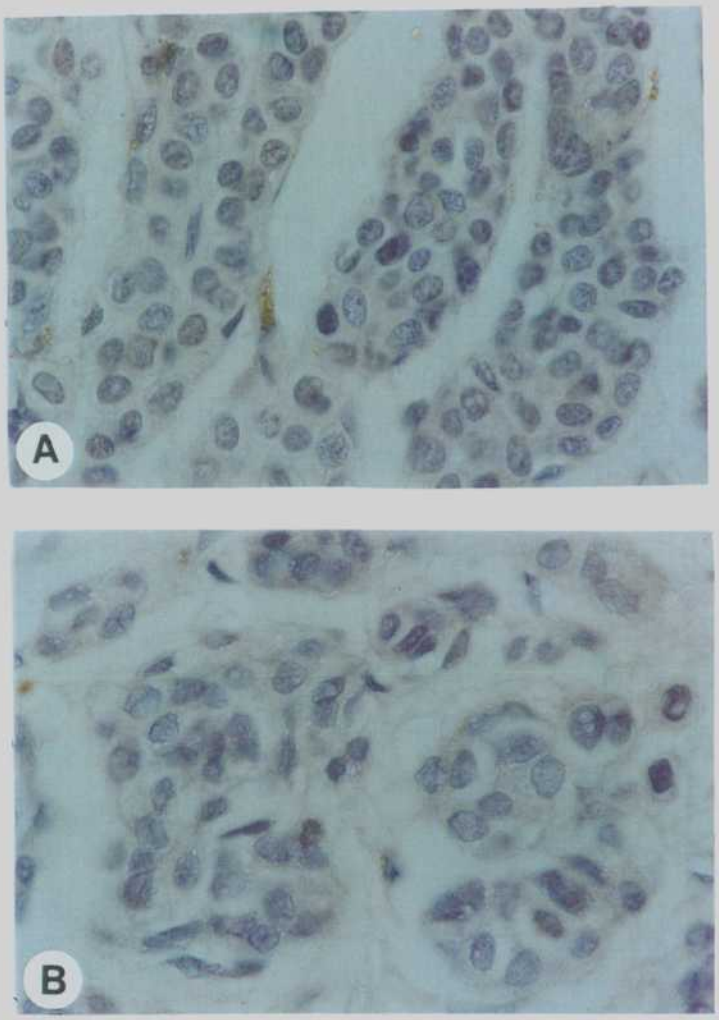


Figura 17: Inmunoreactividad de SPARC en nevos benignos. *La expresión de SPARC se determinó por inmunohistoquímica como se describe en la sección Materiales y Métodos. En la figura se muestran nidos de melanocitos normales negativos para SPARC. Aumento: 1000 X.*

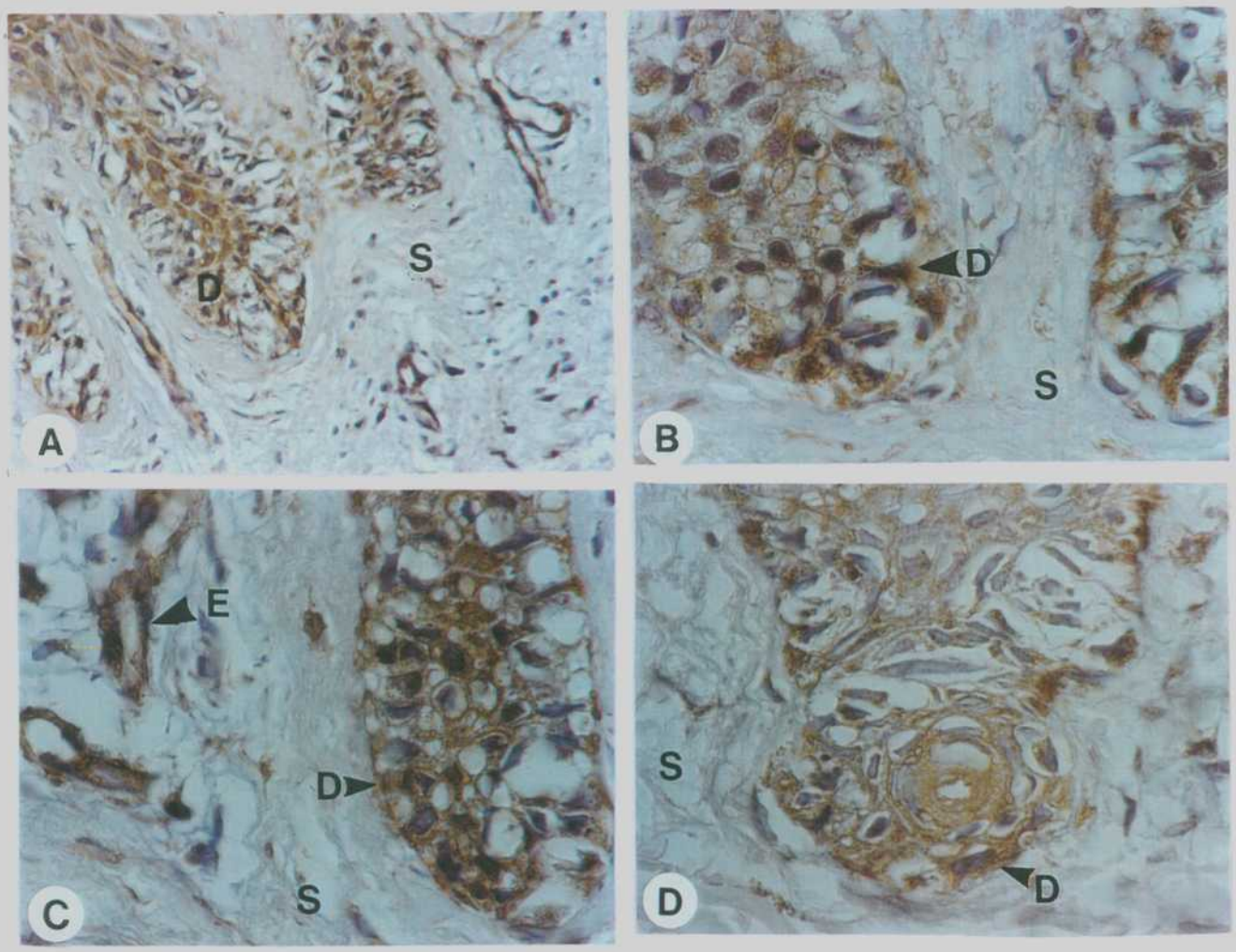


Figura 18: Detección de SPARC en nevos displásicos. *La expresión de SPARC se determinó por inmunohistoquímica como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se observa tinción en melanocitos displásicos basales (D) y fibroblastos circundantes (F), intensa positividad en células endoteliales (E) y estroma (S) negativo. Aumento : **A)** 400 X, **B**, **C**, y **D)** 1000 X.*

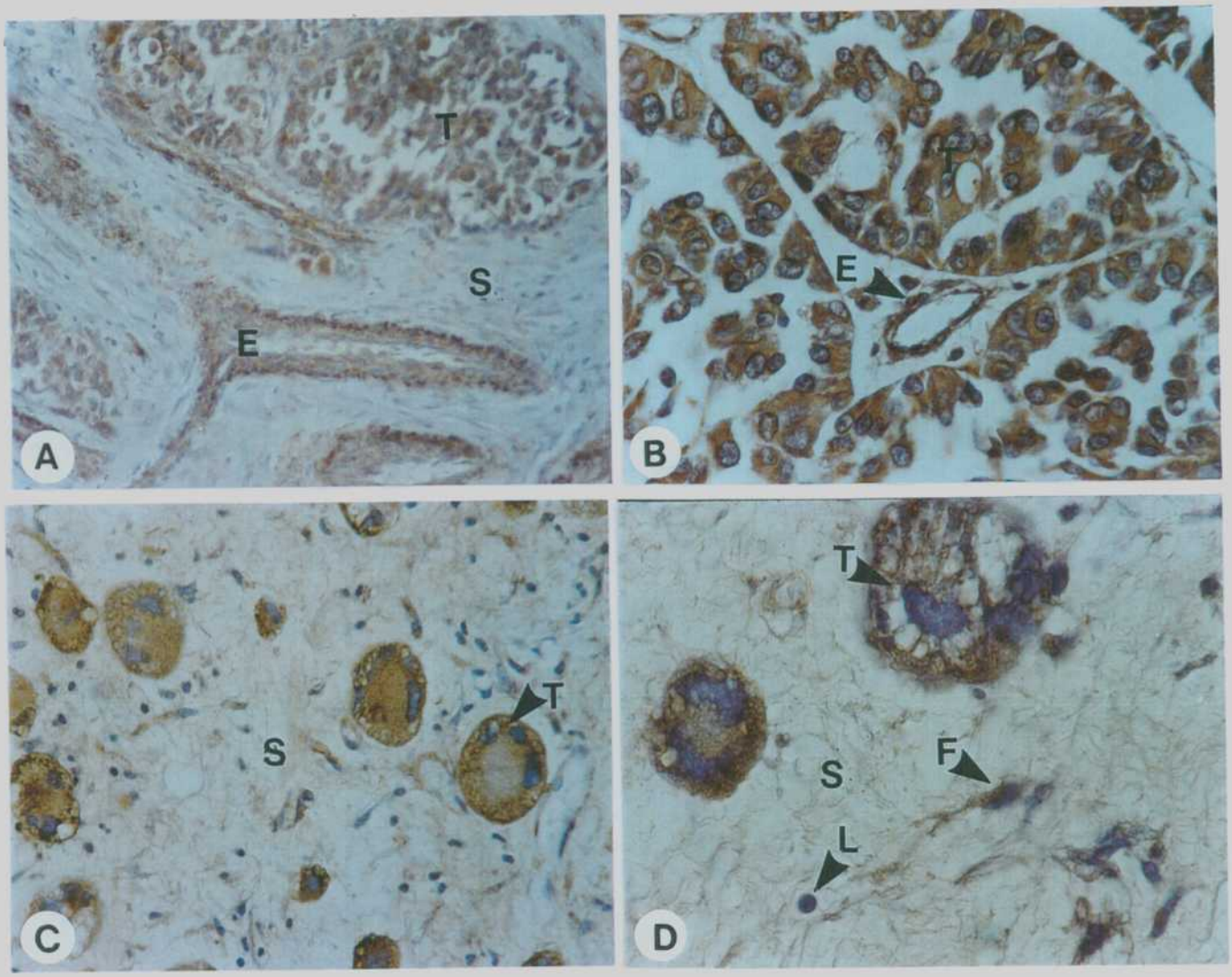


Figura 19: Detección de SPARC en melanomas metastásicos. *La expresión de SPARC se determinó por inmunohistoquímica como se describe en la sección Materiales y Métodos.* ***A)*** *Nido metastásico (T), endotelio (E) positivo y estroma (S) negativo. (Aumento: 200 X).* ***B)*** *Células tumorales (T) y endotelio (E) positivos. (Aumento: 400 X).* ***C)*** *Metástasis de melanoma maligno epiteloide, infiltrado unicelular positivo (Aumento: 400 X).* ***D)*** *Detalle del tumor C, pero en un campo distinto. Se observan células atípicas multinucleadas (flecha), fibroblastos (F) positivos, linfocitos (L) negativos y matriz fibrosa (S) con baja positividad (Aumento: 1000 X).*

Regulación de la expresión del mRNA de SPARC por TGF-β en líneas celulares de melanoma humano

Evidencias previas indican que la expresión de SPARC estaría regulada por TGF-β en fibroblastos humanos (Wrana y col, 1991; Lankat-Butlgereit y col, 1991; Reed y col, 1994). El análisis densitométrico de los ensayos de northern demostró que en las células HFL-1, la expresión del mRNA de SPARC fue estimulada 5.2 veces al cabo de 24 horas en presencia de TGF-β. Estudios similares se realizaron en las 3 líneas de melanoma humano, demostrando que el agregado de TGF-β no tiene efecto sobre los niveles de expresión del mRNA de SPARC (Figura.19). La membrana correspondiente a la línea IIB-MEL-LES fue rehibridizada con la sonda correspondiente a la metaloproteasa MMP-9 (92 kDa). Se observó que TGF-β induce un incremento en la expresión de la gelatinasa MMP-9, mostrando que las células de melanoma responden a TGF-β. No se observaron efectos en la regulación de SPARC por el agregado de EGF o TPA en las concentraciones estudiadas.

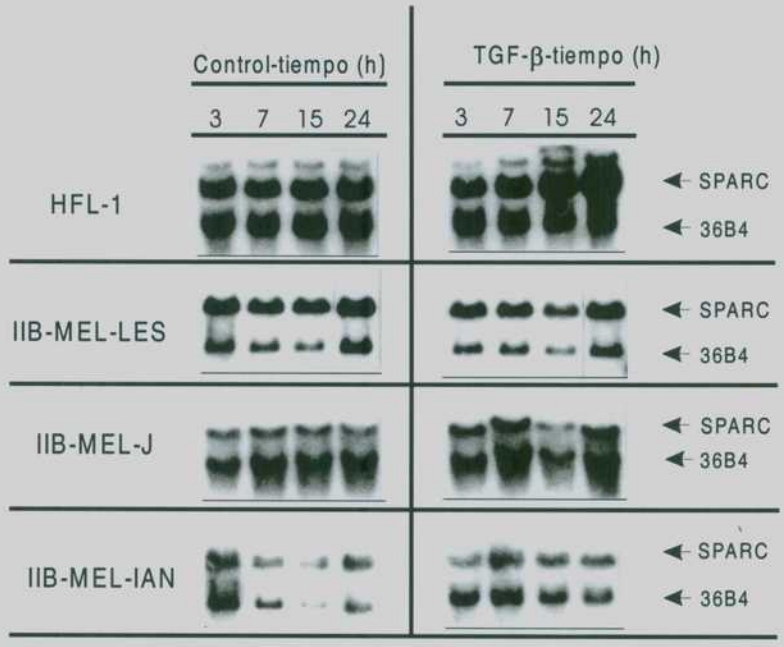


Figura 20: Regulación de la expresión del mRNA de SPARC en células de melanoma humano por TGF-β. *Células de melanoma y HFL-1 semiconfluentes fueron incubados en*

presencia o ausencia de 5 ng/ml de TGF-β durante los tiempos indicados y el RNA se extrajo de acuerdo a lo descripto en la sección Materiales y Métodos. 10 μg de RNA total fueron sembrados en cada calle. La membrana fue hibridizada con una sonda de cDNA de SPARC marcado con ^{32}P, deshibridizada y rehibridizada con una sonda de cDNA de 36B4. Las placas autorradiográficas fueron expuestas 72 horas a -70° C.

Disminución de la expresion de SPARC en líneas de melanoma humano transfectadas con secuencias antisentido

Con el objeto de comprender el rol de SPARC en el desarrollo y progresión del melanoma, dos de las 3 líneas de melanoma estudiadas, la línea mas agresiva: IIB-MEL-LES y la menos agresiva IIB-MEL-IAN fueron transfectadas con el plásmido pCMV/SPas mediante coprecipitación de DNA plasmídico con fosfato de calcio. Los clones celulares fueron seleccionados en presencia de G418 (0.5 mg/ml) y aislados mediante las técnicas de "aislamiento de colonias" ("ring cloning") o por "dilución límite". Posteriormente se analizó la expresión del mRNA de SPARC en doce clones derivados de la primera línea celular y 16 clones derivados de la segunda (Figura 21 y 22). Se seleccionaron 3 clones derivados de la línea IIB-MEL-LES (denominados L-1G, L-1E, L-1D) que mostraron una disminución del 27 %, 52 % y 87 % respectivamente en los niveles de expresión del mRNA de SPARC con respecto a las células control, L-CMV, transfectadas con el vector pCMV (Figura 21). En forma similar, 4 clones derivados de la línea IIB-MEL-IAN (denominados I-1H, I-1N, I-1T y I-1V) mostraron una disminución del 73 %, 82 %, 66 % y 61 % respectivamente en la expresión del mRNA de SPARC comparado con las células control I-CMV (Figura 21).

Cuando se analizaron los niveles de SPARC secretados al medio se observó que las celulas parentales y las L-CMV secretaron 0,13-0,2 μg/ml x 10^6 células de SPARC mientras que los clones L-1G, L-1E y L-1D secretaron 0,07-0,08; 0,03-0,05 y 0,01-0,03 μg/ml x 10^6 células de SPARC, correspondiente a una disminución de la secreción de SPARC de 54 %, 76,5 % y 88,5 % , respectivamente.

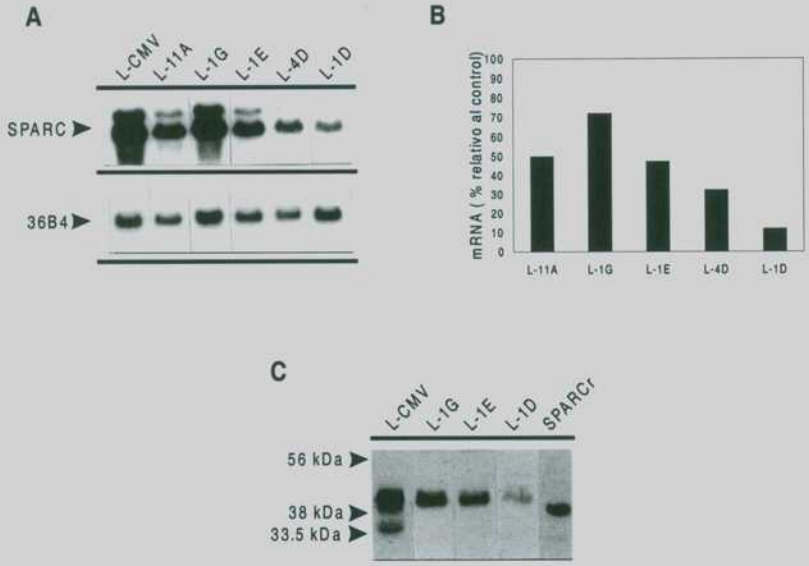


Figura 21: Disminución en los niveles de SPARC en los clones de IIB-MEL-LES transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. A) *Análisis por northern blot. 10 µg de RNA total fueron sembrados en cada calle. La membrana fue hibridizada con una sonda de cDNA de SPARC marcado con ^{32}P, deshibridizado y rehibridizado con una sonda de cDNA de 36B4.* ***B)*** *Análisis densitométrico (Ultroscan XL densitometer, Pharmacia) de la expresión del mRNA de SPARC por los diferentes clones con respecto al control (L-CMV) normalizada respecto de la señal de 36B4 en cada muestra.* ***C)*** *Análisis por western blot. 15 µg de proteína total, obtenido a partir de medio condicionado en ausencia de suero por células L-CMV y de cada uno de los diferentes clones fue sembrado en cada calle. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 % en condiciones reductoras. La inmunodetección fue realizada de acuerdo a lo descripto en la sección Materiales y Métodos utilizando el suero anti-SPARCr (dilución 1/1000). En la columna de la izquierda se indican los marcadores de peso molecular.*

Como describimos previamente SPARC es secretado al medio condicionado de células normales y migra como una única banda de aproximadamente 42 kDa. En contraste, las células IIB-MEL-LES y las IIB-MEL-IAN, así como muestras de melanomas, producen hasta 4 formas diferentes de la proteína como resultado de un clivaje

postraduccional inhibible por leupeptina. Los ensayos de western blot de los medios condicionados por los 3 clones derivados de IIB-MEL-LES revelaron la desaparición completa de las bandas de menor peso molecular y una disminución gradual en los niveles de expresión de la banda principal (Figura 22).

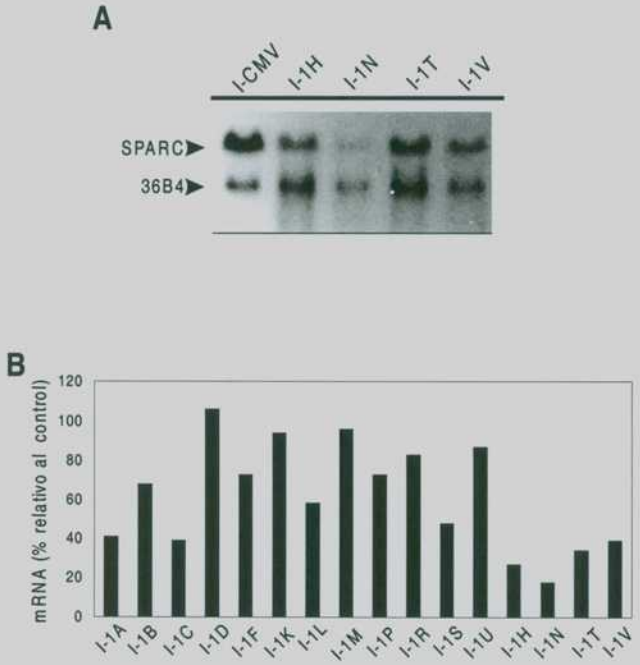


Figura 22 : Disminución en los niveles de SPARC en los clones de IIB-MEL-IAN transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. ***A)*** *Análisis por northern blot. 10 μg de RNA total fueron sembrados en cada calle. La membrana fue hibridizada con una sonda de cDNA de SPARC marcado con ^{32}P, deshibridizado y rehibridizado con una sonda de cDNA de 36B4.* ***B)*** *Análisis densitométrico (Ultroscan XL densitometer, Pharmacia) de la expresión del mRNA de SPARC por los diferentes clones con respecto al control (I-CMV) normalizada respecto de la señal de 36B4 en cada muestra.*

Caracterización de la línea IIB-MEL-LES transfectada con la secuencia antisentido de SPARC

Como se muestra en la figura 23, los 3 clones derivados de la línea IIB-MEL-LES, mostraron ciertas alteraciones morfológicas, en particular el clon L-1D, que exhibió una morfología más estirada indicando una mayor adhesividad al plástico. También se observaron diferencias morfológicas en los clones derivados de la línea de melanoma IIB-MEL-IAN.

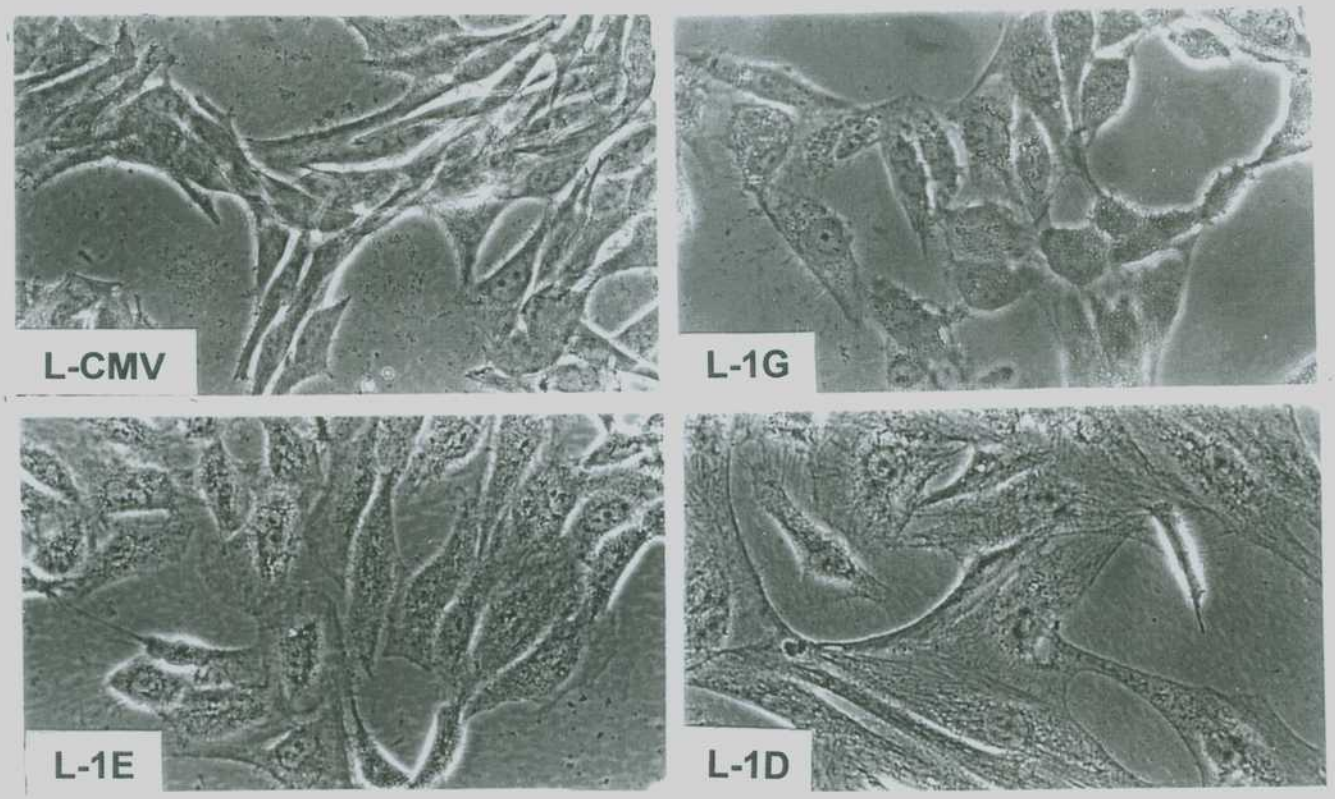


Figura 23: Características morfológicas de los clones IIB-MEL-LES transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. *Las células fueron fotografiadas bajo contraste de fases.Aumento: 400 X*

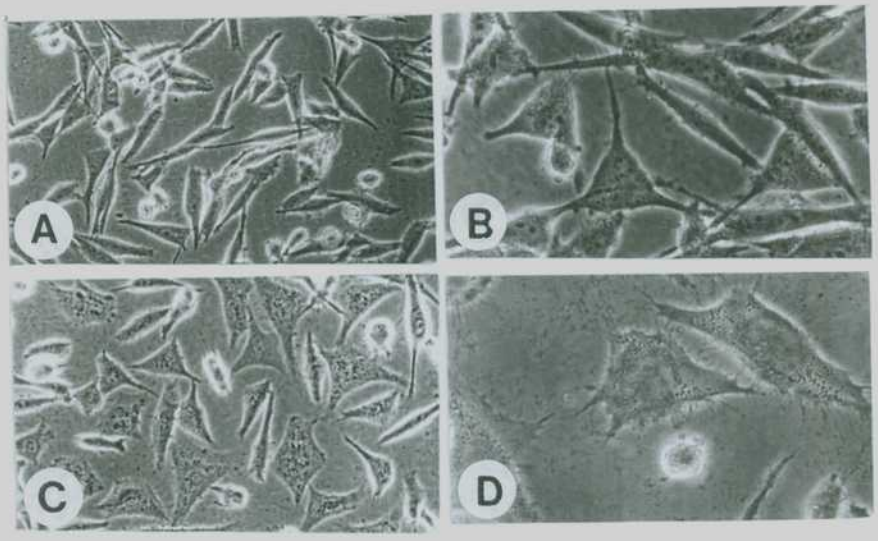


Figura 24 : Características morfológicas del clon I-IT derivado de la línea IIB-MEL-IAN transfectado con el cDNA de SPARC antisentido. *A y B) I-CMV, Cy D) I-1T. Las células fueron fotografiadas bajo contraste de fase. Aumento : A y C) 200 X. B y D) 400 X.*

La mayor adhesividad al plástico observada en los clones derivados de las dos líneas estudiadas podría deberse a un efecto directo de SPARC así como también a la regulación de la expresión de otras proteínas de MEC o de sus receptores. Trabajos previos señalan que el agregado exógeno de SPARC disminuye la expresión de fibronectina en células endoteliales aórticas bovinas, fibrosarcomas, osteosarcomas y carcinomas humanos (Lane, TF. y col., 1992; Kamihagi, K. y col., 1994). Estas evidencias nos llevaron a estudiar la expresión de fibronectina en las células de melanoma que presentan una disminución de la expresión de SPARC. Ensayos de northern blot mostraron que la disminución de la expresión de SPARC en la línea IIB-MEL-LES estaría asociada a un aumento en la expresión de mRNA de fibronectina (Figura 25). También estudiamos la expresión de la subunidad $\alpha 5$ del receptor de FN tipo integrina, $\alpha 5\beta 1$. Observamos un aumento de la expresión de esta subunidad en los

clones transfectados con la secuencia antisentido respecto de las células control (L-CMV), aun en el clon L-1G, que no muestra aumento en los niveles de expresión del mRNA de fibronectina. La expresión de la subunidad β1, resultó ser similar en todos los clones. Actualmente nos encontramos analizando los niveles de secreción de fibronectina, asi como también la funcionalidad de estos receptores en su capacidad de adhesiva a matrices de fibronectina.

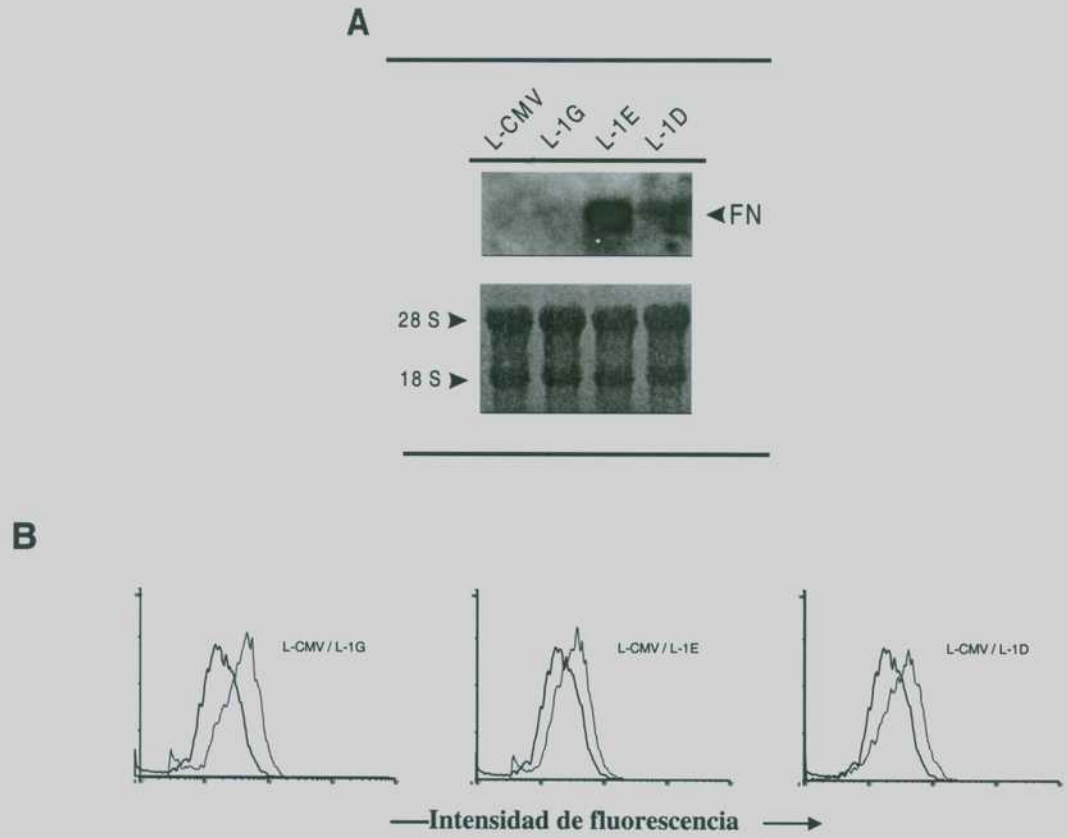


Figura 25 : Detección de fibronectina y de la subunidad α5 del receptor de fibronectina en células de melanoma transfectadas con la secuencia antisentido de SPARC. A) *Análisis por northern blot. 10 μg de RNA total fueron sembrados en cada calle. La membrana fue hibridizada utilizando como sonda fragmentos de fibronectina humana marcados con ^{32}P. En el panel inferior se muestra una tinción de la membrana con azul de metileno.* ***B)*** *Detección de la subunidad α5 por inmunofluorescencia indirecta sobre células L-CMV ( ), L-1G, L-1E y L-1D ( ) en suspensión cuantificada mediante citometría de flujo.*

Estudio del comportamiento *in vitro* de las células transfectadas con la secuencia antisentido de SPARC

1. Cinética de crecimiento

En comparación con la línea parental, la cinética de crecimiento *in vitro* de los distintos clones de la línea IIB-MEL-IAN no se vio afectada por la disminución en los niveles de expresión de SPARC (Figura 26B). Sin embargo, cuando los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES fueron plaqueados a baja densidad (1 x 10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos) se observó un leve retraso en el inicio de la fase de crecimiento logarítmico de los clones transfectados con SPARC antisentido. Una vez que los distintos tipos celulares alcanzaron la fase logarítmica no se observaron diferenicas Cuando estas células fueron plaqueadas a densidades mayores (2-4 x 10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos) no se observaron diferencias de crecimiento respecto de las células L-CMV.

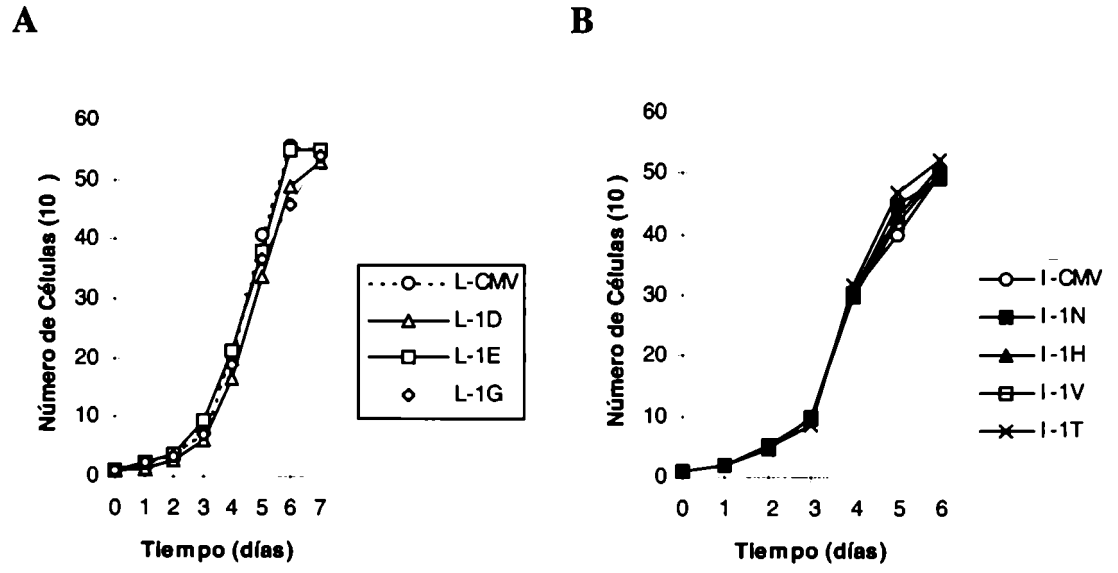


Figura 26: Curvas de crecimiento de los clones A) IIB-MEL-LES y B) IIB-MEL-IAN transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. *Las células fueron tripsinizadas, lavadas y 1 x 10^4 células fueron plaqueadas por triplicado en placas de 24 pocillos. Las células fueron cuantificadas en los tiempos indicados.*

2. Capacidad invasiva

Cuando se ensayó la capacidad de las células transfectadas de invadir membranas cubiertas con Matrigel, los clones L-1G y L-1E mostraron una disminución del 70-80 % de la capacidad invasiva, mientras que el clon L-1D fue esencialmente no invasivo (Figura 27). En forma similar los clones I-1H, I-1N, I-1T e I-1V mostraron una reducción estadísticamente significativa ($p<0,01$) del 55 %, 88 %, 88 % y 81 % respectivamente de su capacidad invasiva in vitro comparado con las células I-CMV .

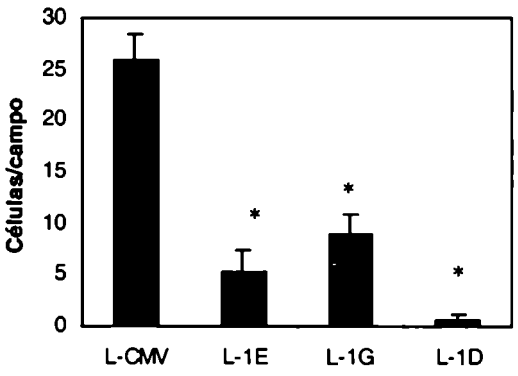


Figura 27: Capacidad invasiva de los clones IIB-MEL-LES transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. *Las barras representan la media ± SD. Cada ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento descripto en la sección Materiales y Métodos. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de Tukey-Kramer. *p<0,001; **p<0,01 ; ***p<0,05.*

En función de la correlación observada previamente entre la actividad de MMP-2 y la capacidad invasiva de las células IIB-MEL-LES, se estudiaron los niveles de MMP-2 en los diferentes clones derivados de esta línea. Estudios de northern demostraron una correlación directa entre los niveles de mRNA de SPARC y la disminución en los niveles de mRNA de MMP-2 en los clones de melanoma derivados de la línea IIB-MEL-LES (Figura 28A). La reducción observada en los niveles de mRNA fue acompañada por una disminución en la actividad de MMP-2 (Figura 28 C).

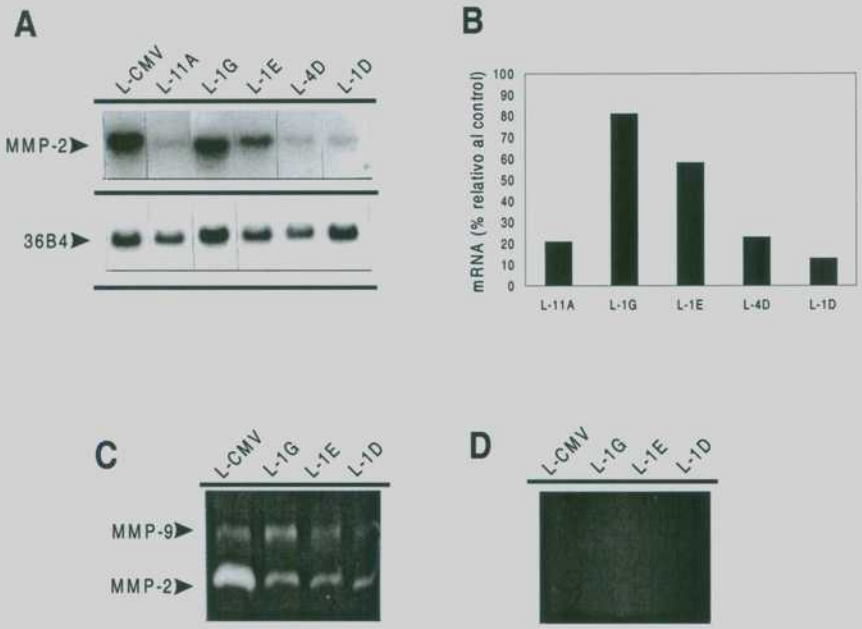


Figura 28: Disminución en los niveles de MMP-2 (72 kDa, gelatinasa A) en los clones IIB-MEL-LES transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. ***A)*** *Análisis por northern blot para el mRNA de SPARC, MMP-2 y 36B4.* ***B)*** *Expresión del mRNA de SPARC, MMP-2 y 36B4 por los diferentes clones respecto al control (L-CMV).* ***C)*** *Actividad gelatinolítica de MMP-2 y de MMP-9. La zimografía se realizó a pH neutro a partir de medio condicionado en ausencia de suero obtenido a partir de células L-CMV y de los distintos clones. En la figura se muestra la migración de las proteasas MMP-2 y MMP-9.* ***D)*** *Inhibición de la actividad gelatinolética de MMP por el agregado de EDTA 20 mM. La zimografía fue realizada en ausencia de* $CaCl_2$ *y* $ZnCl_2$ *y en presencia de EDTA.*

3. Capacidad adhesiva y migratoria

La adhesión de las células tumorales a la matriz que las rodea es el paso inicial que lleva a la degradación de la matriz pericelular. En forma similar la adhesión a matrigel debe preceder a la invasión. Los tres clones derivados de la línea IIB-MEL-LES mostraron una reducción en la capacidad de adherirse a Matrigel, sugiriendo que la disminución en la capacidad invasiva *in vitro* estaría asociada, al menos en parte, con una disminución en la capacidad adhesiva (Figura 29A). Los 4 clones derivados de la línea IIB-MEL-IAN también mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p<0,001$) en la capacidad de adherirse a Matrigel (I-1H, 50%; I-1T, 0%; I-1V, 0% e I-1N, 8%, comparado con las células control I-CMV). También analizamos la capacidad migratoria de estas células en ausencia de Matrigel. Mientras que no se observaron diferencias en los clones derivados de la línea IIB-MEL-IAN, se observó una pequeña, aunque estadísticamente significativa, disminución en la migración de los 3 clones derivados de la línea IIB-MEL-LES comparado con las células L-CMV(Figura 29B).

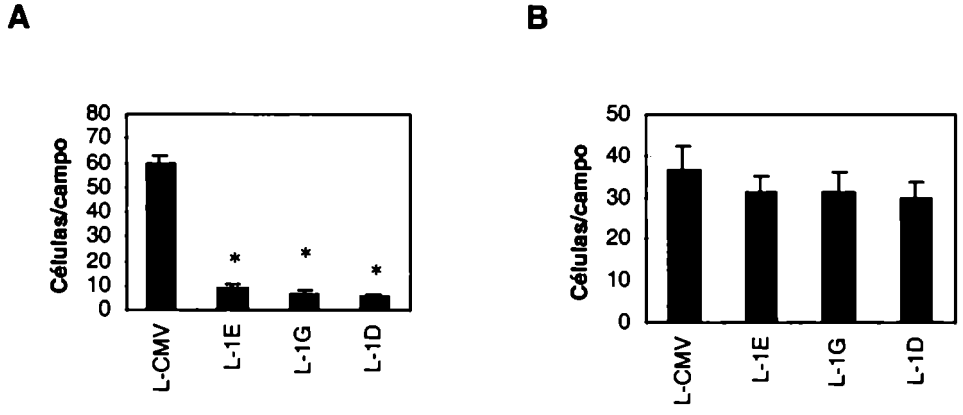


Figura 29: Capacidad adhesiva y migratoria de los clones IIB-MEL-LES transfectados con el cDNA de SPARC antisentido. *Ensayos de **A)** Adhesión y **B)** Migración. Las barras representan la media ± SD. Cada ensayo se realizó por triplicado de acuerdo a lo descripto en la sección Materiales y Métodos. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de Tukey-Kramer. *p<0,001 ; **p<0,01 ; ***p<0,05.*

La expresión de SPARC antisentido suprime la capacidad tumorigénica en ratones atímicos.

Los resultados obtenidos *in vitro* sugirieron fuertemente que la disminución en la expresión de SPARC podría jugar un rol preponderante en la capacidad tumorigénica de las células de melanoma. Con este propósito 3 x10^6 células correspondientes a cada uno de los clones L-1G, L-1E y L-1D y a las células control L-CMV, fueron inoculadas en ratones atímicos en forma subcutánea. En un primer experimento se observó que en un lapso de 240 días todos los ratones inyectados con las células control desarrollaron tumores y murieron. Sin embargo ninguno de los ratones inyectados con células provenientes de alguno de los 3 clones desarrolló tumor (Tabla 3). En un segundo experimento, utilizando 7 ratones por grupo, se observó que al cabo de 210 días todos los controles habían desarrollado tumor y muerto, mientras que ninguno de los ratones inyectados con células provenientes de los clones había desarrollado tumor.

	L-CMV	L-1G	L-1E	L-1D
Experimento 1	6/6	0/6	0/6	0/6
Experimento 2	7/7	0/7	0/7	0/7

Tabla 3: Capacidad tumorigénica in vivo de los clones transfectados con el cDNA antisentido de SPARC. *Ratones machos atímicos Balb/c nu-nu fueron inyectados en forma subcutánea con 3 x 10^6 células (en un volúmen de 0,1 ml) y fueron examinados durante 240 (experimento 1) y 210 (experimento 2) días. Los datos se expresan como la cantidad de ratones que desarrollaron tumores de 1,5 cm^3/total de ratones inoculados*

A los efectos de poder dilucidar el mecanismo por el cual la disminución en los niveles de SPARC evitaría el crecimiento tumoral, las células tumorales fueron inyectadas en forma subcutánea y se tomaron muestras de la zona de inyección a las 24 y 72 horas. El análisis histológico del sitio de inyección de las células L-1D, 24 horas después de la

inyección mostró un incremento, estadísticamente significativo, de polimorfonucleares (PMNLs) comparado con el sitio de inyección de células L-CMV (Figura 30) y una masiva necrosis tumoral. A las 72 horas la imágen histológica del sitio de inyección de células L-1D mostró pocas células tumorales viables y se mantuvo el proceso inflamatorio observado a las 24 horas, mientras que en el sitio de inyección de células L-CMV sólo se observaron pocos neutrófilos. Al cabo de 5 días, en el sitio de inyección de células L-1D no se observaron células tumorales viables, mientras que en el sitio de inyección de células L-CMV apenas se observó una necrosis central.

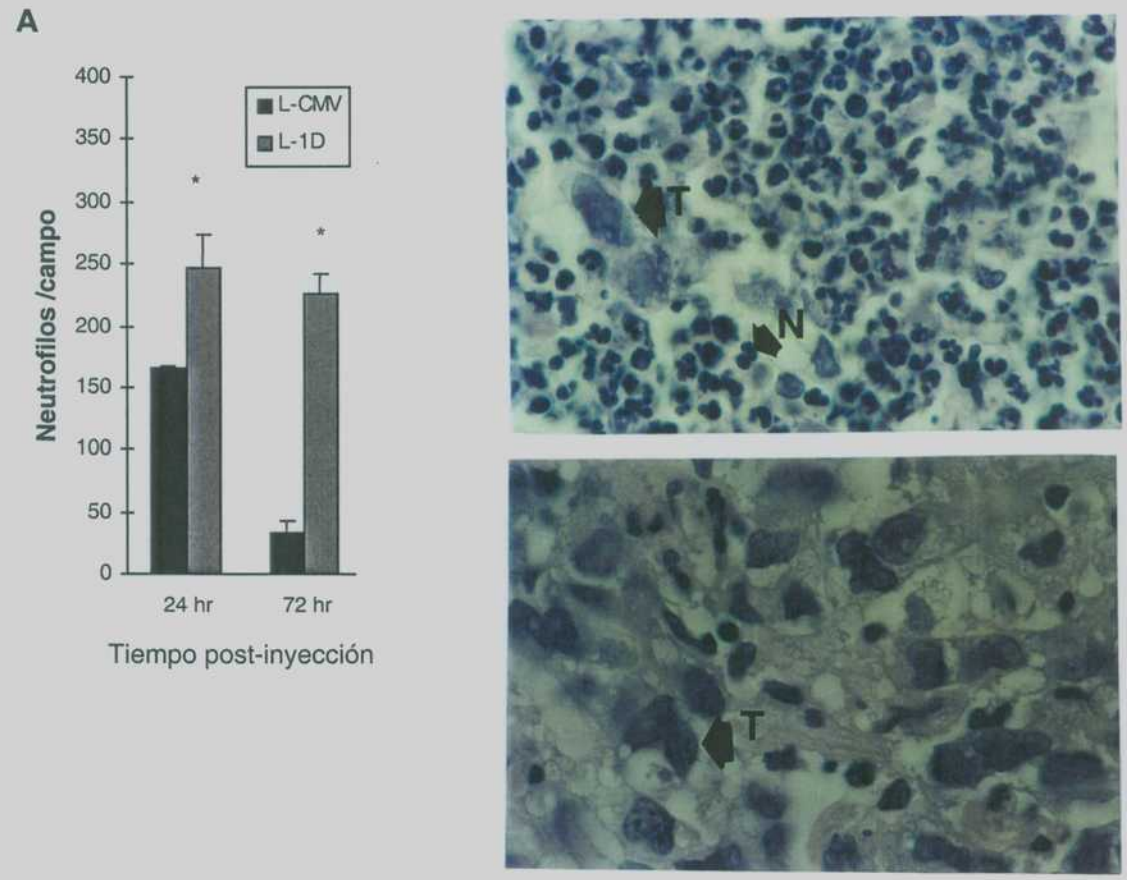
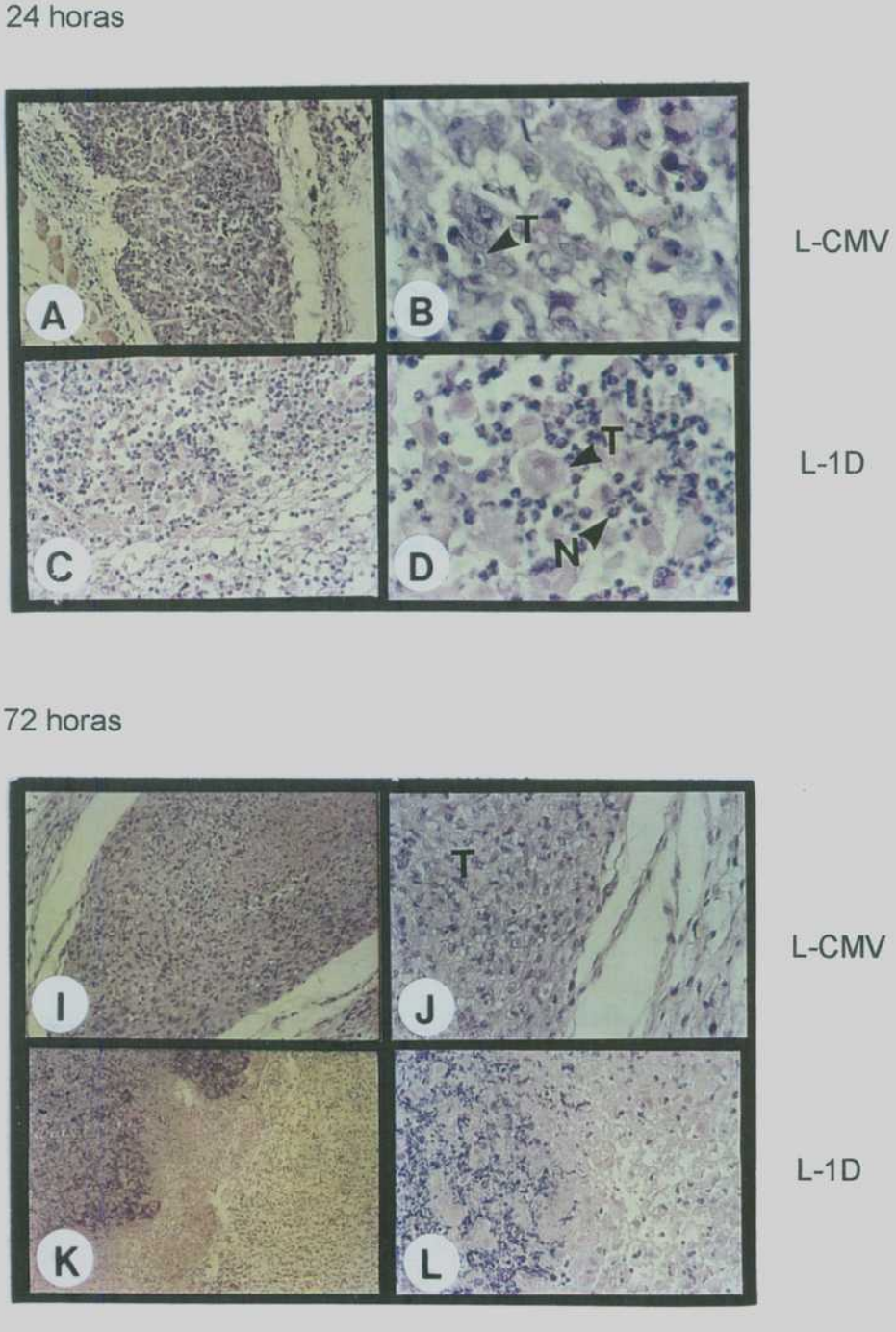


Figura 30 : Infiltrado de neutrófilos en el sitio de inyección de las células tumorales. *Las células se inyectaron en forma sc. en el flanco izquierdo de ratones atímicos. Los sitios de inyección fueron removidos luego de 24 y 72 hs, embebidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina.**A)** Cuantificación del infiltrado de neutrófilos en el sitio de inyección de L-CMV y L-1D. Las barras representan la media ± SD, *p<0,001). Se contó el número de neutrófilos en*

en 5-10 campos diferentes de cada corte sobre fotografías (aumento 1000 X). ***B)*** *Micrografía del sitio de inyección (1000 X) de L-CMV y L-1D 72 hs. post-inyección. En la figura se señala la presencia de T: células Tumorales y N: neutrófilos*

El análisis histológico fue repetido utilizando como control células IIB-MEL-LES transfectadas con el gen codificante para β-galactosidasa (L-βgal.), obteniéndose resultados similares (Figura 31).



5 días

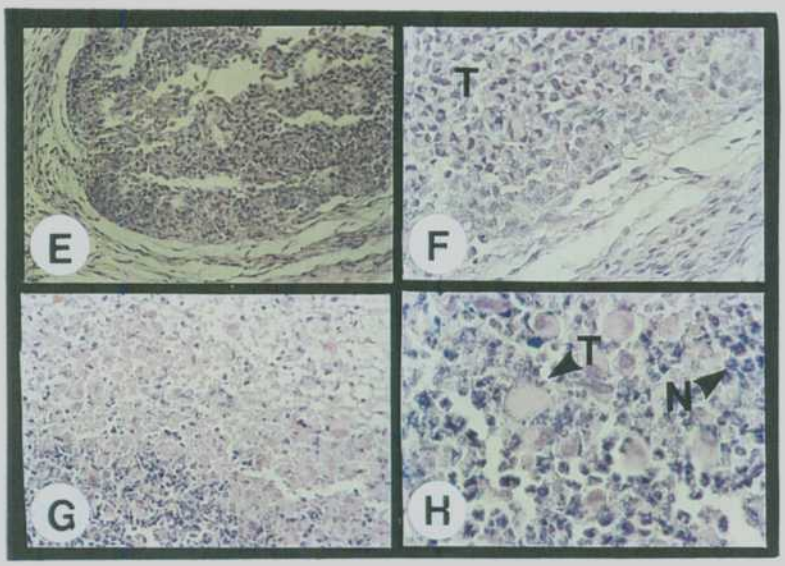


Figura 31: Análisis histológico del sitio de inyección. *En la figura se muestran micrografías de los sitios de inyección de células L-βGal y L-1D removidos a distintos tiempos : 24, 72 hrs y 5 días. Los sitios de inyección fueron removidos, embebidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina.* ***A, C, E, G, I, K*** *(200 X);* ***B, D, H*** *(1000 X)* ***F, J, L*** *(400 X). En la figura se señala la presencia de T: células tumorales y N: neutrófilos.*

Una imágen similar en el reclutamiento de neutrófilos se observó en el sitio de inyección de células I-1T e I-1N comparado con las células I-CMV (Figura 32). En el caso de las células I-1N, no se hallaron células tumorales viables en los sitios de inyección luego de 72 hrs, mientras que la ausencia de células viables en los sitios de inyección de células I-1T se evidenció transcurridos 7 días.

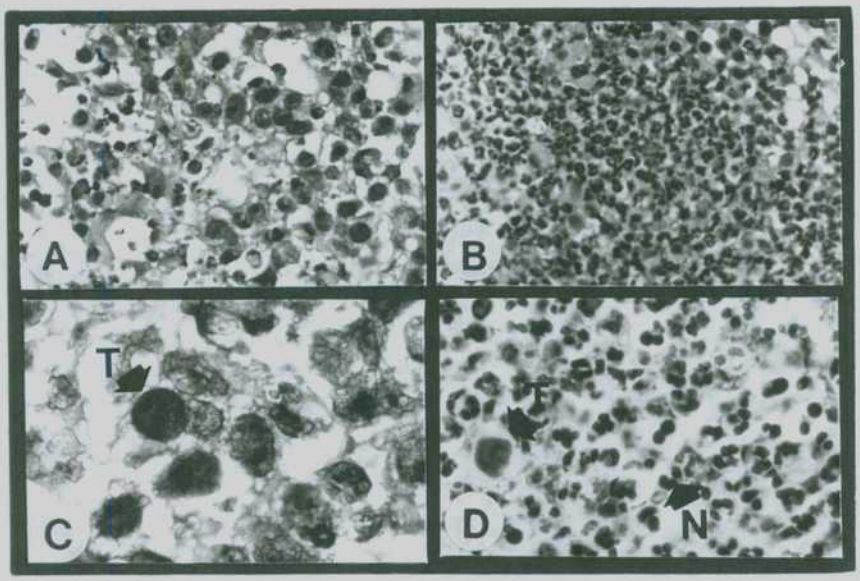


Figura 32: *Micrografía del sitio de inyección de células I-CMV* ***(A y C)*** *e I-1T* ***(B y D)*** *removidos luego de 72 hrs. N, neutrófilos; T, células tumorales. Aumento : A y B, 400 X, C y D, 1000 X. En la figura se señala la presencia de T : células tumoralesy N :neutrófilos.*

Análisis de factores quimiotácticos para leucocitos por células tumorales

Con el objeto de analizar el mecanismo por el cual los neutrófilos observados en los cortes histológicos, son atraídos al sitio de inyección analizamos la actividad quimiotáctica de los sobrenadantes de las células L-CMV y de dos clones transfectados con la secuencia antisentido de SPARC: L-1G y L-1D sobre polimorfonucleares humanos. Los ensayos de migración in vitro de PMNLs usando el sistema de transwells mostró un aumento de 7,1 ± 1,6 ($p<0,0001$) en la migración inducida por el sobrenadante libre de suero de las células L-CMV respecto del control. La migración fue inhibida por el agregado de medio condicionado en la cámara superior. De acuerdo a lo observado *in vivo*, las células L-1G y L-1D indujeron un aumento significativo en la migración de PMNLs respecto de las células L-CMV. Ensayos preliminares indican que cuando el mismo experimento fue repetido utilizando PMNLs de ratones nude se obtuvieron resultados similares.

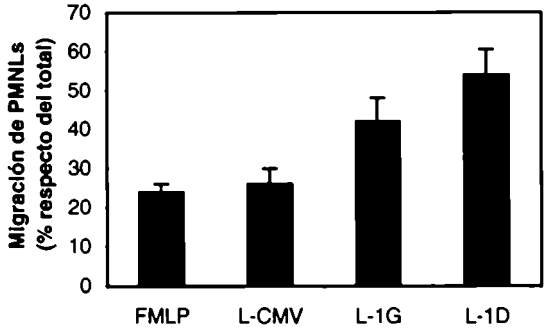


Figura 31: Migración de PMNLs in vitro.en respuesta a los medios condicionados por los distintos clones derivados de la línea de melanoma IIB-MEL-LES. *Se indica el porcentaje de células que migraron respecto del total de PMNLs sembrados en cada ensayo. Se utilizó FMLP (10 mM) como control positivo del ensayo. Las barras representan la media ± SD de triplicados. * p< 0,001, ** p<0,01, ***p<0,05.*

DISCUSION

La cascada de eventos metastásicos e invasivos involucra complejas interacciones célula-célula y célula-MEC. Proteasas, factores de crecimiento y proteínas con características adhesivas y anti-adhesivas han sido implicadas como reguladores de la degradación de componentes de la MEC y la morfología celular.

SPARC es un miembro de una pequeña familia de genes implicadas en la morfogénesis de tejidos normales. Funcionalmente ha sido agrupada, junto con tenascina y trombospondina, como una proteína anti-adhesiva. SPARC es una glicoproteína de secreción altamente conservada en la evolución y se expresa durante el desarrollo embrionario y en forma restringida en algunos tejidos adultos. La expresión de SPARC está asociada a procesos que implican remodelación de la matriz. Estas observaciones sugieren que SPARC jugaría un rol clave en la remodelación de la matriz. La interacción entre las células tumorales y la MEC es un componente importante en los procesos tumorigénicos y metastásicos. En función de lo aquí expuesto y de evidencias previas sobre la participacíon de SPARC en los procesos invasivos en carcinomas mamarios (Podhajcer y col., 1996) decidimos investigar la participación de la proteína SPARC en el desarrollo y progresión del melanoma humano.

La expresión de SPARC está asociada a la progresión del melanoma humano

En este trabajo se describe la producción de un suero policlonal dirigido contra SPARC humana recombinante y la utilización de este suero en el estudio de la expresión de esta proteína en melanoma humano. Si bien la expresión de SPARC en melanoma ha sido sugerida por algunos autores (Howe, Ch. y col, 1990) no se había demostrado hasta el momento la asociación de la proteína con esta patología. En este trabajo se demuestra que la expresión de SPARC está asociada a la progresión de melanoma humano. Todos los melanomas primarios y metastásicos analizados expresaron altos niveles de SPARC, mientras que la mayoría de los nevos displásicos mostraron niveles moderados de expresión. Un bajo porcentaje de nevos benignos (16 %) presentaron bajos niveles de SPARC, mientras que en los melanocitos normales no

se detectó la presencia de la proteína. Estos resultados sugieren que la proteína estaría asociada al desarrollo y progresión del melanoma humano (Ledda y col, 1997)

En forma paralela a la realización de este trabajo, el grupo de Porte y col. (1995) describió la asociación entre SPARC y la progresión tumoral en carcinomas de colon, mama, pulmón, riñón, corteza adrenal, de cerebro (glioma) y ovario. Los resultados en glioma, mama y colon fueron posteriormente confirmados por varios autores.(Bellahcene, A. y Castronovo, V., 1995; Porter, PL y col, 1996; Podhajcer OL. y col, 1996, Rempel y col., 1998). En estos últimos, la expresión de SPARC fue asociada a los fibroblastos que rodean a las células tumorales (Porte y col, 1995; Podhajcer y col., 1996). Estas observaciones sugieren que las señales originadas a partir de las células tumorales serían capaces de regular los niveles de SPARC en los fibroblastos que se encuentran en el frente de invasión. A diferencia de lo que sucede con las células de cáncer de mama y colon, las células de melanoma por sí solas expresan altos niveles de SPARC. Estos niveles no fueron incrementados por TGF-β. Estos datos indican que la alta expresión constitutiva de SPARC podría conferir a las células de melanoma la capacidad por sí mismas de remodelar la matriz que las rodea durante el proceso de progresión tumoral.

Trabajos recientes, posteriores a la publicación de los resultados descriptos en esta tesis demostraron un aumento en la expresión de SPARC y el desarrollo de cáncer de esófago (Porte H, 1998) y meningiomas (Rempel, 1999). Recientemente Kato y col (1998) han descripto una mayor expresión de SPARC en líneas de melanoma murino altamente metastásicas (BL-6 y BF10) respecto de células con baja capacidad metastásica (B16).

Con el objeto de determinar si la expresión de SPARC puede ser utilizada como un marcador pronóstico de melanoma actualmente nos encontramos analizando, por técnicas de inmunohistoquímica, la expresión de la proteína en un mayor número de muestras de nevos benignos, displásicos y melanomas en distintos estadíos. Este trabajo se está llevando a cabo en colaboración con la Dra Inés Bravo del hospital Castex. Un trabajo publicado en febrero de este año propone a SPARC como un marcador pronóstico de meningiomas invasivos (Rempel y col, 1999).

Modificaciones post-traduccionales de SPARC expresada en melanoma

Con el objeto de comprender el rol de SPARC en la progresión del melanoma y debido a las distintas funciones asignadas a los diferentes dominios de esta proteína realizamos una caracterización parcial de la proteína expresada por células de melanoma. En este trabajo describimos que SPARC es sintetizada por células de melanoma como una glicoproteína que en algunos casos sufre un clivaje extracelular mediado por proteasas de tipo serina o cisteína. Aunque la glicosilación de SPARC no parece ser necesaria para la inhibición del estiramiento celular (Yost y col, 1994), Kelm y Mann (1991) demostraron recientemente que la diferente glicosilación de la proteína resulta en diferencias en la capacidad de la misma de interactuar con distintos tipos de colágeno. Mientras que SPARC expresada por células óseas posee una estructura oligosacárida de alta manosa y se une a colágeno de tipo I, III y V, la proteína derivada de plaquetas, que poseee oligosacáridos de tipo complejo no parece tener afinidad por estos tipos de colágenos. Estas observaciones sugieren que la diferente glicosilación se refleja en funciones diferentes. Sin embargo, existen controversias en la literatura dado que Sage y col. han descripto que SPARC secretada por células endoteliales y fibroblastos bovinos contienen carbohidratos complejos y muestra afinidad por colágenos (Sage y col, 1989). Por otra parte el grupo de Pottgiesser (1994) demostró que SPARC deglicosilada es indistinguible de la molécula nativa en su capacidad para unirse a colágeno tipo IV. En la presente tesis se muestra que la proteína secretada al medio condicionado por células de melanoma, es suceptible a la endoglicosidasa PNGasa F, pero no a endo H y neuraminidasa, sugiriendo que posee una estructura de oligosacáridos de tipo complejo. Esta sería diferente al tipo de glicosilación observada en SPARC secretada por plaquetas, ya que esta última fue suceptible al tratamiento con neuraminidasa (Kelm RJ. y Mann KG., 1991). Estas diferencias pueden conferir a la proteína producida por los melanomas una capacidad de unión específica a componentes de la matriz, distinta a las descriptas para la proteína secretada por otros tipos celulares.

La naturaleza y el rol de los fragmentos obtenidos luego del clivaje de SPARC por parte de las células de melanoma no están claros. Es razonable pensar que el clivaje de SPARC y la liberación de dominios específicos pueden alterar de manera importante el rol funcional de esta molécula y en consecuencia, la interacción de las células de

melanoma con la matriz. Los fragmentos de SPARC liberados por las células de melanoma podrían actuar bloqueando la interacción normal de SPARC nativa con un receptor de superficie celular o uniéndose a un receptor de manera diferente a como lo hace SPARC nativa, provocando de esta manera, cambios en la transducción de señales. Estos fragmentos también podrían interferir en las interacciones de SPARC con otros componentes de la matriz, alterando el ensamblado de la misma, la distribución de elementos del citoesqueleto y la adhesividad de las células. Si bien se conoce poco sobre los mecanismos a través de los cuales SPARC ejerce diversos efectos, recientemente Young y col. (1998) han descripto que el agregado exógeno de SPARC a células endoteliales induce la fosforilación en tirosina de β-catenina y paxilina.

Sólo algunos de los melanomas metastásicos analizados presentaron la capacidad de clivar a la proteína para dar origen a formas de menor peso molecular. Este mismo resultado se reflejó en las líneas de melanoma estudiadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, el clivaje que daría origen al doblete de menor peso moleclar (34-36 kDa) estaría mediado por proteasas de tipo serina-cisteína que se encuentran presentes en los medios condicionados de estas líneas de melanoma (Podhajcer, 1995). El resultado del clivaje sería la liberación de un fragmento correspondiente al dominio acídico I ya que anticuerpos dirigidos contra el péptido M 4.2 (aa 254-273), cedidos por la Dra. Helene Sage (University of Washington, Seattle, USA) reconocieron todas las formas de SPARC liberadas por las 2 líneas de melanoma estudiadas. Distintos grupos han demostrado que SPARC es sustrato de proteasas de tipo serina. Mauer y col (1992) han demostrado que SPARC puede ser clivada por quimotripsina liberando el extremo C-terminal de la proteína. También se ha descripto que SPARC posee sitios de clivaje para elastasa, que resultan en la liberación de un polipéptido correspondiente a parte del dominio I. Recientemente Kato Y. y col. (1998) han reportado la expresión de 3 formas de SPARC de distinto peso molecular secretadas por células de melanoma murino. Según los autores la aparición de estas distintas especies no fue inhibible por el agregado de inhibidores de MMPs, a pesar de la alta actividad de MMPs en el medio condicionado por dichas células (comunicación personal).

La aparición de funciones biológicas crípticas diferentes a las observadas en la proteína intacta no es exclusivo de SPARC. La adhesión de células tumorales a fibronectina está asociado a una reducción del fenotipo maligno (Giancotti, FG. y Ruoslathi, E., 1990). Por el contrario, una forma truncada de esta proteína, GPS

(Growth Promoting Substance o sustancia promotora del crecimiento) indujo la proliferación de células de carcinoma renal (Kochevar y col, 1992). Un ejemplo de la importancia de estos procesamientos lo constituyen 2 polipéptidos recientemente descriptos como inhibidores del proceso angiogénico y supresores del proceso metastásico: Angiostatina (O'Reilly MS., 1994) y Endostatina (O'Reilly MS, 1997). El primero es un péptido de 38 kDa y corresponde a un fragmento interno del plasminógeno, mientras que endostatina es un péptido de 20 kDa que corresponde al extremo C-terminal del colágeno tipo XVIII. La actividad antiangiogénica y antimetastásica es una característica de los productos derivados de la proteólisis de las proteínas nativas, pero está ausente en plasminógeno y colágeno XVIII. La disponibilidad o activación de la proteasa o proteasas que median el procesamiento de plasminógeno o colágeno XVIII serían los principales puntos de control. En cuanto a SPARC, resulta importante mencionar que mientras la proteína completa ha sido descripta como un inhibidor de la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Lane TF. y Sage EH., 1994), fragmentos derivados de la proteína que contienen la secuencia Lys-Gly-His-Lys (KGHK) o GHK , correspondiente al dominio II de la proteína estimulan la proliferación de células endoteliales e inducen la formación de cordones de endotelio *in vitro* y aumenta la angiogénesis *in vivo*. (Iruela-Arispe ML. y col., 1995; Lane, TF. Y col., 1994; Funk, SE. y Sage, EH., 1993). Dada la importancia de la proteólisis endógena de las proteínas y la liberación de fragmentos polipeptídicos que tienen funciones biológicas diferentes a las proteínas de las cuales derivan, hemos iniciado estudios tendientes a determinar el efecto de péptidos diseñados a partir de diferentes dominios de la proteína sobre procesos involucrados en la progresión tumoral tales como: proliferación, adhesión e invasión de distintas matrices. Este trabajo se llevará a cabo en colaboración con la Dra. Helene Sage (University of Washington, Seattle, USA).

SPARC no afecta el crecimiento celular de las líneas de melanoma estudiadas.

Con el objeto de determinar si la inhibición de la expresión de SPARC en forma crónica afecta el comportamiento de las células de melanoma, dos líneas de melanoma (IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN) fueron transfectadas con la secuencia de SPARC en

orientación inversa. La reducción en los niveles de expresión del mensajero y de la proteína fueron verificados mediante ensayos de northern y western blot (Figura 21). No se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento de los distintos clones con diferentes niveles de expresión de SPARC. Si bien los datos del presente trabajo muestran la ausencia de un efecto de SPARC en el crecimiento de células de melanoma, el análisis del rol de SPARC en el crecimiento celular es difícil de establecer. Trabajos iniciales de Sage y col. (1991) demostraron que SPARC es capaz de inhibir la proliferación celular de células endoteliales. Posteriormente se describió que péptidos correspondientes al dominio II de SPARC pueden estimular la proliferación celular (Funk y Sage, 1993), lo cual sugiere que el clivaje de SPARC puede tener consecuencias importantes sobre la capacidad de SPARC de modular el crecimiento celular. Kamihagi y col (1994) describieron que SPARC obtenida de hueso bovino, no tuvo efecto sobre el crecimiento de diferentes líneas de células malignas humanas. Resulta interesante que tanto la sobrexpresión como la reducción de la expresión de SPARC en células de carcinoma embrionario murino F9, no afectó la cinética de crecimiento de estas células (Everitt y Sage, 1992). Sin embargo, Mok y col (1996) demostraron que la sobreexpresión estable de SPARC en células de cáncer de ovario redujo su capacidad de crecimiento *in vitro* e *in vivo*. En general, la interacción de SPARC con los componentes de la matriz y la regulación de los niveles de expresión de los mismos, parecen ocurrir en ausencia de todo efecto significativo sobre el crecimiento celular (Lane y Sage, 1994). Recientemente Motamed y Sage (1998) han descripto que el efecto anti-adhesivo, pero no el antiproliferativo, descripto para SPARC sobre células endoteliales, estaría mediado a través de una vía dependiente de la fosforilación de tirosina (Tyr) mientras que el efecto antiproliferativo dependería en parte de la transducción de señales vía un receptor acoplado a proteína G. Tomados en conjunto, los datos de la literatura y del presente trabajo sugieren que la inhibición del crecimiento celular mediada por SPARC se limita a determinados tipos celulares y es necesario estudiar el modo de acción de los diferentes dominios de SPARC sobre diferentes tipos celulares.

SPARC como modulador de la capacidad adhesiva.

Cierto grado de adhesión es necesario para que una célula sea capaz de invadir el tejido conectivo. Nuestros resultados indican que células que tienen una expresión reducida de la proteína presentan una morfología mas estirada en superficies plásticas, lo que coincide con el hecho que SPARC ha sido descripta como una proteína antiadhesiva. Esta observación fue evidente en los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES (Figura 23), y en aquellos derivados de la línea IIB-MEL-IAN Figura 24). Similares cambios morfológicos fueron descriptos por Everit y col (1992) en células F9 transfectadas con una secuencia antisentido para SPARC. Contrariamente a lo esperado, dado que SPARC es considerada una proteína con efectos antiadhesivos, las células de melanoma con niveles de expresión de SPARC reducidos, permanecieron redondeadas sobre matrices basales reconstituídas (Matrigel), lo cual indica que SPARC podría estar regulando el repertorio de integrinas u otros receptores de MEC que reconocen componentes específicos de la matriz. Dado que matrigel es una matriz cuyos principales componentes son laminina, colágeno IV y entactina, actualmente estamos estudiando los niveles de expresión de los receptores para estas proteínas. Resultados recientes indican que la reducción en la capacidad adhesiva a matrigel podría estar dada por una reducción en la capacidad de adhesión a laminina mediada por una disminución de los receptores de laminina de tipo integrina.

Nuestros resultados indican que las células que presentan una reducción en los niveles de SPARC muestran un incremento en la expresión de la subunidad $\alpha 5$ del principal receptor de fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) acompañado por un aumento en los niveles de mRNA de fibronectina. Este resultado confirma observaciones previas que muestran una regulación negativa de SPARC sobre la expresión de fibronectina (Figura 25) en células endoteliales aórticas bovinas, fibrosarcomas, osteosarcomas y carcinomas humanos. Es importante señalar que SPARC no solo regula la producción de distintas proteínas de MEC sino que la expresión de ésta también está regulada por uno de sus ligandos de MEC como es colágeno I (Iruela -Arispe, ML. Y col, 1996). En ratones mov 13, que carecen de colágeno intersticial se ha observado una disminución de los niveles de SPARC. De la misma forma los ratones "knockout"para SPARC producen niveles significativamente menores de colágeno I comparado con los ratones normales (Gilmour y col., 1998). Resulta importante el estudio del rol de SPARC en la

modulación de componentes de MEC y sus receptores ya que las interacciones de las células con la MEC juegan un rol fundamental sobre el comportamiento celular, disparando señales intracelulares que regulan la expresión génica.

SPARC modula la capacidad invasiva de las líneas de melanoma estudiadas.

En este trabajo se estudió el rol de SPARC sobre la capacidad invasiva de las células de melanoma. Confirmando estudios de otros laboratorios, hemos descripto que la capacidad invasiva de las células de melanoma está asociada al aumento de los niveles de MMP-2 (Stetler-Stevenson, WG. y col, 1993). Los resultados obtenidos indican que la disminución de la expresión de SPARC en las 2 líneas de melanoma estudiadas redujeron la capacidad invasiva de estas células sobre membranas basales reconstituídas (Matrigel) (Figura 27). Esta reducción en la capacidad invasiva podría deberse, al menos en parte, a una disminución en la capacidad de migratoria o adhesiva de estas céluas. En cuanto a la capacidad migratoria no se observaron diferencias entre los clones derivados de la línea IIB-MEL-IAN y su control. Solo se observaró una pequeña, aunque estadísticamente significativa, disminución de la migración de los 3 clones derivados de la línea IIB-MEL-LES comparados con su control (Figura 29). En cuanto a la capacidad de adhesión de estas células a membranas basales reconstituídas, resultados posteriores mostraron que cuando los ensayos de invasión y adhesión se hicieron en presencia de suero fetal bovino o suero proveniente de ratones, las células con expresión reducida de SPARC aumentaron su adhesión a matrigel, pero mantuvieron la reducción en la capacidad invasiva. Estos experimentos sugieren que el efecto de SPARC sobre la capacidad invasiva no estaría dado por una disminución en la adhesividad a la matriz.

En este trabajo se muestra que la disminución de los niveles de SPARC está acompañada por una reducción en los niveles de mRNA de MMP-2 que se refleja en una menor secreción de la enzima (Figura 28). La identificación de MMP-2 se llevó a cabo por inmunodetección mediante ensayos de western blot y la utilización de la línea HFL-1 como control positivo de expresión y actividad (Figura 28). La ausencia de actividad gelatinolítica observada en los zimogramas, cuando estos fueron incubados en ausencia de cationes divalentes y en presencia de un agente quelante (EDTA) nos permitió verificar que la actividad detectada correspondía a una MMP. MMP-2 en su

forma activa cliva colágeno IV, el principal componente de la membrana basal. Estos datos sugieren que la reducción de los niveles de expresión de MMP-2 sería la responsable de la disminución de la capacidad invasiva observada *in vitro*. Dado que se ha descripto que la activación de MMP-2 ocurre en la superficie celular, se puede postular sugieren que la activación de esta enzima ocurriría en forma localizada en el frente invasivo, en cantidades que no pueden ser detectadas en los ensayos de actividad en geles. Ensayos de zimografía *in situ* combinados con inmunohistoquímica permitirán determinar en nuestro sistema si la activación de MMP-2 ocurre en la superficie celular. Trabajos *in vitro* sugieren que MMP-2 cumple un rol importante en la invasión de células de melanoma y recientemente Vaisanen y col (1998) han propuesto que la expresión de MMP-2 sería un evento temprano en la progresión tumoral del melanoma y un marcador pronóstico desfavorable de la enfermedad. La mayor expresión de SPARC en melanoma, así como lo regulación de la expresión de MMP-2 por SPARC sugiere que el aumetno de SPARC podría conferir a las células de melanoma un fenotipo invasivo. La regulación de la expresión de metaloproteasas de matriz por SPARC ha sido demostrada por varios grupos. Tremble y col (1993) describieron la inducción de MMP-1, MMP-9 y MMP-3 en fibroblastos sinoviales de conejo cultivados en presencia de SPARC. En forma similar, Shankavaram y col. (1997) encontraron que SPARC induce MMP-9 y MMP-1 en monocitos humanos. Recientemente, Gilles y col.(1998) describieron que SPARC regula la actividad de MMP-2 en células de cáncer de mama, en este caso a través de la disminución de los niveles de TIMP-2 secretados.

Distintos fragmentos de SPARC estarían involucrados en la regulación de MMPs. Tremble y col (1993) han descripto que un péptido correspondiente a la secuencia de aa 154-173 sería el responsable del mayor aumento en la síntesis de MMP-1 por los fibroblastos sinoviales de conejo. Shankavaraum y col. (1997) también encontraron que este mismo péptido sería el principal inductor de la producción de MMP-1 y MMP-9 en monocitos humanos, mientras que los resultados de Gilles y col. (1998) muestran que el péptido correspondiente a los aa 5-23, de la región N-terminal (dominio acídico) sería el responsable de la activación de MMP-2 en células tumorales de mama.

La secuencia antisentido de SPARC suprime la capacidad tumorigénica in vivo

Los resultados de los ensayos in vitro y la asociación entre la expresión de SPARC y el desarrollo del melanoma humano, descripto previamente, nos llevaron a estudiar si la disminución de los niveles de expresión de SPARC en las líneas de melanoma humano podrían afectar la capacidad tumorigénica de las mismas. Para ello se evaluó el crecimiento tumoral de estas células en ratones atímicos. La ausencia de formación inicial del tumor y el desarrollo de una rápida necrosis de las células tumorales, indican que SPARC o algún factor cuya expresión está mediada por esta proteína jugarían un rol clave en el rechazo tumoral. Componentes de la matriz, tales como laminina, han demostrado ser capaces de modular la disponibilidad de citoquinas y quimoquinas (Gilat y col, 1996), indicando que cambios en la composición de la matriz o en las interacciones entre células tumorales y componentes de la matriz pueden alterar las señales inmunológicas. Los resultados presentados en el presente trabajo muestran que el rechazo de las células tumorales está asociado a un masivo y localizado infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares (PMNLs), sugiriendo una mayor disponibilidad de factores quimiotácticos de PMNLs (Figuras 30, 31, 32). La evaluación histológica sobre cortes teñidos con hematoxilina no permitió identificar claramente la presencia de otras poblaciones de leucocitos en el sitio de inyección

Los ensayos de migración de neutrófilos *in vitro,* realizados con los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES, mostraron una mayor atracción por parte de los clones transfectados con la secuencia antisentido de SPARC indicando que la disminución de los niveles de la proteína dispararía la síntesis de factores quimiotácticos para neutrófilos. Ensayos posteriores mostraron que células L-CMV, L-1D y L-1G no fueron capaces de inducir la migración de poblaciones de mononucleares humanos. Es importante señalar que los resultados *in vitro* de quimiotaxis presentados en este trabajo corresponden a leucocitos humanos, sin embargo, ensayos preliminares utilizando PMNLs murinos aislados a partir de sangre perisférica de ratones atímicos mostraron un comportamiento similar. La producción de proteínas con efecto quimiotáctico sobre PMNLs por parte de las células de melanoma ha sido descripto por varios autores, siendo IL-8 y GRO-α las quimoquinas más citadas (Norgauer y col, 1996; Shattuck RL. Y col, 1994; Scheibenbogen, C. y col., 1995; Ciotti, P. y col, 1995; Singh, RK. Y col, 1994; Scadendorf, D. y col, 1993).

Los datos presentados en este trabajo sugieren que los neutrófilos serían los responsables de la actividad antitumoral. Sólo ensayos de depleción *in vivo* de células NK, macrófagos y PMNLs en el modelo utilizado de ratones atímicos permitirá demostrar que son estos últimos o no, los responsables del rechazo tumoral mediado por SPARC.

Ensayos posteriores a los presentados en esta tesis mostraron que los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES transfectados con la secuencia de SPARC antisentido inhibieron el crecimiento tumoral de la línea parental cuando fueron coinyectados con células control no modificadas genéticamente. El análisis histológico de los sitios de inyección mostró una imágen similar a la observada en el sitio de inyección de células L-1D (Figura 28, 29) con un masivo infiltrado inflamatorio. Recientemente, el grupo de Seino K y col (1997) describieron por primera vez que la expresión de CD95-L (ligando de Fas, Fas-L) induce el rechazo tumoral mediado por PMNLs. Resultados similares han sido reportados posteriormente por varios autores (Allison, J. y col., 1997; Chen y col, 1998). También se ha descripto que una forma recombinante soluble del ligando de Fas humano (sFasL) tiene actividad quimiotáctica sobre neutrófilos humanos y murinos (Seino y col., 1998). Actualmente nos encontramos estudiando la expresión de Fas-L y sFas-L en nuestro sistema experimental.

Consideraciones Finales

A pesar de la gran información que se tiene sobre la expresión, propiedades bioquímicas y actividades celulares de SPARC, poco se conoce acerca de la función de la proteína. Con el objeto de analizar la función de SPARC in vivo, el grupo de Gilmur y col. (1998) interrumpieron por recombinación homóga el locus de SPARC y obtuvieron ratones deficientes en la proteína. En base a los estudios previos se esperaba que los animales deficientes en esta proteína presentaran alteraciones durante el desarrollo. Estos animales no mostraron alteraciones durante el desarrollo hasta los 6 meses. A partir de esta edad desarrollaron patologías oculares caracterizadas por la formación de cataratas y ruptura del cristalino. Hasta el momento no se ha descripto otra alteración en estos animales, pero constituyen una herramienta importante para llevar a cabo estudios más detallados que permitan entender el rol de SPARC en el comportamiento celular *in vivo*. Este resultado plantea también la posibilidad de existencia de otras proteínas que podrían

compensar las funciones de SPARC en los ratones "knockout" para este gen. Hasta el momento se conoce muy poco acerca del sobre el mecanismo de acción de SPARC en la función celular a través de cascadas bioquímicas. Uno de los objetivos planteados por nuestro laboratorio consiste en la identificación y caracterización de los receptores de superficie y vías de señalización intracelulares de SPARC, y la interacción con otras proteínas como factores de crecimiento y/o proteínas de matriz extracelular que pueden regular actividades específicas durante la progresión del melanoma.

Las estrategias antisentido que comprenden el uso de oligodeoxinucleótidos y RNA derivados de plásmidos son un modo atractivo de terapia génica antitumoral (Mercola y Cohen, 1995). La expresión constitutiva de RNA antisentido codificante para oncogenes y factores de crecimiento demostró ser efectiva para inducir la reducción de la tumorigenicidad y las características malignas (Trojan y col., 1993; Laird y col., 1994; Aoki y col,m 1995; Harlow y Lane, 1988). Sin embargo, salvo unas pocas excepciones, no se ha llegado a la supresión total de la formación del tumor (Mercola y Cohen, 1995). El presente estudio demuestra que la inhibición de SPARC en células de melanoma eliminó su capacidad tumorigénica, proporcionando un marco terapéutico potencial para el "targeting"genético de SPARC en la terapia antisentido del melanoma humano.

CONCLUSIONES

A partir de este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones :

1) Se demuestra que la expresión de la proteína SPARC están asociados al desarrollo y progresión del melanoma humano.

2) Los datos aportados en el presente estudio proporcionan la primera evidencia de que SPARC desempeña un rol clave en la capacidad tumorigénica de líneas de melanoma humano.

3) La reducción de los niveles de expresión de SPARC en las 2 líneas de melanoma estudiadas resultó en cambios morfológicos, acompañados de una reducción en la capacidad adhesiva e invasiva de membranas basales reconstituídas. En los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES, se observó una disminución en los niveles de MMP-2.

4) Los clones derivados de la línea IIB-MEL-LES transfectados con la secuencia de SPARC antisentido mostraron un aumento en la expresión de la integrina $\alpha 5$ y del mRNA de fibronectina.

REFERENCIAS

-Adams, JC y Watt FM (1993).*Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix.* Development **117**, 1183-1198.

-Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R.M., Damjanovich, L., Herlyn, M. y Buck, C.A. (1990).*Integrin distribution in malignant melanoma : association of the beta 3 subunit with tumor progression.* Cancer Res. **5**, 6757-6764.

-Albelda, S.M. (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* **68**, 4-17

-Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M ;, Roberts, K y Watson, JD. (1994) Molecular Biology of the Cell, 3rd Edition, Garland Publishing, Inc., pp. 1269.

-Albini, A., Melchiori, A., Santi, L., Liotta, LA., Brown, PD.y Stetler-Stevenson, WG. (1991). *Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2.* J,Natl. Cancer Inst. **83**, 775-779.

-Alby, L. y Auerbach, R. (1984).*Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5739-5743.

-Alvarez, OA. Carmichael DF., y DeClerck YA. (1990). *Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases.* J.Natl. Cnacer Inst. **82**, 589-595.

-Asch, AS. y Nachman, RL. (1989). *Thrombospondin : Phenomenology to function.* Prog. Hemost Thromb. **9**, 157-176.

-Balch, Ch.M., Houghton, AN.y Peters, L. (1992). *Cutaneous Melanoma.* En : Cancer Principles and Practice of Oncology IV edition. HB.Lippincot, pp:1612-1631.

-Barnhill, RL. y Mihm, MC.Jr (1989) *Pigmented spindle cell naevus and its variants : Distinction from melanoma.* Br.J. Dermatoi **21** : 717.

-Basset, P., Bellocq, JP., Wolf, C., Stoll, J. y Hutin, P., Limacher, JM., Podhajcer, OL., Chenard, MP., Rio, MC., Chambon, P. (1990). *A novel metalloproteinase genes specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas.* Nature **348**, 699-704.

-Bellahcene, A. y Castronovo, V. (1995). *Increased expressionof osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins in human breast cancer.* Amer. J. Pathol., **146**: 95-100.

-Bergson, C., Zhao, H., Saijoh, K., Duman, RS. y Nester, EJ (1993) *Ezrin and osteonectin, two proteins associated with cell shape and growth, are enriched in the locus coeruleus.* Mol. Cell.Neurosci. **4**, 64-73.

-Birkedal-Hansen H. (1987). *Catabolism and turnover of collagens : Collagenases.* Meth. Enzymol. **144**, 140-171.

-Birkedal-Hansen H. (1995). *Proteolytic remodelling of extracellular matrix.* Current Opinion in Cell Biology 7, 728-735.

-Bradford, MM. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.* Annal Biochem. **72**, 248-254.

-Breton-Gorius, J., Clezardin, P., Guichard, J., Debili, N., Malaval, L., Vainchenker, W., Cramer, EM. y Delmas, PD. (1992). *Localization of platelet osteonectin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelets and megakaryocytes.* Blood **79**, 936-941.

-Brooks, PC., Stromblad, S., Sanders, LC., von Schalscha, TL., Aimes, RT., Stetler-Stevenson, WG., Quigley, JP. And Cheresh, DA. (1996) *Localization of Matrix Metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin αvβ3.* Cell **85**, 683-693.

-Burridge, K.y Chrzanowska-Wodnicka, M. (1986). *Focal adhesions, contractility and signaling.* Cancer Rev. **4**, 18-78.

-Cawston, TE., Galloway, WA., Mercer, E., Murphy, G. y Reynolds, JJ. (1981). *Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase.* Biochem.J. **195**, 159-165.

-Chan, BM., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, BR. y Hemler, ME. (1991) Science 251, 1600-1602.

-Chen, WT., Wang, J., Hasegawa, T., Yamada, SS. y Yamada, KM. (1986) J. Cell Biol. 103, 1649-1661.

-Chiquet-Ehrismann R. (1990). *What distinguishes tenascin from fibronectin ?* FASEB J.**4**, 2598-25604.

-Chiquet-Ehrismann R. (1991) *Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix interactions.* Curr. Opin. Cell. Biol. **3**, 800-804.

-Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). *Single step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem* **162,**156-159.

-Chuluyan, H.E. e Issekutz (1993). *VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18 independent transendothelial migration of human monocytes.* J.Clin. Invest **92**, 2768-2777.

-Ciotti, P., Rainiero, ML., Nicolo, G., Spina, B., Garre,C., Casabona, F., Santi, PL y Bianchi-Scarra, g. (1995). *Cytokine expression in human primary and metastatic melanoma cells : analysis in fresh bioptic specimens.* Melanoma Res **5**, 41-47.

-Clark , WH. Jr. Y Fraumeni, JF. *The hereditary variant of malignant melanoma.* En : Clark WH, Goldman L, Mastrangelo, MJ. Eds. Human malignant melanoma. New York : Grune y Stratton (1979), pp 139-166.

-Clark, W.H. Jr. (1991). *Tumor progression and the nature of cancer.* Br. J. Cancer, **64**, 631-344.

-Clark, WH. Jr., Elder, DE., y Van Horn, M.(1987) *The biologic forms of malignant melanoma.* Hum. Pathol. **17**, 443.

-Clezardin, P., Malaval, L., Ehrensperger, A., Delmas, PD., Dechavanne,M. y McGregor, JL. (1988) *Complex formation of human thrombospondin with osteonectin.* Eur. J. Biochem **175**, 275-284

-Coussens y Werb (1997). Cell **9**, 439-442.

-Crombie, IK.(1979) *Racial differences in melanoma incidence.* Br. J. Cancer **40**, 185-193.

-Daniloff, JK., Crossin, KL., Pincon-Raynound, M., Murawsky, M., Rieger, F. y Edelman, GM. (1989) *Expression of cytotactin in the normal and regenerating neuromuscular system.* J.Cell. Biol. **108**, 625-635.

-De Clerck, YA., Yean, TD., Ratzkin, BJ., Lu, HS. y Langeley, KE. (1989). *Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells.* J.Bio. Chem (1989) **264**, 17445-17453.

-D'Enrico, A., Garbisa S., Liotta L.A., Castronovo, V., Stetler-Stevenson W.G. y Grigioni W.F. (1991). *Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression.* Mod Pathol **4**, 239-246.

-Di Persio, CM., Jackson, D.A. y Zaret, K.S. (1991). *The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte mnorphology.* Mol. Cell.Biol. **11**, 4405-4414.

-Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Hofmann, T., Isenmann, D., Wasi, S. y Sodek, J. (1988). *Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae.* Biochem. J., **253**, 139-151.

-Duray, P., Palozzo, J., Gown, AM. Y Ohuchi, N. (1988) *Melanoma cell heterogeneity.* Cancer **61**, 2460-2468.

-Ehring F. Ilustración Científica en Dermatología. Cinco siglos de historia. EDIKA MED (1995). pp : 152-153.

-Elder, DE., Guerry, D., Epstein, MN. y col (1984) *Invasive malignant melanoma lacking competence for metastasis.* Am. J. Dermopathol.**6**, 55.

-Elder, D.E., Clark, W.H. Jr., Glenitsas, R., Guerry, D.IV. y Halpern, A.C. (1993). *The ertly and intermediate precurson lesions of tumor progression in melanocytic system : Common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi.* Sem Diagnostic Pathol.

-Erickson, H.P. e Iglesias, J.L. (1984). *A six- armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations.* Nature (Lond) **311**, 267-269.

-Erickson , HP. y Bourdon, MA. (1989). *Tenascin : an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues, embryonic brain, and tumors. Nnu.rev.* Cell Biol. **5**, 71-92

-Everitt, E.A., y Sage, E.H. (1992). Expression of SPARC is correlated with altered morphologies in transfected F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **199**, 134-146

- Everitt, EA. Y Sage EH. (1993) Overexpression of SPARC in stably transfected F9 cells mediates attachment and spreading in Ca^{2+}- deficient medium. *Biochem. Cell. Biol.***70**, 1368-1379.

-Fearon E.(1997) *Human Cancer Syndromes : Clues to the origin and nature of cancer.* Science **278**,1043-1050.

-Fernández Rodríguez, J.L., Geiger, B., Salomon, D. y Ben-Zév. A. (1993). *Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells.* J.Cell Biol. **122**, 1285-1294.

-Floege, J., Alpers, CE., Sage, eh., Pritzl, P., Gordon, K., Johnson, RJ. Y Couser, WG . (1992) *Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo.* Lab. Invest. **67**, 486-497.

-Folkman, J. y Klagsbrun, M. (1987). *Angiogenic factors.* Science **235**, 442-447.

-Funk, S.E. y Sage E.H. (1991). *The Ca2+-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 2648-2652 .

-Funk SE y Sage EH. (1993). *Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on ADN synthesis by endothelial cells and fibroblasts.* J. Cell Physiol. **154**, 53-63.

-Giancotti, FG. y Ruoslahti, E. (1990). *Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells.* Cell **60**, 849-859.

-Giancotti, F.G. y Mainiero F. (1994). *Integrin mediated adhesion and signaling in tumorigenesis.* BBA **1198**, 47-64.

-Gilat, D., Cahalon, L., Harshkovitz, R. y Lider, O. (1996). *Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix.* Immunol. Today, **17**, 16-20

-Gilles Ch., Bassuk, JA, Pulyaeva H., Sage H., Foidart, J y Thompson EW.(1998). *SPARC/Osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines.* Cancer Res. **58**, 5529-5536.

-Gilmour, DT., Lyon, GJ., Carlton, MBL., Sanes, RJ, Cunningham, JM., Anderson, JR., Hogan, BLM., Evans, MJ y Colledge, WH. (1998) *Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens.* The EMBO Journal **17**, 1860-1870.

-Gladson, C.L. y Chersh, D.A. (1991).*Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells.* J.Clin. Invest. **88**, 1924-1932.

-Gluck, U., Kwiatkovski, D.J. y Ben-Zeév, A. (1993). *Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 383-387.

-Goldberg, GI., Marmer, BL., Grant, GA., Eisen, AZ., Wilhelm, S.y He, CS. (1989). *Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 8207-8211

-Goldblum, SE., Ding, X., Funk, SE. y Sage, EH. (1994) *SPARC regulates endothelial cell shape and barrier function.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

-Good, DJ., Polverini, PJ., Rastinejad, F., Le Beau, MM., Lemons, RS., Frazier, WA.y Bouck, NP. (1990). *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 6624-6628.

-Goovaerts, G. yBuyssens N. (1988). *Nevus cell maturation or atrophy.* Am. J. Dermatol.**10**, 20-27.

-Greene, M.H., Clark, W.H. Jr., Tucker, M.A., Krae,er, K.H., Elder, D.E. y Fraser, M.C. (1985a). *High risk of malignant melanoma in melanoma prone families with dysplastic nevi.* Ann Intern. Med, **102**, 458.

-Greene, M.H., Clark, W.H.Jr., Tucker, M.A., Elder, D.E., Kraemer, K.H., Guerry, D. y col. (1985b). *Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome.* N. Engl J. Med, **312**, 91

-Gruber, S.B., Barnhill, R.L., Stenn, K.S. y Roush, G.C.(1985). *Nevomelanocytic lesions of the conjuntiva- a new approach to their classification.* Pathology **17**, 275.

-Guerra L., Mordoh, J., Slavutsky, I., Larripa, I. y Medrano, E.E. (1989). *Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogeneous human melanoma cell line.* Pigment Cell res. **2**, 504-509.

-Gulcher, J.R., Nies, D.E., Marton, L.S. y Stefanson, K. (1989). *An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a novel repeat of potential N-glycosylation sites.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 1588-1592.

-Harlow E, Lane D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual.* Chapter 5: Immunizations. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 53-138

- Haskill, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S. y Warren, K. (1988) J.Immunol. **140**, 1690-1694.

-Hasselaar P, Loskutoff DJ, Sawdey M y Sage EH. (1991) *SPARC induces the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells.* J Biol Chem **266,** 13178-13184.

-Hasselaar P. y Sage EH (1992) *SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells.* J Cell Biochem **49**,272-283.

-Herlyn, M. y Malkowicz, S.B. (1991). *Regulatory pathways in tumor growth and invasion.* Lab. Invest. **65**, 262-271.

-Herlyn, M y Houghton A.N. (1992). *Biology of melanocytes and melanoma.* Cap.8, En : Cutaneous Melanoma. Balch CM, Houghton A.N., Milton G.W., Sober A.J. y Soong *S. J.B. (eds).* Lippincott Company. Philadelphia. Pags. 82-92.

-Holland, PWH., Harper, SJ., McVey, JH. y Hogan, BLM. (1987). *In vivo expression of mRNA for the Ca^{2+}-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization.* J. Cell. Biol. **105**, 473-482.

-Howe CC, Kath R, Mancianti ML, Herlyn M, Mueller S. y Cristofalo V (1990). *Expression and structure of human SPARC transcripts: ARNm de SPARC is expressed by human cells involved in extracellular matrix production and some of these cells show an unusual expression pattern.* Exp Cell Res **188**,185-191.

-Hughes, RC., Taylor, A., Sage, H. y Hogan, BLM (1987). *Distinct patterns of glycosilation of colligin, a collagen-binding glycoprotein.* Eur. J. Biochem. **163**, 57-65.

-Hunzelmann, N., Hafner, M., Anders, S., Krieg, T. y Nischt, R. (1998). *BM-40 (Osteonectin, SPARC) is expressed both in the epidermal and in the dermal compartment of adult human skin.* J. Invest. Dermatol. **110**, 1 22-126, 1998.

-Hynes, R.O. (1992). *Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell **69**, 11-25.

-Iruela-Arispe ML, Hasselar P. y Sage H. (1991). *Differential expression of extracellular protein is correlated with angiogenesis in vitro.* Lab Invest **64**,174-186.

-Iruela-Arispe, ML., Vernon, RB., Wu, H., Jaenisch, R. y Sage, EH. *Type I collagen-deficient mov 13 mice do not retain SPARC in the extracelullar matrix implications for fibroblast function.* Dev.Dyn **207**, 171-183 (1996)

-Janken, S., Leach, K., y Klauck, T. (1989) *Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts.* J.Cell Biol 109, 697-704.

-Kairiyama,C., Slavutsky, I., Larripa, I., Morvillo, V., Bravo, AI., Bover, L., Podhajcer OL. y Mordoh J. (1995). *Biologic, immunocytochemicall and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines.* Pigment Cell. Res. **8**, 121-131.

-Kamihagi K, Katayama M, Ouchi R. y Kato I. (1994). *Osteonectin/SPARC regulates extracellular secretion rates of fibronectin and laminin extracellular matrix proteins.* Biochem Biophys Res Commun **200**, 423-428.

-Karecla, P.I., Bowden, S.J., Gree, S.J. y Kilshaw, P.J. (1995). *Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin* $\alpha_{M290}\beta_7$. Eur. J. Immunol. **25**, 852-856.

-Kato y col. (1998). Comunicación Personal.

-Kelm RJ. y Mann KG. (1991). *The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation.* J Biol Chem **226**:9632-0639.

-Kelm, RJJ., Hair, GA., Mann, KG. Y Grant, BW. (1992) *Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC).* Blood **80**, 3112-3119.

-Kelm RJ, Sword NA, Orfeo T. y Mann KG. (1994). *Osteonectin in matrix remodeling. A plasminogen-osteonectin-collagen complex.* J Biol Chem **269**, 30147-30153.

-Kochevar, G.J., Stanek, J.A. y Rucker, E.B. (1992). *Truncated fibronectin. An autologous growth-promoting substance secreted by renal carcinoma cells.* Cancer **69**, 2311-2315.

-Krane, S.M. (1994). *Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors.* Annals of the New York Academy of Sciences **732**, 1-10.

-Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R. y Schachner, M. (1985). *The J1 glicoprotein. A novel nervous system cell adhesion molecule of the head of bacteriofage T4.* Nature (Lond) **227**, 680-685.

-Kupprion, Ch., Motamed, K y Sage H. (1998). *SPARC (BM-40, Osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells.* The Journal of Biological Chemistry **273**, 29635-29640.

-Laird, A.D., Brown, P.I., y Fausto, N. (1994). Inhibition of tumor growth in liver epithelial cells transfected with a transforming growth factor ? antisense gene. *Cancer Res.* **54**, 4224-4232.

-Lambert Vidmar, S., Lottspeich, F., Emod, Y., Planchenault, T. y Kleil-Dlouha, V. (1991) *Latent fibronectin-degrading serine proteinase activity in N-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin.* Eur. J Biochem. **201**, 71-77.

-Lane TF. y Sage EH. (1990). *Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct sites modulate cell adhesion.* J Cell Biol **111**, 3065-3076.

-Lane TF, Iruela-Arispe ML. y Sage EH. (1992) *Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro: changes in fibronectin, thrombospondin-1 and plasminogen activator inhibitor-1.* J Biol Chem **267**:16736-16745.

-Lane TF, Iruela-Arispe, ML, Johnson RS. y Sage EH. (1994a) *SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis.* J Cell Biol **125**, 929-943.

-Lane TF. y Sage EH. (1994b). *The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions.* FASEB J **8**,163-173.

-Languino, L.R., Plescia, J., Duperray, A., Brian, A.A., Plow, E., Geltosky, J.E. y Altieri, D.C. (1993). *Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway.* Cell **73**, 1-20.

-Lankat-Buttgereit B, Kulozik M, Hunzelmann N. y Krieg T (1991). *Cytokines alter ARNm steady state levels for basement membrane proteins in human skin fibroblasts.* J Dermatol Sci **2**, 300-307.

-Lasky, L. (1992).*Selectins : interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.* Science **258**, 964-969

-Lawler, J., Weistein,R.y Hynes, R.O. *Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium and integrin receptors.* J. Cell Biol. **107**: 2351-2361.

-Lelievre, S., Weaver, VM. y Bissell, MJ. (1996) *Extracellular matrix signaling from the cellular membrane skeleton to the nuclear skeleton : a model of gene regulation.* Recent. Prog. Horm. Res. **51**, 417-432

-Levy, A., Cioce, V. y Sobel ME et al (1991). *Increased expression of the 72 kDa type IV collagenase in human colonic carcinoma.* Cancer Res. **51**, 439-444.

-Lightner, VA. y Erickson, HP. (1990a). *Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion.* J. Cell. Sci. **95**, 263-277.

-Lightner, VA, Slemp, CA. y Erickson, HP. (1990b). *Localization and quantitation of hexabrachion (tenascin) in skin, embyonic brain, tumors and plasma.*

-Liotta LA., Lee, CW. y Morakis, DJ. (1980a) *New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies.* Cancer Lett **11**, 141-152.

-Liotta LA., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, CM. y Shafie, S. (1980b). *Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.* Nature **284**, 67-68.

-Luna LG (1960). *Routine staining procedures; melanin pigments. In Luna LG (ed). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* The Blakiston Division, Mc Graw-Hill Book Company, p. 42

-Lund, H.Z. y Sobbe, G.D. (1949). *The natural history of pigmented nevus. Factors of age and anatomic location.* Am. J. Pathol. **6**, 1117-1147.

-Mackie, EJ., Halfter W.y Liverani, D. (1988a). *Induction of tenascin in healing wounds.* J. Cell. Biol. **107**, 2757-67.

-Mackie, EJ., Tuker RP., Halfter, W., Chiquet-Erismann R. y Epperlein, H.H. (1988b) *The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration.* Development **102**, 237-250.

-Mansfield, PJ., Boxer, LA y Suchard, SJ (1990) *Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils.* J.Cell. Biol. **111**, 3077-3086

-Martin, DC., Ruther, U., Sanchez-Sweatman, OH., Orr, FW. Y Khokha, r. (1997) Oncogene **13**, 569-576.

-Maurer P, Mayer U, Bruch M, Jeno P, Mann K, Landwehr R, Engel J. y Timpl R (1992) *High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 30-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin).* Eur J Biochem **205**, 233-240.

-Maurer, P., Hohenadl, Ch., Hohenester, E., Gohring, W., Timpl, R. y Engel J. (1995). J. Mol. Biol. **253**, 347-357.

-Mayer, U., Aumailley, M., Mann, K., Timpl, R. y Engel, J. (1991). *Calcium-dependent binding of basement membrane collagen type IV.* Eur.J. Biochem. **198**, 141-150

-Mendis DB. y Brown, IR.(1994) *Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain.* Brain. Res. Mol. Brain Res. **24**, 9-11

-Mendis, D.B., Malaval, L. y Brown, I.R. (1995). *SPARC, an extracellular matrix glicoprotein containing the follistatin module is expressed by astrocites in synaptic enriched regions of the adult brain.* Brain Research **676**, 69-79.

-Mercola, D., y Cohen, J.S.(1995). *Antisense approaches to cancer gene therapy.* Cancer Gene Ther. **2**, 47-59 .

-Mok, S.C., Chan, W.Y., Wong, K.K., Muto, M.G. y Berkowitz, R.S.(1996). *SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells.* Oncogene **12**, 1895-1901 .

-Monteagudo, C., Merino, M., San Juan, J., Liotta L. y Stetler-Stevenson W. (1990). *Immunohistologic distribution of type IV collagenase in normal, beningn and malignant breast tissue.* Am.J. Pathol. **136**, 585-592.

-Motamed, K. y Sage, EH (1998) *SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway.* J. Cell Biochem. **70**, 543-552.

-Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T., y Zabel, B. (1992). *Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development.* J. Histochem. Cytochem. **40**, 283-291.

-Murphy-Ullrich, JE y Hook,M (1989) *Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells.* J.Cell.Biol. **109**, 1309-1319.

-Murphy-Ullrich, JE., Schultz-Cherry, S. y Hook, M. (1990) J.Cell Biol. **111**, 148.

-Murphy-Ullrich, JE., Lightner, VA., Aukhil, I., Yan, YZ., Erickson, HP. Y Hook, M. (1991) *Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin.* J. Cell. Biol. **115**, 1127-1136

-Murphy-Ullrich, J.E., Laue T.F., Pallero M.A. y Sage, E.H. (1995). *SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca^{2+} binding EF-hand.* J.Cell Biochem. **57**, 341-350.

-Murray, JC., Liotta, L., Rennard, SI.y Martin, GR. (1980). *Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells in vitro.* Cancer Res. **40**, 347-351.

-Nagata, T., Goldberg, HA., Zhang, Q., Domenicucci, C., y Sodek, J. (1991). *Biosynthesis of bone proteins by fetal porcine clavariae in vitro. Rapid association of sulfated sialoproteins (secreted*

phosphoprotein 1 and bone sialoprotein) and chondroitin sulfate proteogycan (CS-PGIII) with bone mineral. Matrix **11**, 86-100.

-Nakajima, M., Welch, D.R., Belloni, P.N. y Nicolson G.L. (1987). *Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials.* Cancer Res. **47**, 4869-4870.

-Natali, P.G., Nicotra, M.R., Botti, C., Mottolese, M., Bigotti, A. y Segatto, O. (1992). *Changes in expression of alpha6/beta 4 integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer.* Br.J. Cancer **66**, 318-322.

-Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, DJ., Cheresh, DA., Brodt, P.(1992*) Human melanoma cells derived fromllumphatic metastasess use integrin αvβ3 to adhere to lymph node vitronectin.* J. Clin. Invest. **90**, 1406-1413.

-Nomura S., Wills, AJ., Edwards, DR., Heath, JK. y Hogan, BLM. (1988). *Developmental expression of osteopontin and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization.* J.Cell. Biol. **106**, 441-450.

-Nordlung, J.J. (1986). *The lives of pigment cells.* Dermatol. Clin. **4**, 407-418.

-Norgauer J., Metzner, B. y Schraufstatter (1996). *Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor β in human melanoma cells.* The Journal of Immunology **156**, 1132-1137.

-O'Shea, K.S. y Dixit, V.M. (1988). *Unique distribution of the extracellular matrix component thrombospondin in the developing mouse embryo.* J.Cell Biol.**107**, 2737-2748.

-Oshima, O., Leboy, PS., McDonald, SA., Tuan, RS., y Shapiro, IM. (1989) *Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by in situ hybridization.* Calcif. Tissue Int. **45**, 182-192.

-Ossowski, L., Biegel, D. y Reich, E. (1979) *Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue.* Cell **16**, 929-940.

-Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N. y Matsushima, K.(1991). *Properties of the novel proinflammatory supergen "intercrine" cytokine family.* Annu. Rev. Immunol. **9**, 617-648.

-O'Reilly, MS, Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, RA., Moses M., Lane. WS, Cao,Y, Sage EH. y Folkman J.(1994). *Angiostatin : A novel Angiogenesis Inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma.* Cell **79**, 315-328.

-O'Reilly, MS., Bocm, T., Shing, Y, Fukai, N., Lane, WS, Flynn, E., Birkhead, JR., Olsen, BR. y Folkman J. (1997) *Endostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.* Cell **88**, 277-285.

-Otsuka, K., Yao, KL., Wasi, S., Tung, PS., Aubin, JE., Sodek, J. y Termine, JD (1984) *Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro.* J. Biol. Chem. **259**, 9805-9812

-Pasquale, E.B., Maher, P.A. y Singer, S.J. (1986). *Talin is phosphorylated on tyrosine in chiken embryo fibroblast transformed by Rous sarcoma virus.* Proc. Natl. Acad. Sci.USA **83**, 5507-5511.

-Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, VL.Jr. y Ruoslshti, E. (1996) *A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types.* Nat.Med. **2**, 1197-1203.

-Patel, VP., y Lodish, HF. (1987) J. Cell. Biol. **105**, 3105-3118

-Pawelek J. (1979). *Melanoma cells.* Meth. Enzym. **LVII**, 564-570.

-Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D. e Imhof, B.A. (1995). *CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium.* J. Cell Biol.**130**, 451-460.

-Podhajcer OL, Bover L, Bravo AI, Ledda MF, Kairiyama C, Calb I, Guerra L, Capony F. y Mordoh J. (1995) *Expression of cathepsin D in primary and metastatic human melanoma and dysplastic nevos.* J Invest Dermatol **104,** 340-144.

-Podhajcer, O.L., Wolf, C., Lefebvre, O., Segain, J.P.,Rouyer, N., Stoll I, Rio M.C., Chambon, P. y Basset P. (1996). *Comparative expression of the SPARC and stromelysin-3 genes in mammary tumors.* The Breast **5**, 13-20

-Podleski, TR., Greenberg, I., Schlessinger, J. y Yamada, KM. (1979). *Fibronectin delays the fusion of L6 myoblasts.* Exp. Cell. Res. **122**, 317-326.

-Porte H (1995). *Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin- and BM-40/SPARC genes.* Int. J. Cancer **64**, 70-75.

-Porte H (1998). *Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma : implications for prognosis.* Clin. Cancer Res. **4**, 11375-1382.

-Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SH. y Gown AM. (1995). *Distribution of SPARC in normal and neoplastic tissue.* J Histochem Cytochem. **43**, 791-800.

-Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Mann K, Timpl R, Krieg T. y Engel J. (1994). *Changes in calcium and collagen II binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin).* J Mol Biol **238**, 563-574.

-Poste, G. y Fidler, IJ. (1980) *The pathogenesis of cancer metastasis.* Nature **283**, 139-146.

-Poste, G., Doll, J., Hart, IR. y Fidler, IJ (1980). *In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties.* Cancer Res. **40**, 1636-1644.

-Pozzatti, R., Muschel, R., Williams, J., Padmanabhan, R., Howard, B., Liotta, L. y Khorry, G. (1986). *Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials.* Science **232**, 223-227.

-Pukel, CS., Lloyd, KO., Travassos, LR., Dippold, WG., Oettgen, HF., Old, LJ. (1982) *GD3-A prominent ganglioside of human melanoma : Detectionand characterization by mouse monoclonal antibody.* J. Exp. Med **155**, 1133-1147.

-Purcell, L., Gruia-Gray, J., Scanga, S. y Ringuette, M. (1993) *Development of anomalies of Xenopus embryos following microinjection of SPARC antibodies.* J. Exp. Zool. **265**, 153-164.

-Pyke, C., Ralfkiaer, E., Tryggvason, K. y Dano, K. (1993). *Messenger RNA for two type IV collagenase is located in stromal cells in human colon cancer.* Am. J. Path. **142,** 359-365

-Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R. y Sage EH (1992) *The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptor.* Proc Natl Acad Sci USA **89**,1281-1285.

-Rawles, M. (1947). *Origin of pigment cell from the neural crest in the mouse embryo.* Physil. Zool. **20**, 248-266.

-Raz, A., Zoller, M. y Ben-Zeév, A. (1986). *Cell configuration and adhesive properties of metatasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells.* Exp.Cell.Res. **162**, 127-141.

-Reed MJ, Poulakkainen PA, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P. y Sage EH. (1993) *Expression of SPARC and thrombospondin-1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization.* J Histochem Cytochem **41**,1467-1477.

-Reed MJ, Vernon RB, Abrass JB. y Sage EH. (1994) *TGFβ1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors.* J Cell Physiol **158**,169-179.

-Rempel, SA., Golembieski, WA., Ge, S., Lemke, N., Elisevich, K., Mikkelsen, T. y Gutierrez, JA. (1998) *SPARC : a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas.* J.Neuropathol. Exp. Neurol. **57**, 1112-21

-Rempel, SA., Shugang G., y Gutiérrez, JA.(1999) *SPARC : A potential diagnostic marker of invasive meningiomas.* Clinical Cancer Research **5**, 237-241.

-Rhodes, A.R., Harrest, T.J., Day, C.L., Mihm, M.C.Jr., Fitz-patrick, T.B. y Sober A.J. (1983) *Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas.* J.Am.Acad.Dermatol. **9**, 563

-Rigel DS (1992a) *The dilemma of the dysplastic nevus.* Ann.Plast Surg **28**, 9-10.

-Rigel, DS. (1992b) Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma Ann. Plast. Surg. **28**, 7-8.

-Riser, B.L., Varani, J., O'Rourke, K. y Dixit, V.M. (1988). *Thrombospondin binding by human squamous carcinoma and melanoma cell: relationship to biological activity.* Exp. Cell Res. **174**, 319-3290.

-Roberts,DD. Sherwood, JA. y Ginsburg, V. (1987) *Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells.* J. Cell Biol. **104**, 131-139.

-Rosenblatt, S., Bassuk,JA., Alpers, Ch.E., Sage EH., Timpl R.y Preissner KT. (1997) *Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins : characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC).* Biochem. J. **324**, 311-319.

-Roskelley, CD. y Bisell, MJ.(1995). *Dynamic reciprocity revisited : a continous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function.* Biochem, Cell.**73**,391-397.

-Ruegg, C., Postigo, A.A., Sikorski, E.E., Butchen, E.C., Pytela, R. y Erle, D.J. (1992). *Role of integrin $\alpha_4\beta_7$/ $\alpha_4\beta_p$ in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering.* J. Cell Biol. **117**, 179-189.

-Ruiz, P., Dunon, D., Sonnenberg, A.e Imhof, B.A. (1993). *Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins.* Cell Ahes. Commun. **1**, 67-81.

-Sage, EH., Johnson, C., y Bornstein, P. (1984) *Characterization of novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture.* J. Biol. Chem. **259**, 3993-4007.

-Sage EH. y Bornstein P. (1991) *Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions.* J Biol Chem **266**,14831-14834.

-Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everit EA. y Angello J (1989) *SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits CA^{2+} dependent binding to the extracellular matrix.* J Cell Biol **109**, 341-356.

-Sage, EH., (1992) Modulation of endothelial cell shape by SPARC does not involve chelation of extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+}. Biochem. Cell Biol. **70**, 1368-1379.

-Sage EH. (1997) *Pieces of eight : bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis.* Trends in cell Biology 7,182-186.

-Sato , H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E.y Seiki, M. (1994). *A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells.* Nature **370**, 61-65

-Schadendorf,D., Moller, A., Algermissen, B., Woem, M., Sticherling, M. y Czarnetzki, BM (1993) *IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor.* J.Immunol **151**, 2667-2675.

-Scheibenbogen, C., Mohler, T., Haefele,J., Hunstein, W., y Keilholz U (1995). *Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumor load. Melanoma res. 5, 179-181.*

-Schmidhauser, C., Casperson, G.F., Myers, C.A., Sanzo,K.T., Bolten, S. y Bissel, M.J. (1992). *A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin-and extracellular matrix-dependent regulation of beta-casein gene expression.* Mol.Biol. Cell **3,** 699-709

-Schwarzbauer, J.y Spencer, CS. (1993) *The Caenorhabditis elegans homolog og the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility.* Mol. Bio. Cell. **4,** 941-952.

-Sefton, B.M., Hunter, T., Ball, E.H. y Singer, S.J. (1981). *Vinculin : a cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus.* Cell **24,** 165-174.

-Seino, K., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., Miyata, R., Nagaoka, I., Matsuzawa, A., Fukao, K., Yagita, H. y Okumura K.(1998). *Cutting Edge : Chemotactic activity of soluble Fas ligand agains phagocytes.* The Journal of Immunology **161,** 4484-4488.

-Seftor, R.E.B., y col (1992). *Role of the αvβ3 integrin in human melanoma cell invasion.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **89,** 1557-1561.

-Seftor, R.E.B., Seftor, E., Stetler-Stevenson, W.G. y Hendrix, M.J.C. (1993). *The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of αvβ3 and α5β1 integrins during human melanoma invasion.* Cancer Res. **53,** 3411-3415.

-Shankavaram, UT., DeWitt, DL., Funk, SE. y Sage EH. (1997) *Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC.* J. Cell. Physiol. **173,** 327-334.

-Shattuck, RL., Wood, LD., Jaffe, GJ. y Richmond, A (1994). *MGSA/GRO transcription is differentially regulated in normal retinal pigment epithelial and melanoma cells.* Mol. Cell. Biol. **14,** 791-802.

-Shaw, RJ., Doherty, DE., Ritter, AG.,Benedict, SH y Clark, RAF (1990) J. Cell Biol **111,** 2139-2148.

-Singh, RK., Gutman, M., Radinsky, R., Bucana, CD y Fidler, IJ. (1994) *Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice.* Cancer Res **54,** 3243-3247.

-Springer, T.A. (1994). *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm.* Cell **76,** 301-314.

-Springer, T.A.(1990). *Adhesion receptors of the immune system.* Nature **346,** 425-434

-Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S., & Liotta L.A.(1993). *Tumor cell interactions -with the extracellular matrix during invasion and metastasis.* Annu. Rev. Cell Biol. **9,** 541-573 .

-Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., y Kleiner, D.E. (1993). *Extracellular matrix 6: rol of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.* ***FASEB J.*** **7,** 1434-1441.

-Stetler-Stevenson, WG., Krutzsch HC. y Liotta, LA. (1989). *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) : A new member of the metalloproteinase inhibitor family.* J.Biol. Chem. **264**, 17374-17378

-Stetler-Stevenson, W.G. (1990). *Type IV collagenase in tumor invasion and metastasis.* Cancer Metastasis Rev. **9**, 289-303.

-Streuli, CH., Bailey, N. y Bisell, MJ. (1991) *Control of mammary epithelial differentiation : basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absense of cell-cell interaction and morphological polarity.* J. Cell Biol.**115**, 1385-1395.

-Sympson, CJ., Talhouk, RS., Alexander, CM., Chin, Sk., Clift, SM., Bisell, ML., Werb, Z.(1994) *Targeted expression of stromelysin-I in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression.* J. Cell. Biol. **125**, 681-693.

-Talhouk R., Bissell, MJ., Werb, Z. (1992) Coordinated expression of extracellular matrix degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. J. Cell. Biol. **118**, 1271-1282.

-Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, LA.y Giavazzi, R. (1990) *Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth : a potential angiogenesis regulatory factor.* J.Cell.Biol. **111**, 765-772.

-Termine, JD., Kleinman, HK., Whitson, SW., Conn, KM., McGarvey, ML.,y Martin, GR. (1981) *Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen.* Cell **26**, 99-105.

-Terranova, V.P., Williams, J.E., Liotta, L.E., y Martin, G.R. (1984). *Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin.* Science **226**, 982-985.

-Tracy, RP., Shull, S., Riggs, BL.,y Mann, KG. (1988) *The osteonectin family of proteins.* Int. J. Bochem. **20**, 653-660.

-Tremble PM, Lane TF, Sage EH. y Werb Z. (1993). *SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodelling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway.* J Cell Biol **121**:1433-1444.

-Trojan, J., y col.(1993). *Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA.* Science **259**, 94-97

-Tsushima, H., Ueki, A., Matsuoka, Y., Mihara, H. y Hopsu-Havu, V.K. (1991). *Characterization of a cathepsin-like enzyme from a human melanoma cell line.* Int. J. Cancer **48**, 726-732

-Tyree, B., (1989). *The partial degradation of osteonectin by a bone derived metalloprotease enhances binding to type I collagen.* J.Bone Miner. Res. **4**, 877-883.

-Uria, J.A., ferrando, A.A., Velasco, G., freije J.M.P.y López-Otinc (1994). *Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family.* Cancer Res. **54**, 2091-2094.

-Varani, J., Dixit, V.M., Fligiel, S.E.G., Mc Keever, P.E. y Carey T.E. (1986) *Thrombospondin-induced attachment and spreading of squamous carcinoma cells.* Exp. Cell Res. **167**, 376-390

-Varani, J., Nickoloff, BJ., Riser, BL., Mitra, RS., O'Rouorke, K. y Dixit, VM. (1988). *Thrombospondin-induced adhesion of human keratinocytes.* J. Clin. Invest. **81**, 1537-1544.

-Van Roy, F. y Mareel, M. (1992) *Tumor invasion : effects of cell adhesion and motility.* TIBS **2**, 163-167

-Varner, JA. y Cheresh, DA. (1996). Curr. Opin. Cell Biol. **8**, 724-730.

-Vassalli, JD. y Pepper (1994) *Tumor biology. Membrane proteases in focus.* Nature **370**, 14-5

-Von der Mark, K. y Ocalan, M. (1989) Differentiation 40, 150-157.

-Watt, FM., Kubler, MD., Hotchin, NA., Nicholson, LJ. y Adams JC (1993). *Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions.* J.Cell. Sci. **106**, 175-182.

-Wayte, D.M. y Helwing, E.B. (1968). *Halo nevi.* Cancer **22**, 69-89.

-Weiss, SW., Langloss, JM., Enzinger, FM. (1983). *Value of S-100 protein of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors.* Lab. Invest. **49**, 299-308.

-Werb, Z., Tremble, PM., Behrendsten, O., Crowley, E., and Damsky, CH. (1989). J.Cell Biol. **111**, 1265-1273

-Werb, Z. (1997). *ECM and cell surface proteolysis : regulating celullar ecology.* Cell **91,** 439-442.

-West, CM., Lanza, R., Rosenbloom, J., Lowe, M., Holtzer, H. y Avdalovic, N. (1979) *Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts.* Cell **17**, 491-501.

-Weston, J.A. (1970). *The migration and differentiation of neural crest cells.* Adv. Morphol. **8**, 41-114.

-Wewer, U.M., Taraboletti, G., Sobel, M.E., Albrechtsen, R., y Liotta, L.A.(1987) *Role of laminin receptors in tumor cell migration.* Cancer Res. **47**, 5691-98.

-Wight, T.N., Rangi, G.J., Mumby, S.M. y Bornstein P.(1985). *Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissue.* J. Histochem. Cytochem. **33**, 295-302.

-Wilson, CL., Heppner, KJ., Labosky, PA., Hogan, BL., y Matrisian, LM. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1402-1407.

-Woessner, J.F. Jr. (1991). *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling.* FASEB J. **5**, 2145-2154.

-Wrana JL, Overall CM. y Sode K (1991) *Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor.* Eur J Biochem **197**:519-528.

-Yacowitz, R., Mansfield, P.J., Dixit, V.M. y Suchard, S.J. (1993). *Motility of human carcinoma cells in response to thrombospondin: relationship to metastatic potential and thrombospondin structural domains.* Cancer Research **53**, 378-387.

-Yost JC, Bell A, Seale R y Sage EH (1994) Purification of biologically active SPARC expressed in *Saccharomyces cerevisiae.* Arch Biochem Biophys. **314**, 50-63

-Young, BA., Wang, P.y Goldblum, SE (1998) *The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **251**, 320-327

-Zutter, M.M., Mazoujian, G. y Santoro, S.A. (1990). *Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast.* Am. J. Pathol. **137**, 863-870.

-Zutter, M.M., Krigman, H.R. y Santoro, S.A. (1993). *Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast . Analysis by in situ hybridization.* Am. J. pathol. **142**, 1439-1448.

Anexo 1

Abreviaturas

ALM: Melanoma lentiginoso acral.

ANOVA: Análisis de varianza

ATCC: American Type Culture Collection

BSA: Albúmina Sérica Bovina

COL: Colágeno

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

EDTA: Etilendiaminotetracetato disódico

EL: Elastina

ELISA: Enzyme-Linked-Immunosobent Assay

F-12: Mezcla de nutrientes de Hank

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FMLP: N-formil-Met-Leu-Phe.

FN: Fibronectina

FNR: Receptor de fibronectina

GL: Gelatina

HAS: Albúmina Sérica Humana

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Igs: Inmunoglobulinas

IL-8: Interleuquina 8

LMM: Melanoma lentigo maligno

LN: Laminina

MBP: Proteína básica de mielina

MC: Medio condicionado

MEC: Matriz extracelular

MGSA: Melanoma Growth Stimulatory Activity (Actividad estimuladora del crecimiento de melanoma)

MMP: Metaloproteasa de Matriz

MNLS: Leucocitos mononucleares

NM: Melanoma nodular

PBS: Buffer fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PG: Proteoglicanos

PMNLS: Leucocitos polimorfonucleares

PPP: Plasma Pobre en Plaquetas

PVP: Polivinilpirrolidona

RPG: Fase de crecimiento radial.

SD: Desvío estándar

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SF: Solución isotónica de NaCl (0,9%)

SFB: Suero fetal Bovino

SPARC: Secreted Proteín Acidic and Rich in Cysteine (Proteína de secreción, ácida y rica en cisteínas)

SSC: Buffer de cloruro y citrato de sodio

SSM: Melanoma extensivo superficial

VEGF: Factor de crecimiento vascular

VN: Vitronectina

VPG: Fase de crecimiento vertical

TGF-β: Factor de Crecimiento Tumoral-β

TN: Tenascina

TPA: 4β-phorbol 12-myristate-13-acetate

WS on HLDA : Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens

Anexo 2

Integrinas y sus ligandos

(FVW : Factor de von Willebrand)

(Hynes RO, 1992)

Integrina		Otros nombres	Ligando
β_1	α_1	VLA-1	Colágeno, Laminina
	α_2	VLA-2	Colágeno, Laminina
	α_3	VLA-3	Colágeno, Laminina, Fibronectina, Tenascina
	α_4	VLA-4	Fibronectina, VAM-1
	α_5	VLA-5	Fibronectina
	α_6	VLA-6	Laminina
	α_7		Laminina
β_2	α_L	LFA-1	ICAM-I, ICAM-2, ICAM-3
	α_M	MAC-1	iC3b, Fibrinógeno, Factor X, ICAM-1
	α_X	p150,95; CR4	iC3b, Fibrinógeno
β_3	α_V	CD51, CD61	Vitronectina, Fibrinógeno, FVW, Trombospondina, Fibronectina, Osteopontina, Colágeno, PECAM-1
	α_{IIb}		Fibronectina, Fibrinógeno, FVW, Vitronectina, Trombospondina
β_4	α_V		Laminina
β_5	α_V		Vitronectina
β_6	α_V		Fibronectina
β_7	α_4		Fibronectina, VCAM-1, MAdCAM
	α_V		Fibronectina
	α_E		E-cadherina

Anexo 3

Expresión de integrinas en tumores humanos

Modificado de Giancotti, FG y Mainiero F, 1994

	β_1						$\alpha_6\beta_4$	β_3
	α_1	α_2	α_3	α_5	α_6	α_7		α_v
Tumores de Sistema Nervioso								
Astrocitoma			↑					
Glioblastoma			↑					↑
Cáncer de mama		↓		↓			↓	
Cáncer de colon		↓						
Cáncer de pulmón								
Linfoma (Burkitt)								
Melanoma			↑			↑		↑
Cáncer de Páncreas			↓	↓				

Anexo 4

Clasificación de melanomas

Los melanomas invasivos pueden dividirse en 4 subtipos de acuerdo a su patrón de crecimiento (Barnhill RL y Mihm MC Jr.). Cada uno de estos subtipos presentan características clínicas únicas con diferente pronóstico:

MELANOMA EXTENSIVO SUPERFICIAL- "Superficial Spreading melanoma" (SSM) Son los melanomas más comunes representan aproximadamente el 70% de los melanomas. Generalmente se desarrollan en nevus preexistentes y pueden llegar a ocurrir a cualquier edad después de la pubertad y pueden localizarse en cualquier sitio del cuerpo. Las características clínicas y patológicas de los melanomas extensivos superficiales han sido descriptos por Clark y colaboradores como melanomas con fase de crecimiento vertical (VGP), que, a diferencia de los melanomas RGP son capaces de metastatizar.

MELANOMA NODULAR-"Nodular Melanoma" (NM) El segundo tipo más frecuente de melanoma es el NM (15-30% de los pacientes). Son tumores más agresivos y generalmente se desarrollan con mayor rapidez que los SSM. Pueden darse a cualqueier edad y los sitios más comunes son el tronco, cabeza y cuello. Se presentan como lesiones elevadas o pólipos, tienen pigmentación uniforme y generalmente son más pigmentados que los SSM. Una característica típica es que carecen de fase de crecimiento radial u horizontal.

MELANOMA LENTIGO MALIGNO-"Lentigo Maligna Melanoma"(LMM). Los LMM tienen menor capacidad de metastatizar que los 2 tipos de melanomas mencionados previamente. Se da en un bajo procentaje, 4-10%, generalmente en el rostro de las mujeres de edad de piel blanca.

MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL-"Acral Lentiginous Melanoma"(ALM). Se presenta como una lesión muy pigmentada, chata o nodular en las palmas, planta o cerca del nacimiento de las uñas. EL ALM se da en muy baja proporción en pacientes blancos (2-8%) pero constituye el 35-60% de los casos de melanomas en pacientes de piel oscura, incluyendo asiáticos e hispánicos. La

irregularidad de la coloración es uno de los rasgos típicos del ALM. Son mucho más agresivos que los LMM y con mayor tendencia a metastatizar.

Sistema de estadificación del melanoma

En 1988 la AJCC (American Joint Committee on Cancer) junnto con la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) realizaron una propuesta unificadora para clasificar el melanoma cutáneo.

Estadío	Criterio
IA	Melanoma primario < 0.75 mm de profundidad y/o nivel de Clark II (pT1); sin metástasis ganglionares o sistémicas (N0, M0)
IB	Melanoma primario 0.76-1.5 mmde profundidad y/o nivel de Clark III (pT2); N0M0
IIA	Melanoma primario 1.51-4.00 mm de profundidad y/o nivel de Clark IV (pT3); N0, M0.
IIB	Melanoma primario > 4.00 mm de profundidad y/o nivel de Clark V (pT4); N0M0.
III	Metástasis en ganglios. (Cualquier pT, N1 o N2, M0)
IV	Metástasis sistémicas (Cualquier pT, cualquier N).

Sistema de estadificación para el melanoma de la AJCC/UICC, 1988

***pT**: Tumor primario (primary Tumor), **N0** : ausencia de metástasis en ganglios,*

***NX** : Número de ganglios comprometido s. **M0**: ausencia de metástasis sistémicas.*

Agradecimientos

- Al Dr. Osvaldo Podhajcer, por darme la posibilidad de integrar su grupo de trabajo, por la dirección y supervisión de esta tesis, por sus valiosos consejos y acertadas opiniones.

- Al Dr. Yuti Chernajovsky, por haberme permitido colaborar con su grupo de investigación, porque aprendí mucho de él, por su confianza, por sus consejos y por su gran calidez.

- A la Dra. Estela Medrano, por haberme recibido en su laboratorio y en su casa, por sus enseñanzas y por los buenos momentos compartidos.

- A las autoridades del Insituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar", por haberme permitido desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

- Al CONICET, por haberme otorgado las becas que me permitieron desarrollar el presente trabajo de tesis.

- A la Dra. Inés Bravo y a la Dra. Irene Sorín, por haber colaborado en muchos experimentos reportados en este trabajo y por sus enseñanzas de patología.

- Al Dr. Mordoh por haberme recibido en su laboratorio.

- A mis compañeras del laboratorio 101, Mariana Capurro, Paula Portela,Marcela Barrios, Verónica Morvillo, Claudia Kairiyama y Laura Bover, por la paciencia que me tuvieron, por la ayuda que me brindaron en todo momento y por el los buenos ratos compartidos.

- A mis compañeros del laboratorio 103 Viky Guagliardo, Mariano Alvarez, Fernando Pitossi, Soraya Adris, Nelson Di Paolo, Lucía Chémez. Especialmente a Amaicha De Pino, Nara Muraro y Federico Prada su apoyo constante, por su cariño y su entusiasmo.

- A Cecilia Ballaré, Fabiola Parussini, Santiago Werbajh, Totó Rodríguez Suarez y Santiago Mora García, por compartir mis triunfos y fracasos. Por estar siempre cerca, aún a la distancia...

-A Andrea, Cecilia y Bety, por una amistad que empezó en los primeros años de escuela.

- A Verónica, Paula, Cata, Eyeleen, Fabiana, Cecilia y Federico, por los inolvidables momentos compartidos dentro y fuera del instituto.

- A Hilda y Rita, a Georgina y Cristina, a Francisco y Hugo, a Silvia y Liliana, a la gente de administración y a la gente de mantenimiento. Por su contribución en las tareas cotidianas.

- A mi mamá y a mi papá, por el ejemplo que me dieron, por la confianza que depositaron en mí, por facilitarme el camino, por el amor con el que me rodearon, por estar siempre a mi lado...

- A Gustavo, por disfrutar mis triunfos y ayudarme a levantar de las caídas, por contagiarme día a día tu alegría y entusiasmo, por tu gran amor...

REGISTRO DE FIRMAS

Lic. María Fernanda Ledda

Autora

Dr. Osvaldo Podhajcer

Director