

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol del gen SPARC en la  
progresión tumoral y su uso como  
blanco de terapia génica

Autor  
**Federico Prada**

Director  
**Oswaldo Podhajcer**

Tesis presentada para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas – Instituto Leloir.

**2007**

A mis más hermosos experimentitos de transferencia génica

**Joaqui, Agus y Xanti**

A mi coautora

**Ile**

**T**oda nuestra ciencia,  
comparada con la realidad  
es primitiva e infantil...  
Sin embargo, es lo máspreciado  
que tenemos

**Albert Einstein**  
(1879 – 1955)

<b>PRÓLOGO</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>5</b>
<b>El contacto como comunicación ancestral</b>	<b>5</b>
Darwin, Monod y Sagan	5
La matriz extracelular: éter primordial y necesario para el flujo íntimo de información	6
<b>El vecindario molecular de la célula</b>	<b>8</b>
Los componentes de la matriz extracelular	8
La lámina basal: una MEC muy particular	10
<b>Adhesión celular</b>	<b>12</b>
El proceso de adhesión y el destino celular	12
Integración de señales de la MEC: el papel de las integrinas	13
El contacto de adhesión focal	14
Arquitectura del citoesqueleto de actina durante la adhesión celular	15
<b>Las proteínas matricelulares y su biología</b>	<b>15</b>
Estado de adherencia celular: todo, nada y un poco	15
Las trombospondinas	17
Las tenascinas	19
<b>Secretada, acídica y rica en cisteínas</b>	<b>19</b>
Estructura y función de SPARC	19
Regulación de la expresión de SPARC	21
Ontogenia del gen SPARC	24
Estructura y propiedades bioquímicas de SPARC	25
Homólogos de SPARC	28
Las moléculas que interactúan con SPARC	29
SPARC y su relación con los factores de crecimiento	30
Interacción de SPARC con otros componentes de la MEC	32
<b>SPARC y cáncer</b>	<b>32</b>
Aspectos que vinculan la progresión tumoral con la MEC	32
<b>Potenciales mediadores del efecto de SPARC: El modelo de <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>35</b>
Evolución de la adhesión celular	36

Un nuevo modelo para el estudio de SPARC	37
SPARC en <i>Drosophila melanogaster</i>	38
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>Objetivo general de la tesis</b>	<b>41</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>41</b>
SPARC y estroma tumoral	41
Biología de SPARC en <i>Drosophila melanogaster</i>	42
<b>RESULTADOS (CAPÍTULO I)</b>	<b>43</b>
<b>Estudio bioquímico de SPARC nativa, purificada de melanoma humano, y sus formas recombinantes</b>	<b>43</b>
Purificación de SPARC nativa de melanoma humano	43
Identidad de la proteína nativa purificada	44
La estructura de SPARC nativa, estudiada mediante métodos biofísicos, es semejante a la de sus formas recombinantes	45
SPARC nativa y sus formas recombinantes poseen un efecto bifásico en la proliferación de fibroblastos, dependiendo de la concentración utilizada y el momento en el que se agrega la molécula	49
Las células tumorales no son afectadas por la actividad antiproliferativa de SPARC	52
<b>Efecto de la modulación endógena y exógena de SPARC sobre el crecimiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del melanoma humano</b>	<b>54</b>
La modulación de los niveles endógenos de SPARC no altera el crecimiento de las células de melanoma <i>in vitro</i>	54
El aumento y la disminución de los niveles de SPARC en melanoma inhiben o promueven, respectivamente, el crecimiento de esferoides	59
La hiperexpresión de SPARC, por parte de los fibroblastos circundantes al melanoma, no altera la tasa de crecimiento de los esferoides heterotípicos	62
La hiperexpresión de SPARC disminuye la migración de las células tumorales utilizando el modelo de esferoides	64
La capacidad formadora de clones en ausencia de anclaje es disminuída por la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma	66
Los PMN murinos son los responsables del rechazo de las células de melanoma humano que están expresando niveles reducidos de SPARC	67
La hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma promueve la reorganización del estroma sin afectar su crecimiento <i>in vivo</i>	70
La co-administración de fibroblastos hiperexpresando o no SPARC no afecta la progresión tumoral	74
<b>RESULTADOS (CAPÍTULO II)</b>	<b>76</b>
<b>Biología de SPARC en <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>76</b>
Búsqueda del receptor: Sistema de los dos híbridos en levadura e inmunoprecipitaciones magnéticas	76

SPARC en <i>Drosophila melanogaster</i>	78
Fenotipos en el desarrollo de <i>Drosophila</i> asociados a la pérdida de función de dSPARC	79
Ingenierización del individuo transgénico para estudios de ganancia de función de dSPARC	83
La hiperexpresión ubicua de dSPARC genera importantes defectos en el cierre dorsal y la retracción de la banda germinal	85
Hiperexpresión de dSPARC en los tejidos involucrados en el cierre dorsal del embrión de <i>Drosophila</i>	86
Hiperexpresión de dSPARC en hemocitos	88
La ganancia de función de dSPARC afecta el desarrollo del sistema traqueal	89
Experimentos de hiperexpresión de dSPARC en pupas y moscas adultas	90
<b>Genómica de la hiperexpresión de dSPARC en <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>92</b>
Diseño experimental para el estudio del transcriptoma	92
Genómica de la ganancia de función de dSPARC en <i>Drosophila</i>	96
Análisis de la intersección de las listas de genes diferencialmente expresados luego de la hiperexpresión de dSPARC	98
La generación del fenotipo de cierre dorsal por hiperexpresión de dSPARC sería independiente de la vía de señalización de JNK	101
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>103</b>
<b>SPARC y estroma tumoral</b>	<b>103</b>
Purificación de SPARC nativa de melanoma	103
Bioquímica de SPARC nativa y sus variantes recombinantes	104
Validación funcional de las proteínas purificadas	105
El efecto bifásico de SPARC en la proliferación de fibroblastos	107
Regulación de la proliferación: células normales vs tumorales	109
El papel del estroma en la proliferación de células tumorales <i>in vivo</i>	110
Efecto de los niveles de SPARC en el crecimiento independiente de anclaje	112
SPARC y angiogénesis	112
Los neutrófilos polimorfonucleares y su papel en el rechazo tumoral	113
<b>Discusión: SPARC en el modelo de <i>Drosophila</i></b>	<b>114</b>
Fenotipos de pérdida de función de dSPARC	115
Fenotipos de ganancia de función de SPARC	117
Efecto bifásico de dSPARC	119
Función de SPARC a nivel celular	119
SPARC y vías de señalización	123
Relación de SPARC e integrinas en <i>Drosophila</i>	123
SPARC en el proceso de segmentación	125
Cierre dorsal y cicatrización de heridas en <i>Drosophila</i>	125
Genómica de la ganancia de función de SPARC en <i>Drosophila</i>	127

El cáncer y las heridas que no curan: SPARC en el proceso de cicatrización	130
<b>Consideraciones generales de los logros obtenidos</b>	<b>134</b>
El camino recorrido con este trabajo de tesis	134
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b>	<b>136</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>137</b>
<b>Materiales y reactivos</b>	<b>137</b>
Descripción general de los materiales utilizados	137
<b>Técnicas de cultivo celular eucariota y ensayos funcionales</b>	<b>137</b>
Líneas celulares de mamífero y sus medios de cultivo	137
Medios condicionados	138
Ensayo de proliferación <i>in vitro</i>	138
Formación de esferoides en tres dimensiones	138
Ensayo de migración de esferoides	139
Ensayo clonogénico bajo agar	139
<b>Purificación de SPARC nativa de melanoma humano</b>	<b>140</b>
Condicionamiento de medio a gran escala y purificación de SPARC	140
Microsecuenciación del extremo N-terminal de la proteína nativa	141
Identificación de SPARC nativa por huella peptídica utilizando espectrometría de masa MALDI-TOF	141
<b>Técnicas de bioquímica y biología molecular</b>	<b>141</b>
Dicroísmo circular	141
Espectroscopia de fluorescencia	141
Cuantificación de proteínas totales en medios condicionados	142
Producción del anticuerpo monoclonal anti-SPARC	142
Geles de poliacrilamida y Western blotting	142
Northern Blot	143
Ensayo de protección de ARNasa (RPA)	144
<b>Ingeniería genética para la generación de vectores</b>	<b>144</b>
Desarrollo de adenovectores: Consideraciones generales	144
Subclonado de SPARC en su orientación sentido y antisentido	145
Purificación del brazo derecho del adenovector	146
Ensayo de co-transfección en HEK 293	147
Purificación de clones virales bajo agar	148
Obtención de ADN viral (HIRT)	149
Digestión del ADN viral	149
Southern Blot para el transgén	149
Presencia de la región E1 en el genoma viral	151

Ensayo de efecto citopático (ECP)	152
Preparación del stock adenoviral	152
Purificación del vector mediante gradientes de CICs	153
Titulación del stock	154
Análisis de endotoxina presente en el stock	155
Protocolo estandar de transducción	155
Eficiencia de transducción con el Ad-βgal	155
<b>Experimentos <i>in vivo</i>: xenotransplantes de células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes</b>	<b>156</b>
Cinética de crecimiento tumoral	156
Depleción de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en ratones atímicos	156
<b>Análisis histológico del tumor y su estroma</b>	<b>157</b>
Preparación de las muestras incluidas en parafina	157
Inmunohistoquímica de las secciones tumorales	157
Tinción Tricrómica de Masson, cuantificación de colágeno y recuento de fibroblastos	159
Inmunohistoquímica de las muestras incluidas en OCT	159
Cuantificación de microvasculatura en las secciones tumorales	160
Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral	160
Análisis de metástasis en ratones <i>nude</i>	160
Biodistribución de las células trasducidas en la masa tumoral	160
<b>Construcción de la quimera hSPARC-FcIgG</b>	<b>161</b>
Descripción general	161
<b>Sistema de los dos híbridos en levaduras</b>	<b>162</b>
Descripción general	162
<b>Métodos utilizados en el modelo biológico de <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>163</b>
Origen de las líneas de mosca utilizadas en el trabajo	163
Mantenimiento de los stocks	163
Clonado de SPARC de <i>Drosophila melanogaster</i>	164
Construcción del individuo transgénico	164
Mapeo de las líneas transgénicas	165
Generación de líneas transgénicas a partir de una preexistente	165
Recolección de embriones	166
Preparación de cutículas	166
Caracterización molecular de las deficiencias: PCR de embriones únicos	167
El sistema Gal4/UAS en <i>Drosophila melanogaster</i>	168
Ganancia de función de dSPARC en embriones y adultos	168
Hibridización <i>in situ</i>	169
Inmunohistoquímica del sistema traqueal	170

<b>Genómica de la ganancia de función de dSPARC en <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>171</b>
Preparación de RNA de embriones	171
Control de calidad del RNA: Northern Blot y Bioanalyzer	171
Tecnología Affymetrix: GeneChip® <i>Drosophila</i> 2	172
<b>Análisis estadístico</b>	<b>172</b>
Consideraciones generales	172
Control de calidad de los datos de genómica	173
Generación de las listas de genes diferenciales	173
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>175</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>192</b>
<b>Anexo 1: Abreviaturas utilizadas</b>	<b>192</b>
<b>Anexo 2: <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo</b>	<b>194</b>
Cien años <i>at the bench</i>	194
“No les vengo a vender, les vengo a regalar...”	194
Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	195
Embriogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i>	196
Generación del patrón epidérmico	197
<b>Anexo 3: Los movimientos morfogénicos</b>	<b>198</b>
Retracción de la banda germinal	198
El cierre dorsal del epitelio	199
Morfogénesis de las alas	200
<b>Anexo 4: Genómica de <i>Drosophila</i></b>	<b>201</b>
Tabla de genes diferencialmente expresados en el modelo de ganancia de función ubicua de dSPARC	201
Tabla de genes diferencialmente expresados en el modelo de ganancia de función de dSPARC en ectodermo	203
Tabla de genes regulados positivamente en el modelo de pérdida de función de hemipterus (Hep)	205
Tabla de genes regulados negativamente en el modelo de pérdida de función de hemipterus (Hep)	208
<b>DANDO LAS GRACIAS</b>	<b>211</b>

# Prólogo<sup>1</sup>

Aquellos investigadores que se acerquen a esta obra por necesidad (los jurados), compromiso afectivo (la familia y los amigos) o bien por un interés académico (compañeros, colegas y el director) seguramente se hagan la misma pregunta: ¿Por qué un prólogo en una tesis de doctorado?

Durante la escritura de este trabajo sentí la necesidad de acercarme a esos lectores putativos. Considero que, como mencionaré más adelante, el **contacto** es una de las primeras fuentes de **comunicación**. Y, para lograrlo, deseo crear con este prólogo un **entorno** favorable para la **interacción** con mis pares (algo así como un **estroma intelectual**, propicio para el intercambio de ideas académico-científicas).

Además, otro de los motivos que hacen a la existencia de esta sección es la necesidad de aclarar el por qué de las notas al pie de página y de las recurrentes negritas en el texto principal. Me gustaría resaltar que ninguno de estos recursos es producto del azar sino, más bien, un intento de **guiar al lector** por el camino deseado.

La palabra **forma** es un término que, como verán más adelante, ocupa un lugar importante en muchas páginas de esta tesis. Más aún, el formato de este escrito revela una parte de su pasado, una parte de su historia. Como seguramente diría uno de mis profesores de grado: “**esta tesis es más ancha que larga**”, lo cual no la convierte en única pero, sin duda, la incluye dentro de un grupo de trabajos que necesitan sustentarse en más de una estrategia experimental para sortear los avatares de lo empírico e intentar alcanzar los objetivos propuestos al principio del camino. En la primera página de una de sus últimas obras, “El mundo y sus demonios” (*The Demon-haunted World*), Carl Sagan incluyó un refrán o dicho popular que dice: “**es mejor encender una vela antes que maldecir la oscuridad**”. Carl Sagan hacía referencia a la ausencia de luz como sinónimo de ignorancia y utilizaba a la vela como símbolo del esfuerzo de la ciencia para erradicar los demonios de la oscuridad: lo que conocemos hoy en día como

<sup>1</sup> **Prólogo** (del griego *pro*: antes y *logos*: discurso) m. Escrito antepuesto al cuerpo de la obra de un libro de cualquier clase. 2. Discurso que en el teatro griego y latino solía preceder al poema dramático (Real Academia Española).

Es de suma importancia aclarar que no decidí poner la definición de la palabra prólogo por la referencia a “libro de cualquier clase”, que hace la primer acepción, sino más bien por la segunda, donde se menciona al discurso que precedía una obra en el teatro griego. Por lo tanto, mi idea con este prólogo es presentar de manera informal a ciertos “personajes” de esta “obra” llamada tesis.

pseudociencia. En el **contexto** de este trabajo de tesis, y haciendo alusión al mismo refrán, puedo decir que lejos han quedado ciertos sueños ambiciosos de obtener un tratamiento efectivo contra una enfermedad devastadora y silenciosa como es el melanoma. No obstante, también puedo decir orgulloso que la vela encendida con este proyecto no sólo es importante como aporte para la generación de nuevos conocimientos básicos y aplicados, sino también, por el sólo hecho de ser el fruto de un largo trabajo en el que participaron y colaboraron muchas personas, amigos y compañeros de esta familia: “nuestro labo”.

El trabajo de tesis que aquí se presenta, “**Rol del gen SPARC en la progresión tumoral y su uso como blanco de terapia génica**”, fue realizado en el Laboratorio de Terapia Molecular y Celular (ex Laboratorio de Terapia Génica) del Instituto Leloir de la Ciudad de Buenos Aires. Esta tesis fue concebida en sus orígenes dentro de un proyecto iniciado en nuestro laboratorio donde el objetivo principal radicaba en la búsqueda de una terapéutica molecular para el melanoma, sustentándose en los muy promisorios resultados publicados por Ledda *et al* en el año 1997. No obstante, como veremos más adelante, este proyecto fue replanteando, extendiendo sus metas al punto de contar hoy con dos capítulos claramente diferenciados tanto experimental como metodológicamente. El **Capítulo I** estudia y describe la regulación de SPARC como potencial estrategia terapéutica contra el melanoma humano. Así mismo, mediante la utilización de herramientas moleculares, hemos estudiado el efecto de SPARC sobre la reorganización del ambiente que rodea al tumor y su posible participación en procesos clave de la tumorigénesis, como la proliferación y la angiogénesis. El **Capítulo II**, por su parte, propone llevar adelante el estudio biológico de SPARC desde un ángulo completamente diferente. Paradójicamente, al unir uno de los **más viejos aliados** de la ciencia moderna, como es el caso de la mosca del vinagre, a la **disciplina científica más joven** y paradigmática, como considero es la genómica funcional, hemos podido obtener valiosos resultados relacionados con los objetivos propuestos. Haber descrito algunas de las funciones biológicas de SPARC en *Drosophila melanogaster*, sumado a la obtención de un listado de genes posiblemente involucrados en la vía de señalización de nuestra molécula dan un cierre que hasta hace un par de años resultaba inesperado para este trabajo de tesis.

Federico Prada

# Resumen

El crecimiento tumoral es el resultado de la interacción entre la célula neoplásica y su entorno. SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) es una proteína extracelular cuya expresión normal se asocia a tejidos en remodelación. En la mayoría de las neoplasias el aumento de la SPARC está relacionado con un mal pronóstico. Con el objetivo de esclarecer el rol de SPARC en el establecimiento y desarrollo del melanoma humano desarrollamos herramientas moleculares que nos permitieron demostrar que sólo los niveles endógenos de SPARC de dichas células, y no de las células estromales, afectan el crecimiento del tumor. Más aún, en experimentos *in vivo* demostramos que cambios en los niveles de SPARC en las células de melanoma generan *per se* importantes modificaciones en el vecindario tumoral. En efecto, el aumento de los niveles de SPARC en células de melanoma promovió el reclutamiento de fibroblastos, gatilló la neovascularización y lideró importantes cambios en la secreción de matriz extracelular; mientras que su disminución transiente indujo un infiltrado intratumoral de PMN suficiente para rechazar al tumor.

La participación de SPARC en la remodelación de tejidos también fue estudiada utilizando el modelo de *Drosophila*. Mediante la generación de individuos transgénicos con la posibilidad de dirigir la expresión de SPARC demostramos, en experimentos de ganancia de función, que dSPARC es partícipe de ciertos eventos del desarrollo del embrión de mosca que involucran migración, cambio de forma y adhesión celular. La transcriptómica de la hiperexpresión de dSPARC, tanto en ectodermo como ubicua, nos permitió obtener una lista de potenciales intermediarios del accionar de la proteína en mosca. Particularmente, el estudio señaló a Rab35 (un miembro de la familia de las pequeñas GTPasas de membrana) como un fuerte candidato para transducir señales de SPARC desde la matriz hacia el interior de la célula.

**Palabras Clave:** SPARC, cáncer, estroma, melanoma, vectores adenovirales, *Drosophila*, cierre dorsal, genómica.

# Abstract

Tumor growth is the result of the interaction between neoplastic cell and its environment. SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*) is a matricellular protein whose normal expression is associated with remodeling tissues. In most tumors an increase of SPARC expression is related to poor prognosis. With the aim of clarifying SPARC role in the establishment and development of human melanoma, we developed molecular tools which allowed us to show that SPARC endogenous levels in melanoma cells but not in stromal cells, affect tumor growth. Moreover, our *in vivo* experiments demonstrated that changes in SPARC levels in melanoma are sufficient to generate important modifications in tumoral environment. In fact, SPARC upregulation in melanoma cells promoted fibroblast recruitment, triggered neovascularization and led to important changes in extracellular matrix composition, while its transient decrease induced a PMN intratumoral infiltrate that was responsible for rejection of the tumor.

SPARC contribution in tissue remodeling was also studied in *Drosophila melanogaster* model. Through the generation of transgenic flies where SPARC expression was directed, we showed in gain-of-function experiments that dSPARC participates in certain events of the fly embryo development that involve migration, change of shape and cellular adhesion. Transcriptomics of SPARC overexpression both ubiquitous and in ectoderm, rendered several candidates to mediate SPARC effects in fly. Particularly, the study revealed Rab35 (a member of small GTPase membrane protein family) to be a strong candidate to transduce SPARC signals to the cytoplasm.

**Keywords:** SPARC, cancer, stroma, melanoma, adenoviral vectors, *Drosophila*, dorsal closure, genomics.

# Introducción General

## El contacto como comunicación ancestral

### Darwin, Monod y Sagan

La vida y su extraordinaria diversidad sobre la Tierra son, sin lugar a dudas, fruto del sorprendente proceso natural al que llamamos evolución. Dicho proceso es llevado a cabo gracias a una compleja interacción del organismo con su entorno, como bien lo describe Charles Darwin en “El origen de las especies”. En el caso de los procariotas, la comunicación del organismo con su medio ambiente es en cierto modo directa, ya que es la propia célula quien recibe, procesa y, por último, responde a la señal foránea. Pero no ocurre lo mismo con los organismos pluricelulares donde, en la mayoría de los casos, la superficie interactuante con el medio que los rodea es sólo un pequeño porcentaje de las células que los componen/integran. En ese caso, para evitar desinteligencias, “el azar y la necesidad”<sup>2</sup> dieron a luz mecanismos sumamente ingeniosos, capaces de transmitir las señales desde los suburbios hacia el interior del organismo. Poniendo como ejemplo a los vertebrados, encontramos que tanto la sangre como el sistema linfático y las redes nerviosas son muestras acabadas de especializadas estrategias dedicadas a la comunicación e intercambio de información dentro del organismo. Para muchos autores el aumento de la presión de O<sub>2</sub> en la atmósfera terrestre fue un evento determinante (Bekker *et al.*, 2004; Schneider and Londer, 1984). Esos largos 1500 millones de años que separan a los primeros metazoos de los eucariotas ancestrales son, sin duda, reflejo del desafío que enfrentó la evolución para desarrollar algunos de los mencionados mecanismos de comunicación dentro del individuo.

En rigor a la verdad, no todos los mecanismos de comunicación intercelular necesitaron más de un eón<sup>3</sup> para entrar en escena. Si dejamos de lado la mirada macroscópica del organismo y nos sumergimos dentro de sus órganos y tejidos llegaremos, sin duda, a el

<sup>2</sup> Hago referencia a la obra más famosa del científico y premio Nobel Jacques Monod. Resumidamente, en su libro, Monod menciona que existen dos características que sirven para definir a la vida: **el azar y necesidad**.

<sup>3</sup> Si bien el término **eón** es considerado sólo un período de tiempo de larga duración (generalmente referido a escalas geológicas), en la década del '80 Carl Sagan lo popularizó en un contexto astronómico, refiriéndose a él como 1 000 000 000 de años. En esta tesis es utilizando con esta última acepción.

## Introducción General

mecanismo ancestral de comunicación: una suerte de contacto íntimo de la célula con su entorno. Además, podremos encontrar en dicho escenario que cada célula es capaz de **leer su medio ambiente**. Pero, ¿Cuál es su medio ambiente? ¿Quiénes son sus vecinos? ¿Qué tipo de información obtiene?

Si bien la unión directa célula-célula es posiblemente la imagen más conocida de comunicación dentro los organismos, queda claro que el entorno de cada célula no sólo está conformado por sus células vecinas sino que, por el contrario, existe todo un universo de moléculas y mensajes depositado en los espacios intercelulares. Esta suerte de **éter molecular** funciona, sin menospreciarlo, como un “material de relleno” capaz de lograr la cohesión y al mismo tiempo proveer a la célula de todo tipo de información, de manera que ésta no quede aislada del resto del organismo. Paradójicamente, casi a modo de aforismo, esta frontera molecular separa a la célula de su entorno y al mismo tiempo le provee al sistema una herramienta de cohesión. Filogenéticamente hablando, no sorprende que las esponjas y celenterados más antiguos dependan de la adhesión celular para su organización. Lo mismo ocurre con los insectos, nematodos y vertebrados, en los que una malla molecular conocida como matriz extracelular (MEC) no sólo le brinda una contención estructural al sistema pluricelular de los metazoos sino que, además, cumple un rol activo en el comportamiento y la fisiología de la célula.

Por todo esto, podríamos concluir que la organización pluricelular requiere claramente de mecanismos dedicados a la comunicación y, quizás, aún más básicamente a la cohesión intercelular (Hynes and Zhao, 2000). Como veremos más adelante, el hecho más sobresaliente de esta afirmación es que ambos procesos (comunicación y cohesión) son en parte regulados por la propia MEC, una de nuestros protagonistas.

### La matriz extracelular: éter primordial y necesario para el flujo íntimo de información

Históricamente, la MEC fue definida desde un punto de vista morfológico-estructural como el material extracelular en forma de fibrillas o acículas (*needlelike*) obtenido mediante precipitación de tejido conectivo y posterior análisis de microscopía electrónica o difracción de rayos X (Gross *et al.*, 1954). Durante la década del ‘50, la bioquímica de estas moléculas era estudiada con escasa participación de los “citólogos”, hoy en día conocidos como biólogos celulares. Ello colaboró a que los primeros estudios físicos de los componentes de la MEC apoyaran la idea de un rol pasivo y no regulatorio. Si bien el colágeno, componente principal de la MEC, había sido descrito como un sistema molecular no inerte en estudios de polimerización *in vitro*, la funcionalidad de la matriz quedó relegada al plano mecánico y estructural. No obstante, ese concepto fue

## Introducción General

cambiando paulatinamente. Dialécticamente hablando, la apariencia y la esencia se enfrentaron para dejar de coincidir en dicho aspecto biológico. En la mayoría de los casos, este punto de inflexión es consecuencia directa de la observación científica, y éste no fue un caso excepcional. Clifford Grobstein demuestra elegantemente, el mismo año del “*Big Bang*” de la biología molecular, que un tejido puede inducir la **diferenciación** de otro mediante la secreción de matriz (Grobstein, 1953). Años más tarde se reportó que el colágeno promovía la diferenciación de las células musculares *in vitro* (Hauschka and Konigsberg, 1966), y para fines de los 60’s la idea de que los componentes de la matriz fueran “informativos” durante el desarrollo se diseminó con éxito (Hay, 1973). En la década del ‘70, ciertos avances en la biología del colágeno tales como las modificaciones postraduccionales y su diversidad genética, la biosíntesis por parte de distintos tejidos y los nuevos efectos de dicha molécula en la diferenciación celular, comenzaron a inclinar la balanza llamando la atención de la medicina clínica (Sugrue and Hay, 1981). Paulatinamente, y gracias a lo que muchos biólogos llamamos con cierto humor negro “experimentos de la naturaleza”, se fue profundizando el conocimiento de algunas patologías caracterizadas por el exceso, la modificación o la ausencia de ciertos componentes de la MEC. Finalizando la década, la inmunología entró en escena. La osteoartritis, la artritis reumatoidea, ciertos tipos de distrofias y varias otras alteraciones de **procesos inflamatorios** relacionados principalmente con degradación de proteoglicanos, comenzaron a adquirir protagonismo (McInnes and Schett, 2007). Durante el mismo período, el estudio de la biología de los componentes no colagenosos de la MEC arrojó interesantes resultados. Se profundizó no sólo en la **función adhesiva** de la fibronectina y la laminina<sup>4</sup> como puentes o *linkers* entre las fibras de colágeno y la superficie celular sino que, además, se planteó un posible **rol quimiotáctico** (Kleiman, 1981). En la década del ‘80, como resultado del estudio del citoesqueleto y su rol en el control de la forma celular, se desprendió la idea de que las moléculas de la matriz, solas o en combinación, afectaban vía receptores de superficie la **organización del citoplasma** afectando la forma, la **movilidad y la proliferación** de la célula (Sugrue and Hay, 1981; Tamkun *et al.*, 1986).

Fue quizás en este contexto histórico donde ocurrió la última y, posiblemente, más apasionante asociación biológica en mi campo de estudio. El hecho de que un sistema o entorno molecular sea capaz de:

- 1) regular la **diferenciación**
- 2) modular el proceso **inflamatorio**

<sup>4</sup> Como veremos más adelante, la **laminina** y la **fibronectina** no son dos ejemplos citados al azar sino que, muy por el contrario, estas moléculas son dos importantísimos componentes de matrix extracelular.

## Introducción General

- 3) promover la **quimiotaxis**
- 4) afectar la **proliferación** y, por último
- 5) modificar la forma y el **estado de adhesión** de una célula

Esto implicaba, casi de manera lineal, que **la progresión tumoral debía estar estrechamente relacionada con la biología de la matriz circundante**. La aparición de este concepto marcó un punto de inflexión en la oncología moderna. Prueba de ello es que durante la década del '80 el grupo de Lance Liotta describió que las interacciones entre células normales y la MEC tendían a estar alteradas en la neoplasia, pudiendo influenciar o estimular la proliferación, invasión y prognosis del tumor (Liotta, 1986).

Si bien el hilo de la introducción nos ha llevado hacia esta importantísima asociación entre la progresión tumoral y su entorno, haremos una pausa para adentrarnos específicamente en la biología de la MEC, lo que sin duda nos permitirá retomar el tema con los conocimientos básicos necesarios.

## El vecindario molecular de la célula

### Los componentes de la matriz extracelular

Dejando de lado la historia y abocándonos a la definición actual de la MEC, podríamos decir que ésta consiste en una intrincada red macromolecular compuesta por polisacáridos y proteínas secretadas y ensambladas localmente. La MEC es particularmente abundante en los tejidos conjuntivos, donde rodea a los distintos tipos celulares y le confiere la mayoría de las propiedades físicas al tejido. La MEC puede calcificarse, dando origen a estructuras duras como el hueso, puede ser transparente, como en el caso de la córnea, o adoptar una forma alargada y flexible para formar los tendones. Otro ejemplo interesante es el caso de la lámina basal. Esta estructura acelular delgada se ubica entre el epitelio y el tejido conjuntivo próximo cumpliendo, como profundizaremos más adelante, múltiples funciones biológicas.

Respecto de su composición, la MEC está constituida por dos clases principales de macromoléculas:

- Los polisacáridos del tipo de los glicosaminoglicanos (GAG's), los cuales normalmente se encuentran unidos en forma covalente a proteínas formando los proteoglicanos
- Las proteínas fibrosas de tipo estructural, como el colágeno y la elastina, y otras con características adhesivas, como la fibronectina y la laminina

## Introducción General

Los **GAG's** están formados por largas cadenas no ramificadas de polisacáridos, compuestas por unidades repetidas de disacáridos. Se han identificado cuatro grupos principales de GAG's: (1) ácido hialurónico, (2) condroitín sulfato y dermatán sulfato, (3) heparán sulfato y heparina, y (4) queratán sulfato. A excepción del ácido hialurónico, los demás GAG's se encuentran unidos en forma covalente con proteínas, formando proteoglicanos. Los proteoglicanos no sólo sirven de soporte mecánico, sino que también participan en procesos de señalización celular funcionando como receptores o co-receptores asociados a integrinas (ver apartado de integrinas). Además, los proteoglicanos se encuentran altamente hidratados y forman un gel que otorga resistencia, las fibras de colágeno se oponen a las fuerzas de tracción mientras que la elastina (ver mas adelante) le confiere elasticidad al tejido. Y la fase acuosa del gel permite la difusión de metabolitos, nutrientes y hormonas entre la sangre y las células que conforman los tejidos.

Los **colágenos** son las proteínas más abundantes en mamíferos. Estas moléculas están formadas por tres cadenas alfa que se enrollan sobre sí mismas formando una estructura helicoidal. Hasta el momento se han identificado 25 cadenas alfa diferentes, que dan origen a 19 tipos distintos de colágeno. Los principales tipos de colágeno encontrados en el tejido conjuntivo son los colágenos fibrilares de tipo I, II, III, V y XI. Una vez secretados al espacio extracelular, los colágenos fibrilares se organizan en polímeros denominados fibrillas de colágeno, que poseen entre 10 y 300 nm de diámetro y varios cientos de micrómetros de longitud.

Otro de los miembros de la familia de las proteínas fibrosas de la MEC es la **elastina**. Esta molécula sumamente hidrofóbica está compuesta por alrededor de 750 aminoácidos, siendo especialmente rica en prolina y glicina. Las moléculas de elastina son secretadas al espacio extracelular, donde se ensamblan mediante la formación de puentes cruzados para dar origen a una extensa red de filamentos y láminas. Dichos filamentos se asocian con fibras de colágeno para conformar las fibras de la MEC que requieren una propiedad elástica como ocurre en la piel, el pulmón y los ligamentos.

Como se mencionó anteriormente, la matriz extracelular posee numerosas variantes funcionales distribuidas a lo largo de los distintos tejidos del organismo. Dichas variantes difieren no sólo en el espacio que ocupan dentro del individuo sino, también, en su composición molecular. Como veremos seguidamente, la lámina basal es un muy interesante ejemplo de especialización de la MEC. Dicha introducción nos resultará provechosa a la hora de profundizar en el modelo del melanoma humano.

## Introducción General

### La lámina basal: una MEC muy particular

“La **membrana basal** es una capa acelular de sostén de espesor variable y que se encuentra en la base de los tejidos epiteliales”<sup>5</sup> (Geneser, 1993). En algunos casos, la membrana basal es tan grande que puede visualizarse como un engrosamiento eosinofílico mediante la utilización de la clásica tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Con la introducción del microscopio electrónico se pudo observar que la membrana basal contiene varios componentes estructurales. Organizada en una capa delgada (50-100 nm) denominada **lámina basal** y compuesta por filamentos incluidos en una matriz amorfa, esta estructura acelular recapitula o copia perfectamente la cara basal del epitelio que la secreta, conformando un **nexo molecular** entre el tejido epitelial y el tejido conjuntivo. Bajo la lámina basal se encuentra una zona más ancha compuesta por haces de fibras reticulares incluidas en una sustancia base glucoproteica. Esta zona se denomina lámina reticular y, junto con la lámina basal, constituyen la membrana basal que se observa al microscopio óptico (Geneser, 1993).

Al igual que los otros tipos de MEC, la lámina basal cumple un papel fundamental en la biología del tejido, regulando procesos de diferenciación, proliferación, migración y muerte celular. Existen láminas basales especializadas que cumplen papeles predominantemente estructurales. En el glomérulo renal y en los alvéolos pulmonares la lámina basal actúa como un filtro semipermeable. También en el endotelio la lámina basal actúa como barrera selectiva. En este caso, limita e impide el paso de las macromoléculas, pero presenta porosidades de diámetro mínimo que permiten el tráfico de las micromoléculas de nutrientes, metabolitos y de las citoquinas producidas por las propias células endoteliales. Además, a la lámina basal se le ha adjudicado la función especial de participar en ciertos procesos de diferenciación celular. Aunque su composición varía de un tejido a otro o incluso de una región a otra de la misma lámina, la mayoría de las láminas basales contienen colágeno de tipo IV, proteoglicanos de tipo heparán sulfato denominados perlecanos y glucoproteínas como la laminina y la entactina.

El **colágeno** formador de redes **tipo IV** posee una estructura mas flexible que los colágenos fibrilares. Su hélice de tres hebras está interrumpida en 26 regiones, lo que le permite realizar plegamientos múltiples. Este comportamiento estructural es de suma importancia, ya que le permite dar origen a un tipo de red flexible de tipo laminar e

<sup>5</sup> Teniendo en cuenta los tiempos de globalización en los que vivimos, ésta podría ser considerada una clásica definición de *Wikipedia*. No obstante, muchos autores de renombre en histología continúan hablando de **sostén** como función y de **separación** en lugar de **nexo**. En las próximas páginas expondré mi punto de vista al respecto.

## Introducción General

insoluble que sirve de andamio y al que se unen números componentes de la lámina basal (Geneser, 1993).

La **laminina** es un gran complejo proteico flexible, de unos 850 kDa, formado por 3 cadenas polipeptídicas asociadas entre sí mediante puentes disulfuro. Se han identificado 5 tipos de cadenas alpha, 3 tipos de cadenas beta y 3 de cadenas gamma, que dan origen a 12 heterotrímeros distintos. La laminina presenta varios dominios funcionales, con afinidad por colágeno IV, heparán sulfato, entactina, e integrinas, y contribuye al ensamblado de la MEC especializada, como es el caso de la lámina basal (Timpl and Brown, 1996).

La **entactina** o nidógeno es una proteína monomérica de 150 kDa con forma alargada y tres dominios globulares conectados por zonas flexibles (Fox *et al.*, 1991). Es capaz de formar complejos ternarios con colágeno tipo IV y la laminina a través de epítopes localizados en los dominios G2 y G3. Estos complejos, a diferencia de las proteínas anteriormente presentadas, estabilizan la arquitectura de la lámina basal en lugar de proporcionarle flexibilidad (Mayer *et al.*, 1995).

La **fibronectina** es un heterodímero formado por dos cadenas proteicas unidas mediante un par de puentes disulfuro situados cerca del extremo c-terminal. Cada subunidad está plegada en varios dominios separados por regiones flexibles. Estos dominios están formados por módulos repetidos en serie y codificados por exones independientes. El principal tipo de módulo, denominado fibronectina tipo III, tiene 90 aminoácidos de longitud y se repite al menos 15 veces en cada subunidad. Este módulo posee la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas. La fibronectina también posee dominios de unión a células y dominios de unión a otros componentes de la MEC como colágeno y heparina.

Por último, me gustaría destacar que no todos los compuestos de la lámina basal son producidos *in situ* por el epitelio o los fibroblastos circundantes. Como ejemplo podemos considerar a la **vitronectina**. Esta molécula es una proteína sérica producida principalmente por el hígado, capaz de asociarse a la matriz extracelular del estroma de tejidos durante la cicatrización de las heridas (Grinnell *et al.*, 1992). La vitronectina funciona como un regulador de la coagulación sanguínea al unirse a heparina, plasminógeno, y PAI-1 (Kost *et al.*, 1992). Esta molécula también promueve la adhesión, el estiramiento y la migración de varios tipos celulares al interactuar con las integrinas mediante la secuencia aminoacídica RGD (Schvartz *et al.*, 1999).

Dejando de lado los componentes de la MEC y regresando al concepto de interacción célula-entorno es oportuno comentar que, durante el ensamblado de la lámina basal, las

## Introducción General

células dirigen la ubicación de los distintos componentes por adhesión de los mismos a ciertos receptores de membrana. Recíprocamente, la adhesión de las células a la lámina basal induce la redistribución de dichos receptores de membrana, modificando la ubicación de las proteínas del citoesqueleto, generando una reorganización estructural permanente (Colognato *et al.*, 1999). Esto se puede representar de la siguiente manera:

Componentes de la **MEC**  $\leftrightarrow$  sus **receptores**  $\leftrightarrow$  el **citoesqueleto** de la célula

Resumiendo, el estado de adherencia es un proceso complejo, algo así como un *crosstalk* o cruce de palabras en el que no sólo participan activamente las células, sino que también lo hace la matriz que las circunda.

## Adhesión celular

### El proceso de adhesión y el destino celular

La adhesión de una célula a su matriz es un proceso clave para el desarrollo y supervivencia celular. Sin ir más lejos, la falta de adhesión puede gatillar o desencadenar un tipo particular de muerte celular llamado **anoikis**<sup>6</sup> (Frisch and Ruoslahti, 1997). Lo más interesante es que estar, o no, adherido a un sustrato no depende sólo del “interés” que tenga la célula por lograrlo, sino también de la presencia de un “suelo” o sustrato especializado, la MEC, que le permita unirse. Una vez, más ponemos en evidencia que el destino de la célula se encuentra en gran medida influenciado por su entorno.

Regresando al proceso de adhesión de las células a su MEC, podemos decir que es un evento complejo y continuo, plausible de ser dividido en tres claras etapas:

- La **adhesión** propiamente dicha (*attachment*)
- La formación de complejos focales y **extensión** (*spreading*) y
- La formación de **contactos de adhesión focal** y fibras de estrés

Si bien entre las etapas mencionadas no figura explícitamente el “contacto”, éste debe incluirse dentro de la adhesión. Hacer contacto (célula-sustrato) no es un evento menor, ya que sólo a partir de allí la célula puede dar comienzo a este largo proceso. En primer lugar, se produce una interacción específica entre ciertos receptores integrales de membrana, de tipo integrinas, con componentes de la MEC. Llamativamente, este

<sup>6</sup> El proceso de **anoikis** está directamente relacionado con la muerte celular causada por la falta de adherencia a un sustrato. Del griego “**sin casa**”, el término anoikis ejemplifica como la célula es afectada severamente por desarraigo de sustrato al punto de desencadenar su propia muerte.

## Introducción General

proceso depende del estado de activación de dichos receptores. Luego le sigue el proceso de estiramiento o *spreading*, donde las células se aplastan en dos dimensiones, aumentando la superficie de contacto con el sustrato. El evento de estiramiento depende del reclutamiento de ciertas proteínas citoplasmáticas como Src, de la fosforilación de paxilina (Richardson *et al.*, 1997), y de la actividad de pequeñas proteínas G como Rac y Cdc42 (Price *et al.*, 1998). Por último, las células organizan los filamentos de actina en grandes cordones denominados fibras de estrés, generando una gran tensión sobre los complejos focales, reorganizándolos espacialmente en los llamados contactos de adhesión focal.

## Integración de señales de la MEC: el papel de las integrinas

Las integrinas son conocidas como los receptores de la matriz extracelular. El término **integrina** fue aplicado por primera vez en 1987 para describir una familia de receptores heterodiméricos de membrana. Estas moléculas funcionan como nexo entre la MEC y el citoesqueleto mediando la adhesión y la migración de las células que las expresan (Hynes, 1987). Esta familia de proteínas transmembrana está formada por 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta, que dimerizan para formar 24 diferentes heterodímeros conocidos (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Llamativamente, estos receptores no sólo reconocen proteínas de la MEC como el colágeno y la laminina sino que, con su dominio extracelular, pueden unirse a otros receptores celulares como VCAM-1 o ICAM-1 promoviendo interacciones del tipo célula-célula. Se dice que el sistema es promiscuo, ya que algunos ligandos pueden ser reconocidos por más de una integrina y, al mismo tiempo, ciertos miembros de la familia de las integrinas son capaces de reconocer más de un ligando.

El dominio citoplasmático de las integrinas interacciona, directa o indirectamente, con el citoesqueleto de actina, para terminar conectando en forma de puente el citoesqueleto con la MEC (Liu and Burridge, 2000). Por un lado, las integrinas son capaces de inducir cambios de actividad en proteínas citoplasmáticas modulando la expresión génica en respuesta a la unión de un ligando extracelular (proceso conocido como *outside-in signaling*). Dado que el dominio citoplasmático de las integrinas es generalmente corto y no posee actividad enzimática, la transducción de señales es mediada por proteínas adaptadoras que conectan a las integrinas con el citoesqueleto. Por otro lado, las integrinas son capaces de modular finamente la afinidad en la superficie celular en respuesta a cambios en la fisiología y metabolismo celular (*inside-out signaling*) (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Dicho de otra forma, las integrinas funcionan como moléculas transductoras de señales bidireccionales.

## Introducción General

Por más de una década se ha descrito que la pérdida de adhesión a la MEC causa un tipo particular de apoptosis en muchos tipos celulares (Meredith *et al.*, 1993); (Frisch and Francis, 1994). Como se mencionó anteriormente, este fenómeno denominado **anoikis** (Frisch and Ruoslahti, 1997), puede ayudar a mantener la integridad tisular, ya que impediría que células que han perdido el contacto con la MEC puedan establecerse en lugares inapropiados. El proceso de anoikis puede ser controlado por la MEC en una forma dependiente de integrinas específicas. La integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que se une a fibronectina, induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Zhang *et al.*, 1995a), mientras que la integrina  $\alpha v\beta 3$ , promueve la supervivencia de células endoteliales y de melanoma al inhibir la expresión de p21 y p53, y activar al factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Scatena *et al.*, 1998; Stromblad *et al.*, 1996). La expresión de  $\alpha v\beta 3$  integrina en ausencia de ligando es capaz de inducir la apoptosis de células endoteliales y melanoma mediante el reclutamiento y activación de caspasa 8 por la subunidad de la integrina que forma parte de receptores no ocupados por el ligando (Stupack *et al.*, 2001).

## El contacto de adhesión focal

Cuando las integrinas se unen a sus ligandos, éstas se agrupan en el plano de la membrana plasmática asociándose con un complejo de señalización y promoviendo el ensamblado de las fibras de actina en el citoplasma. A su vez, la reorganización de los filamentos de actina en grandes fibras de estrés hace que un número mayor de integrinas se agrupe, aumentando la avidencia por la MEC. Como resultado, las integrinas ancladas a sus ligandos de la MEC junto con las proteínas asociadas al citoesqueleto de actina se vinculan formando una estructura compleja denominada contacto de adhesión focal. Las proteínas asociadas al citoesqueleto pueden ser estructurales, como la talina, la vinculina y la  $\alpha$ -actinina; o relacionadas con el proceso de señalización, como c-Src, FAK, p130CAS y paxilina. Por esta razón, las adhesiones focales cumplen dos funciones principales: transmiten tensión a los sitios de adhesión y actúan como centros de señalización (Sastry and Burridge, 2000). Las adhesiones focales se forman durante el estiramiento o la migración de las células sobre sustratos donde las proteínas de la MEC se encuentran adsorbidas. Los filopodios y lamelipodios poseen numerosos complejos focales necesarios para el desplazamiento de la célula (Ridley, 2001). Cuando estos procesos alcanzan su estiramiento máximo, los complejos maduran para dar origen a las adhesiones focales, las que se unen firmemente al sustrato generando las fibras de estrés necesarias para la existencia de fuerzas de tensión (Schoenwaelder and Burridge, 1999).

## Introducción General

### Arquitectura del citoesqueleto de actina durante la adhesión celular

Durante la formación de las **adhesiones focales**, las integrinas interactúan con el citoesqueleto de actina e inducen una fuerza de contracción que se opone a la fuerza de adhesión al sustrato. Esto genera una tensión isométrica entre los sitios de adhesión que resulta en el alineamiento de las fibras de actina, formando las denominadas fibras de estrés, y en el mayor agrupamiento de las integrinas para formar grandes adhesiones focales (Sastry and Burridge, 2000). La proteína pequeña de unión a GTP RhoA interviene en el proceso de formación de fibras de estrés y de adhesiones focales (Hall, 1998). Los miembros más importantes de la familia de Rho son RhoA, Rac y Cdc42 (Hall, 1998). Estas GTPasas ejercen su función al asociarse con proteínas efectoras sólo cuando están unidas a GTP, pero no cuando están unidas a GDP. Las GTPasas son activadas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) y por inhibidores de proteínas disociadoras de nucleótidos de guanina, que modulan el intercambio de GDP por GTP; y son inhibidas por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que promueven la hidrólisis del GTP unido a las proteínas Rho (Sahai and Marshall, 2002). La activación de Rac y Cdc42 es esencial para el estiramiento celular (Price *et al.*, 1998) por su capacidad de estimular la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente (Hall, 1998). En cambio, la activación de RhoA es esencial para la formación de adhesiones focales inducidas por la adhesión a la MEC a través de integrinas (Clark *et al.*, 1998).

## Las proteínas matricelulares y su biología

### Estado de adherencia celular: todo, nada y un poco

Si bien hasta el momento hemos hablado principalmente del proceso mediante el cual la célula se adhiere a su matriz, hay que destacar que “no todo es adhesión” en la vida de la célula. Como veremos a continuación, ciertos procesos celulares necesitan de estados de adhesión intermedia.

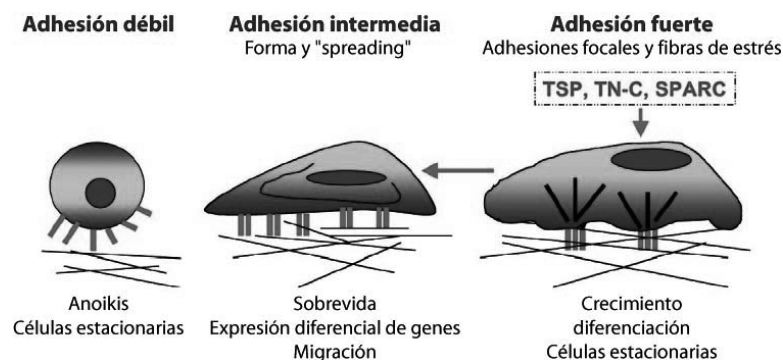
Las **proteínas matricelulares** fueron definidas como la familia o grupo de moléculas de secreción capaces de interactuar con receptores de superficie, componentes de la MEC, ciertos factores de crecimiento y proteasas del medio extracelular (Bornstein, 1995). Originalmente limitada a SPARC, trombospondina-1 (TSP-1), y tenascina C, este grupo de proteínas ha sido ampliado para incluir a TSP-2, tenascina X, sindecanos y osteopontina (Sage, 2001). Como ya hemos introducido en más de una oportunidad, la MEC es mucho más que el andamio donde las células descansan. Las proteínas

## Introducción General

matricelulares, como componentes de la MEC, son un claro ejemplo de ello. Esta familia de proteínas no relacionadas estructuralmente posee un núcleo de actividades biológicas compartidas (Sage, 2001).

- Regulan el estado de **adhesión** de la célula con la MEC
- Son activas moduladoras de la **vascularización**
- Participan en el **proceso inflamatorio**
- Poseen actividad **quimiotractante**
- Regulan la **proliferación** de ciertos tipos celulares

Llamativamente, estas proteínas pueden funcionar como adaptadores o moduladores de la interacción células-MEC independientemente del estado en el que se encuentren: solubles o unidas al sustrato (Sage and Bornstein, 1991). Cuando actúan unidas al sustrato, estas proteínas pueden inducir la adhesión y el estiramiento, pero nunca la formación de adhesiones focales y fibras de estrés (Murphy-Ullrich, 2001). También son capaces de antagonizar la formación de dichas estructuras promovidas por otras proteínas de la MEC (Adams and Schwartz, 2000). Cuando se encuentran en forma soluble las proteínas matricelulares poseen actividad anti-adhesiva. Es decir, estimulan la reorganización de las fibras de estrés y el desensamblado de las adhesiones focales sin modificar el estado de estiramiento de las células (Murphy-Ullrich, 2001). De esta manera, llevan a las células a un estado de adhesión intermedia, el cual es óptimo para la migración celular (**Figura 1**) (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998; Murphy-Ullrich, 2001).



**Figura 1. Etapas de la adhesión celular e inducción del estado de adhesión intermedia por las proteínas matricelulares.** Durante el proceso de adhesión celular la célula se pega a la MEC, se estira ("spreading"), y forma adhesiones focales y fibras de estrés. En cada etapa, la fuerza de la adhesión a la MEC aumenta. La desadhesión es la transición desde el estado de adhesión fuerte al de adhesión intermedia, y se caracteriza por la pérdida de fibras de estrés y adhesiones focales, sin perder la morfología celular, el estado de "spreading", y los complejos focales. Adaptado de Murphy-Ullrich, 2001.

## Introducción General

La migración se encuentra disminuida en aquellas células que poseen una fuerte adhesión a la MEC. La pérdida de adhesiones focales ha sido asociada a un fenotipo migratorio (Xie *et al.*, 1998). Sin embargo, el sistema se encuentra finamente regulado de manera que la pérdida total de adhesión impide el cambio de forma y la migración celular (Huttenlocher *et al.*, 1995).

## Las trombospondinas

Las trombospondinas constituyen una pequeña familia de proteínas de secreción formada por 5 miembros (TSP-1, 2, 3, 4, y 5) (Lawler, 2000). Las TSP-1 y 2 son trímeros cuyos monómeros, formados por 5 dominios proteicos, poseen un peso molecular de 145 kDa, y constituyen un subgrupo de TSPs pertenecientes a la familia de las proteínas matricelulares. Las TSPs 3 a 5 son pentaméricas, formadas por subunidades de aproximadamente 100 kDa (Bornstein and Sage, 1994). A pesar de la similitud de secuencia y estructura entre TSP-1 y 2, el rol fisiológico de ambas TSPs parece ser diferente (Lawler, 2000). Mientras que la expresión de ambas TSPs en hueso coincide parcialmente, el patrón de expresión en distintos tejidos durante el desarrollo es diferente (Iruela-Arispe *et al.*, 1993). Además, los fenotipos de los ratones *knockout*<sup>7</sup> para ambas TSPs son diferentes (Kyriakides *et al.*, 1998; Lawler *et al.*, 1998).

TSP-1 tiene efectos anti-adhesivos *in vitro* cuando es agregada a una matriz como fibronectina (Sage and Bornstein, 1991), y actúa reduciendo el número de adhesiones focales en fibroblastos y células endoteliales (Murphy-Ullrich *et al.*, 1993) a través de un mecanismo mediado por calreticulina y proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (Goicoechea *et al.*, 2002). TSP-2 también actúa disminuyendo el número de adhesiones focales (Murphy-Ullrich *et al.*, 1993), sin embargo, fibroblastos de ratones nulos para TSP-2 presentaron una menor adhesión a proteínas de la MEC (Kyriakides *et al.*, 1998). Estos fibroblastos también presentaron una mayor actividad de MMP-2, y tanto la transfección estable con el ADNc de TSP-2 como la neutralización de la actividad MMP-2 aumentaron la adhesión a MEC (Yang *et al.*, 2000). Recientemente ha sido reportado que TSP-2 interacciona directamente con MMP-2 y el complejo TSP-2/MMP-2 es endocitado a través del receptor relacionado a LDL (Yang *et al.*, 2001).

TSP-1 puede tener distintos efectos dependiendo de si se encuentra en solución o asociada a la MEC. TSP-1 en solución inhibe el “spreading” de células endoteliales (Murphy-Ullrich *et al.*, 1993). Sin embargo, TSP-1 asociada a MEC es capaz de estimular

<sup>7</sup> Un **individuo knockout** es aquel que se lo modifica genéticamente de manera tal que uno o más genes de su genoma queden inactivos. El término en castellano que utilizaremos en esta tesis para hacer mención a un animal *knockout* es: “**individuo nulo**” para un gen determinado.

## Introducción General

el estiramiento y la proliferación de células endoteliales, posiblemente a través de su interacción con la integrina  $\alpha 3\beta 1$  (Chandrasekaran *et al.*, 2000). También dependiendo de los dominios utilizados para los ensayos, TSP-1 puede actuar estimulando o inhibiendo la quimiotaxis de células de músculo liso, neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células de melanoma (Taraboletti *et al.*, 1990; Taraboletti *et al.*, 1987; Tolsma *et al.*, 1993).

Según el patrón de expresión, TSP-1 y 2 podrían tener un papel diferente en los procesos de cicatrización de heridas. La expresión de TSP-1 aumenta durante el primer día luego de la herida y cae lentamente hasta ser indetectable para el día 10 (DiPietro *et al.*, 1996). Por el contrario, TSP-2 comienza a ser detectable al día 3 y llega a un máximo alrededor del día 10 (Kyriakides *et al.*, 1999). Sin embargo, distintos modelos experimentales sugieren que ambas proteínas estarían involucradas en inhibir los procesos de cicatrización de heridas. La sobre-expresión de TSP-1 en queratinocitos mediante el promotor del gen de la queratina 14 retardó el proceso de cicatrización de heridas, conjuntamente con una reducción en el número y tamaño de los vasos sanguíneos (Streit *et al.*, 2000). Por otro lado, los ratones nulos para TSP-2 mostraron una tasa de cicatrización dérmica aumentada, con una organización anormal de las fibrillas de colágeno y un aumento en la producción de fibronectina (Kyriakides *et al.*, 1999).

A pesar de que TSP-1 tiene actividad quimiotáctica sobre neutrófilos y monocitos, el ratón nulo para TSP-1 presentó infiltrado leucocitario e inflamación crónica a nivel pulmonar (Lawler *et al.*, 1998), así como una reacción inflamatoria leve en el páncreas (Crawford *et al.*, 1998). Una posible explicación es que TSP-1 es capaz de activar TGF- $\beta$  tanto *in vitro* (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000) como *in vivo* (Crawford *et al.*, 1998), y TGF- $\beta$  posee actividad anti-inflamatoria (Boivin *et al.*, 1995; Kulkarni *et al.*, 1993; Shull *et al.*, 1992).

Tanto TSP-1 como TSP-2 pueden actuar como proteínas anti-angiogénicas. Ratones transgénicos que sobre-expresan TSP-1 mostraron una menor angiogénesis inducida por células de carcinoma cutáneo escamoso (Streit *et al.*, 1999), y la expresión de TSP-1 o TSP-2 por células tumorales inhibió la angiogénesis y el crecimiento tumoral en ratones atómicos (Streit *et al.*, 1999). El efecto anti-angiogénico de las TSPs puede deberse a su unión a bFGF, bloqueando la interacción de bFGF con su receptor o la cascada de señalización inducida por bFGF (Iruela-Arispe *et al.*, 1999), o interaccionando con CD36 e induciendo apoptosis vía caspasa-3 (Jiménez *et al.*, 2000).

## Introducción General

### Las tenascinas

La tenascina-citotactina (TN-C) fue el primer miembro descrito dentro de la familia de las tenascinas (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1986). Si bien la TN-C posee un rol preponderante durante el desarrollo, en el adulto está involucrada en procesos de remodelación de tejidos regulando la adhesión celular y los procesos de transducción de señales, principalmente, en el tejido nervioso (Jones and Jones, 2000).

La TN-C es un oligómero con subunidades de 190 a 300 kDa unidas por puentes disulfuro. Al igual que otros miembros de la familia de proteínas matricelulares, la TN-C posee regiones ricas en cisteínas, muchas de las cuales se encuentran formando puentes disulfuro intracatenarios. Esta molécula también posee una estructura de tipo EF-hand con afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Jones *et al.*, 1989; Spring *et al.*, 1989). En muchos casos, estas estructuras poseen afinidad por diversos ligandos, incluyendo a otras proteínas de la MEC, glicosaminoglicanos, y receptores de superficie celular. Los receptores celulares para la tenascina incluyen a miembros de la familia de las integrinas, el fosfacano (proteína tirosina fosfatasa receptora de proteoglicanos con condroitin sulfato), y la anexina II.

Funcionalmente, la TN-C desensambla adhesiones focales del citoesqueleto de actina, induciendo la pérdida de adhesión celular y, por lo tanto, comportándose como una proteína anti-adhesiva (Chung and Erickson, 1997; Chung *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1997; Murphy-Ullrich *et al.*, 1991; Prieto *et al.*, 1992; Spring *et al.*, 1989). Respecto de su actividad sobre la proliferación celular, se ha visto que la regula en forma positiva, actuando como factor de crecimiento y factor de supervivencia en células de músculo liso vascular durante procesos de angiogénesis (Cleek *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 2000). Contrariamente, varios trabajos han mostrado que TN-C puede inhibir la proliferación de fibroblastos (Crossin, 1991; Krushel *et al.*, 1994).

## Secretada, ácida y rica en cisteínas

### Estructura y función de SPARC

SPARC (por *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), también denominada osteonectina, BM-40 y 43K, es una proteína matricelular asociada a procesos de **remodelación de tejidos, morfogénesis, migración celular y proliferación** (Lane and Sage, 1994). SPARC fue identificada por primera vez por Termine *et al* como el segundo componente proteico mayoritario del tejido óseo después del colágeno, y se la

## Introducción General

denominó osteonectina (Termine *et al.*, 1981). Años más tarde, SPARC fue aislada como una glicoproteína de 43 kDa de cultivos de células endoteliales bovinas (Sage *et al.*, 1984), y fibroblastos porcinos (Otsuka *et al.*, 1984). La comparación de secuencias de cDNA demostró que SPARC secretada por células embrionales de endodermo parietal murino, la proteína de 43 kDa producida por el endotelio bovino y los fibroblastos porcinos, la osteonectina, y la BM-40 del sarcoma murino EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*), eran ortólogas (Mann *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 1986b).

SPARC es el producto de un único gen que se ha mantenido altamente conservado a lo largo de la evolución (**Tabla 1**). La comparación de la secuencia de la proteína humana con la de otros mamíferos (Termine *et al.*, 1981); Mason, 1986 #160], anfibios (Damjanovski *et al.*, 1992), y aves (Bassuk *et al.*, 1993) mostró una identidad mayor al 70 %; mientras que con SPARC de *C. elegans* y *D. melanogaster* posee una homología del 30 % (**Tabla 1**) (Martinek *et al.*, 2002; Schwarzbauer and Spencer, 1993).

Especie	GeneBank	Hombre	Ratón
<i>Homo sapiens</i>	NP – 003109	100	92
<i>Bos taurus</i>	AAA30678	99	93
<i>Rattus rattus</i>	CAA74042	92	98
<i>Mus musculus</i>	CAA27642	92	100
<i>Gallus gallus</i>	AAA16893	87	86
<i>Coturnix coturnix</i>	AAD12179	89	79
<i>Xenopus laevis</i>	CAA44350	79	77
<i>Oncorhynchus mikkis</i>	AAC99813	77	74
<i>Drosophila melanogaste</i>	CAB39319	30	32
<i>Caenorhabditis elegance</i>	AAA16827	31	32

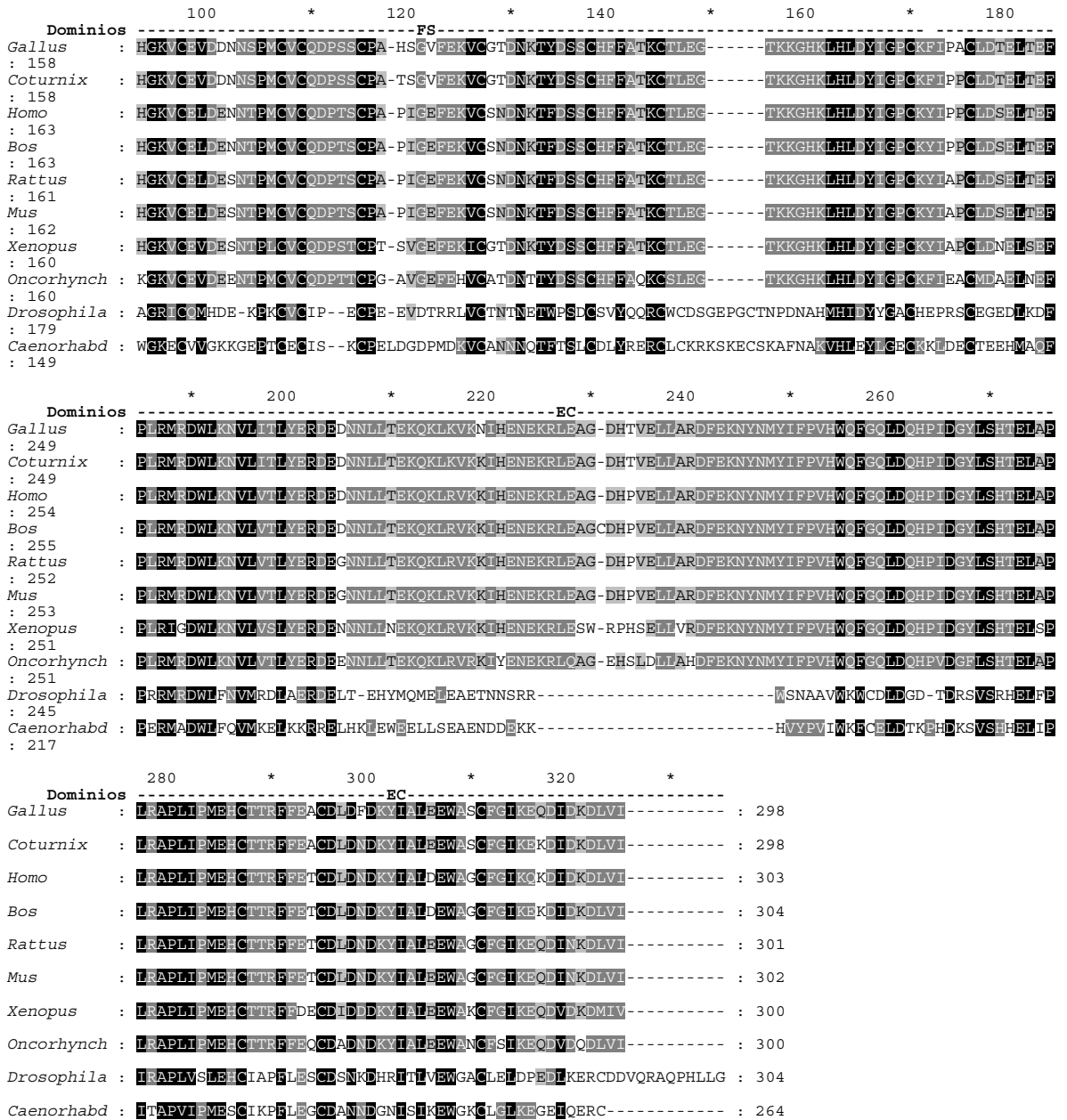
**Tabla 1. Identidad y filogenia de SPARC.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de SPARC de distintas especies. Los valores indican el porcentaje de aminoácidos idénticos luego de alinear las secuencias de a pares. Adaptado de Brekken (Brekken and Sage, 2000).

Experimentos *in vitro* han mostrado que SPARC es capaz de desensamblar adhesiones focales (Murphy-Ullrich *et al.*, 1995), promover cambios en la forma celular, inhibir el estiramiento (Lane and Sage, 1990; Sage *et al.*, 1989c), inhibir el ciclo celular (Funk and Sage, 1991; Funk and Sage, 1993; Rempel *et al.*, 2001; Sage *et al.*, 1995), regular procesos de diferenciación celular (Bassuk *et al.*, 1999), inhibir la respuesta celular a ciertos factores de crecimiento (Hasselaar and Sage, 1992; Kupprion *et al.*, 1998; Raines *et al.*, 1992), y regular la producción y actividad de MMPs (metaloproteasas de matriz



# Introducción General

: 59



**Figura 2. Alineamiento de secuencias de la proteína SPARC de distintas especies.** (PS) péptido señal; (DA) dominio I ácido; (FS) dominio II; (EC) dominio III. Las secuencias fueron alineadas col el algoritmo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) y visualizadas con el programa GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).

El transcripto de SPARC más abundante en mamíferos posee 2,1 kb, y en algunas células también se ha encontrado un transcripto de 3,0 kb. Ambos transcriptos poseen la misma región codificante, y se diferencian por derivar del uso de señales de poliadenilación alternativas (Swaroop *et al.*, 1988). No se conoce la existencia de alguna función particular del transcripto de 3,0 kb, aunque algunos tejidos sólo expresan esta forma (Howe *et al.*, 1990).

## Introducción General

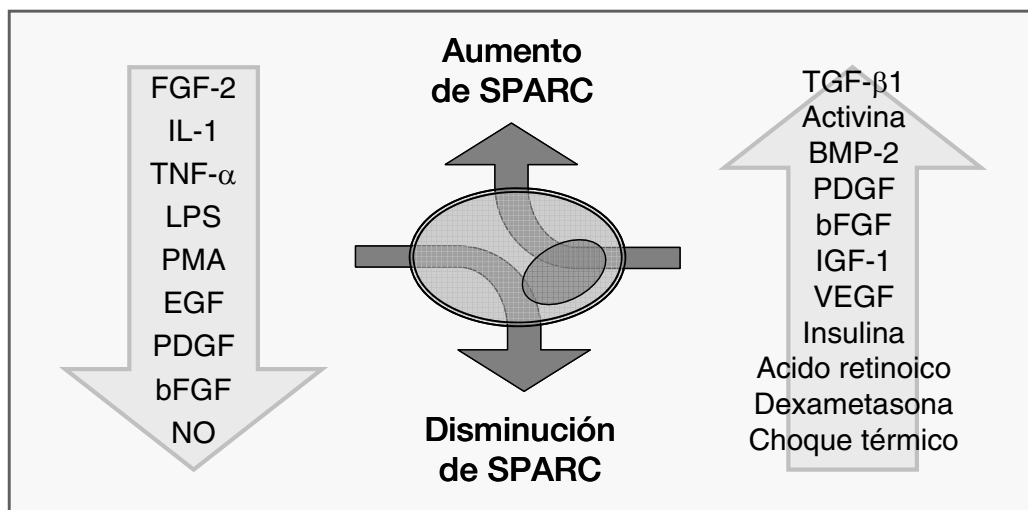
SPARC es considerado un gen tardío de células diferenciadas que responde, en tratamientos *in vitro* al ácido retinóico, dexametasona y choque térmico (*heat shock*) (Brekken and Sage, 2000) (Figura 3). El tratamiento con ácido retinóico induce un aumento de SPARC de hasta 20 veces de ARNm y proteína en células de carcinoma embrionario murino (Mason *et al.*, 1986b; Nomura *et al.*, 1988). La transcripción del gen SPARC también ha sido estudiada en células de sarcoma osteogénico de rata, donde mostró una inducción en respuesta a la dexametasona (Ng *et al.*, 1989). El promotor del gen SPARC posee un elemento de respuesta a choque térmico (Young *et al.*, 1989), y el tratamiento térmico indujo la producción de SPARC en condrocitos embrionarios de pollos (Neri *et al.*, 1992). Varias citoquinas y factores de crecimiento han sido identificados como reguladores de la producción del ARNm de SPARC (Figura 3). TGF- $\beta$ 1 fue capaz de aumentar la expresión de SPARC de tres a cuatro veces en fibroblastos (Reed *et al.*, 1994; Wrana *et al.*, 1991b), en osteoblastos (Shiba *et al.*, 1998; Shiba *et al.*, 2001), en condrocitos (Chandrasekhar *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1996) y en células epiteliales de pulmón (Schiemann *et al.*, 2003). La activina, un miembro de la familia de TGF- $\beta$ , estimuló la expresión temprana de SPARC en embriones de *Xenopus*, y presentó un efecto sinérgico junto con FGF-2 en la estimulación de la producción de ARNm de SPARC (Damjanovski *et al.*, 1998). En otro estudio, la BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*), otro miembro de la familia del TGF- $\beta$ , indujo un aumento en los niveles de ARNm de SPARC en condrocitos articulares de conejo (Nakamura *et al.*, 1996). La expresión de SPARC también fue inducida en estas células por IGF-1 y PDGF (Chandrasekhar *et al.*, 1994). El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) indujo un aumento en los niveles de ARNm y de proteína SPARC en células endoteliales vasculares humanas a través de un mecanismo dependiente de p38 MAPK (Kato *et al.*, 2001). Además, recientemente ha sido descrita la inducción de SPARC por insulina en cultivos celulares de adipocitos (Tartare-Deckert *et al.*, 2001).

De la misma manera, varios factores han sido capaces de disminuir la expresión de SPARC. FGF-2, un mitógeno que actúa sobre células del linaje osteoblástico, fue capaz de inhibir la diferenciación de osteoblastos e inhibió la expresión de SPARC (Shiba *et al.*, 1995), principalmente al reducir la estabilidad del ARNm (Delany and Canalis, 1998). El tratamiento con el factor de crecimiento epidérmico EGF también indujo una disminución en los niveles de ARNm de SPARC en osteoblastos (Shiba *et al.*, 1998). Citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$  inhibieron la producción y secreción de SPARC en condrocitos articulares (Chandrasekhar *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1996) y en osteoblastos (Shiba *et al.*, 1998). Se ha descrito un efecto inhibitorio del óxido nítrico (NO) sobre la expresión de SPARC por células mesangiales (Beck *et al.*, 2001);

## Introducción General

Walpen *et al.*, 2000), y aparentemente el NO actuaría a través del factor de transcripción Erg, necesario para la proliferación de las células endoteliales (McLaughlin *et al.*, 2001) (Figura 3).

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



**Figura 3. Factores que regulan la expresión de SPARC.** Las moléculas fueron ordenadas de acuerdo al efecto independientemente del modelo biológico en el que fueron probadas. Aquellas moléculas que fueron descritas con ambas actividades, como estimuladoras e inhibidoras de la expresión de SPARC, fueron repetidas en ambos grupos.

## Ontogenia del gen SPARC

La expresión de SPARC se encuentra regulada en forma temporal y espacial durante el desarrollo (Damjanovski *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1987; Nomura *et al.*, 1988; Sage *et al.*, 1989b; Schwarzbauer *et al.*, 1994). En anfibios, la expresión de SPARC comienza luego de la gastrulación, y el ARNm se acumula rápidamente en estructuras mesodérmicas y ectodérmicas de la néurula (embriones en estadio 13) (Lane *et al.*, 1994). En ratones, la expresión de SPARC puede ser detectada al día 9 en el primordio del corazón, somitos, y

## Introducción General

membranas extraembrionarias. Más tarde en el desarrollo, alrededor del día 14, SPARC es expresado en cartílago, hueso, epitelio del tracto digestivo, piel y vasos sanguíneos (Holland *et al.*, 1987; Sage *et al.*, 1989b). Niveles elevados de ARNm y proteína SPARC han sido descritos en huesos y dientes durante el desarrollo, principalmente en osteoblastos, odontoblastos, y fibroblastos adyacentes a condrocitos (Mundlos *et al.*, 1992).

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

En células en cultivo, SPARC puede ser detectada principalmente en el medio de cultivo como un producto de secreción, y en menor cantidad en el citoplasma, con una localización perinuclear. Recientemente ha sido descrita la localización nuclear de SPARC (Yan *et al.*, 2005). SPARC ha sido encontrada en el núcleo de células embrionarias de pollo y de células endoteliales de bovinos adultos con una distribución dependiente del ciclo celular (Gooden *et al.*, 1999) y en células de la retina de pollos (Yan and Sage, 1999). Además, Gooden *et al.* demostraron que SPARC extracelular puede ser tomada por las células y transportada hasta el núcleo (Gooden *et al.*, 1999).

## Estructura y propiedades bioquímicas de SPARC

En vertebrados, SPARC codifica para una proteína de entre 298 y 304 aminoácidos, de los cuales los primeros 17 constituyen el péptido señal, que es removido antes de que la proteína sea secretada (Lane and Sage, 1994). SPARC madura de origen humano está

## Introducción General

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

Originalmente, Engel *et al* propusieron la presencia de cuatro dominios estructurales en la proteína SPARC (Engel *et al.*, 1987). Una década más tarde, basándose en modelos de estructura secundaria y en estudios de cristalografía de rayos X, Maurer *et al* propusieron una división en 3 dominios (Maurer *et al.*, 1995) (**Figura 4A**).

**Dominio I: (dominio ácido, aminoácidos 3-51):** Está codificado por los exones 3 y 4 y consiste en una región ácida (pI ~ 3) rica en Asp y Glu. La estructura de este dominio no ha sido resuelta, y resultados de espectroscopía de dicroísmo circular predijeron la existencia de regiones con características de hélice alfa sensibles a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maurer *et al.*, 1992). Las dificultades para cristalizar este dominio sugieren que es responsable de las características de proteína nativamente desplegada que muestra SPARC (Uversky, 2002b). Este dominio posee baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , con una Kd de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  M (Maurer *et al.*, 1992), y se une a hidroxapatita, por lo que ha sido implicado en la mineralización de cartílago y hueso (Romberg *et al.*, 1985). SPARC de nematodos, que carecen del exón 3, es 21 aminoácidos más corta que SPARC de vertebrados, pero mantiene las propiedades de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Schwarzbauer *et al.*, 1994). Este dominio N-terminal contiene los epítopes inmunodominantes (Maillard *et al.*, 1992; Stenner *et al.*, 1984), y es la región que presenta mayor variabilidad entre especies (**Figura 4A**) y entre miembros de la familia de SPARC (**Figura 5**). Los dos residuos N-terminales adyacentes Glu3 y Glu4 pueden actuar como aceptores aminos en reacciones de unión cruzada (*crosslinking*) catalizadas por la transglutaminasa c (Hohenadl *et al.*, 1995). SPARC es co-expresada junto con transglutaminasa en el cartílago maduro (Aeschlimann *et al.*, 1993), y se han identificado oligómeros de SPARC producto de reacciones de transglutaminación tanto en cartílago (Aeschlimann *et al.*, 1995) como en fibrosis hepáticas (Grenard *et al.*, 2001). Además del *crosslinking* por transglutaminación, también se ha aislado una glicoproteína de hueso unida a SPARC mediante puentes disulfuro (Zhou *et al.*, 1998).

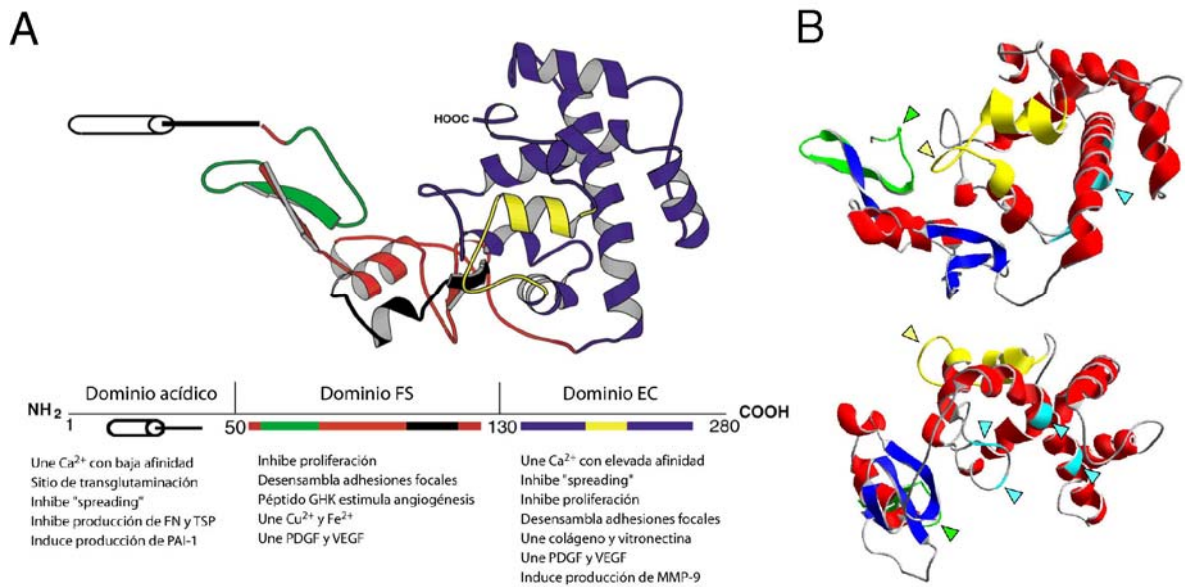
## Introducción General

**Dominio II (FS (*follistatine-like*), aminoácidos 52-132):** Está codificado por los exones 5 y 6 y contiene 10 cisteínas y un carbohidrato en la posición Asn99, cuya naturaleza depende del tejido donde SPARC es producida. Existen diferencias entre hueso y plaquetas en la glicosilación de SPARC que han sido propuestas como responsables de diferencias estructurales y funcionales (Kelm and Mann, 1991). La eliminación del oligosacárido por N-glicosidasa aumentó la afinidad de SPARC por colágeno V (Xie and Long, 1995). La estructura de este dominio es homóloga al dominio repetido de follistatina. El análisis por cristalografía de rayos X mostró que el dominio II consiste en una estructura alargada formada por un horquilla- $\beta$  N-terminal y un pequeño núcleo de estructura mixta  $\alpha/\beta$  (Figura 4A). Tanto la secuencia como la estructura cristalina indican que el núcleo del dominio II se asemeja a un inhibidor de serina-proteasa de la familia Kazal, y que el horquilla- $\beta$  N-terminal se parece al del EGF (Hohenester *et al.*, 1997). La región N-terminal del dominio II posee afinidad por heparina y proteoglicanos (Hohenester *et al.*, 1997), y la región C-terminal posee dos sitios con afinidad por  $\text{Cu}^{2+}$  (Vernon and Sage, 1989).

**Dominio III (EC (*extracellular Ca<sup>2+</sup>-binding domain*), aminoácidos 133-285):** Está codificado por los exones 7 a 9. El estudio de cristalografía de rayos X reveló la estructura globular de este dominio que contiene dos motivos *EF-hand* (manos EF) con elevada afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  (Kd de  $10^{-7}$  M) (Hohenester *et al.*, 1996). El dominio EC interacciona con una hélice N-terminal anfifílica del dominio II definiendo un nuevo módulo de unión a calcio (Hohenester *et al.*, 1996) (Figura 4A). Dicha interacción tiene lugar a través de múltiples residuos que se encuentran conservados en las proteínas de la familia de SPARC SC1 y QR1 (Figura 5) y aparentemente estabilizan la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Hohenester *et al.*, 1997). Los colágenos fibrilares tipo I, III y V, y el colágeno de lámina basal de tipo IV, se unen al dominio EC de SPARC en forma dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maurer *et al.*, 1995; Pottgiesser *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998) (Figura 4B). La afinidad de SPARC por colágeno puede ser aumentada por el clivaje entre las leucinas L197 y L198, y ha sido demostrada la especificidad *in vitro* de varias metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-7, MMP-3, MMP-2 y MMP-13) para clivar a SPARC en dicha posición (Sasaki *et al.*, 1997). Mediante el uso de anticuerpos capaces de reconocer en forma específica la forma clivada de SPARC, Sasaki *et al.* mostró la presencia de SPARC clivada *in vivo* (Sasaki *et al.*, 1999). El análisis de la estructura cristalina y de la mutagénesis dirigida mostraron que cinco residuos (R149, N156, L242, M245 y E246) son necesarios para la unión al colágeno, y que el clivaje entre los residuos L197-L198 permite un mayor acceso de la hélice triple de colágeno a los residuos involucrados en la unión al colágeno, aumentando de esta manera la afinidad

## Introducción General

de la interacción (Sasaki *et al.*, 1998) (**Figura 4B**). El dominio EC de SPARC también posee afinidad por la región de unión a heparina de la vitronectina, pero dicha interacción ha sido observada sólo en ensayos en fase sólida, mientras que la vitronectina en forma soluble no interacciona con SPARC (Rosenblatt *et al.*, 1997).



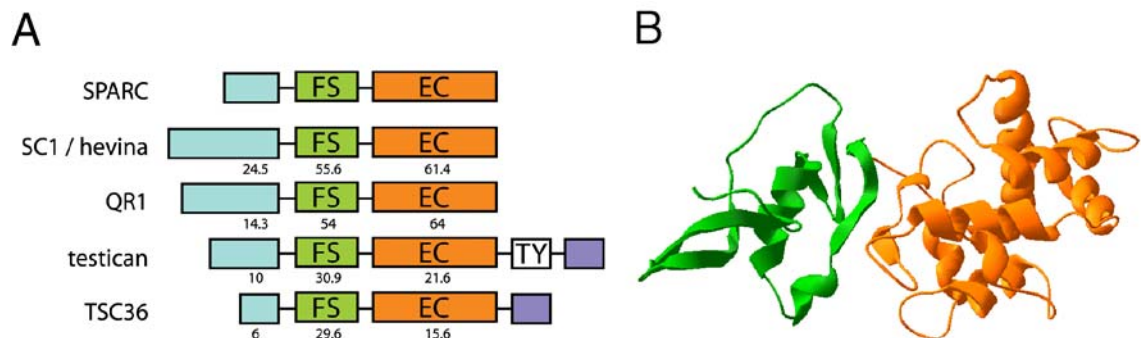
**Figura 4. Estructura de SPARC.** (A) Diagrama de cintas derivado de datos de cristalografía. Representación de los tres dominios de SPARC con sus actividades. El dominio N terminal no se encuentra dentro de la estructura cristalográfica. En verde se encuentran los aas. 54-73, en negro los aas. 114-130, que contienen al péptido GHK, y en amarillo los aas. 254-273. (B) Diagrama de cintas donde se puede observar que las secuencias aas. 54-73 (verde) y aas. 254-273 (amarillo), involucradas en la inhibición de la proliferación y desensamblado de adhesiones focales en células endoteliales y unión a PDGF y VEGF, se encuentran de la misma cara de la molécula, y los residuos involucrados en la unión de SPARC al colágeno (flechas celestes) se encuentran en la cara opuesta. Adaptado de Bradshaw *et al.* (Bradshaw *et al.*, 2001). Coordenadas cristalográficas obtenidas de Brookhaven Protein Database (<http://www.rcsb.org/pdb/>), número de acceso 1BMO, e interpretadas con el software Swiss-Pdb Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

## Homólogos de SPARC

Así como la proteína SPARC pertenece a una familia funcional de moléculas estructuralmente no relacionadas, las proteínas matricelulares, también hace lo propio como miembro de una familia de homólogos que se caracteriza por poseer los dominios FS y EC. Hasta la fecha se han identificado otros 4 miembros de la familia: (1) SC1, proteína identificada inicialmente en cerebro de rata (Johnston *et al.*, 1990), y su homóloga humana, hevina, aislada de endotelio columnar (Girard and Springer, 1995); (2) la proteína de retina de codorniz QR1 (Guermah *et al.*, 1991); (3) TSC36/FRP, proteína inducida por TGF- $\beta$  en células de glioma (Shibanuma *et al.*, 1993); y (4) testican/SPOCK, glicoproteína aislada de testículos humanos (Alliel *et al.*, 1993), cerebro murino y humano (Bonnet *et al.*, 1996; Marr *et al.*, 2000), y células endoteliales (Marr *et*

## Introducción General

*al.*, 1997). Mientras que todas las proteínas de la familia poseen gran homología en los dominios FS y EC, difieren considerablemente en el dominio ácido N-terminal (**Figura 5**) (Lane *et al.*, 1994). Las funciones de estas proteínas aún no se conocen, aunque hevína ha sido descrita como una proteína anti-adhesiva (Yang *et al.*, 2000) y anti-proliferativa, cuya expresión se encuentra disminuida en tumores (Claeskens *et al.*, 2000). QR1 y TSC36 han sido asociadas con inhibición del ciclo celular (Shibanuma *et al.*, 1993), y la expresión de QR1 ha sido asociada a la diferenciación de la retina neural (Casado *et al.*, 1996). La expresión de TSC36 ha sido asociada a procesos de cicatrización de heridas (Wankell *et al.*, 2001), se encuentra disminuida en tumores (Mashimo *et al.*, 1997), e inhibe el crecimiento y el fenotipo invasivo de células tumorales humanas (Johnston *et al.*, 2000). SC1 posee un 53% de homología con SPARC y es co-expresada junto con SPARC durante el desarrollo en cerebro y glándula adrenal (Soderling *et al.*, 1997), y en sistema nervioso central de ratones adultos (McKinnon and Margolskee, 1996). TSC36 y testican poseen dominios C-terminales adicionales (**Figura 5**). Tanto testican como una variante de *splicing* alternativo denominada N-Tes, que carece de los dominios C-terminales no homólogos a SPARC, han sido descritas como inhibidores de la activación de MMP-2 por MT1-MMP (Nakada *et al.*, 2001).



**Figura 5. Esquema estructural de los homólogos de SPARC.** (A) Representación lineal de la homología por dominio. (FS) dominio de tipo folistatina; (EC) dominio de unión a calcio extracelular; (TY) dominio de tipo tiroglobulina. Los números representan el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a SPARC. (B) Estructura de referencia para las comparaciones. Dominios de SPARC cristalizados graficados mediante el software Swiss-Pdb Viewer (FS: verde; EC: naranja). Adaptado de Yan *et al* (Yan and Sage, 1999) y Brekken *et al* (Brekken and Sage, 2000).

## Las moléculas que interactúan con SPARC

SPARC posee afinidad por cationes bivalentes, factores de crecimiento y componentes de la MEC (**Tabla 2**). SPARC es una proteína que une calcio con elevada afinidad, y tanto la estructura como la función de la proteína son moduladas por el  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión del calcio causa una disminución de helipticidad molar medida por espectroscopía de dicroísmo circular. Dicha unión provoca un cambio conformacional que reduce la

## Introducción General

susceptibilidad del dominio EC N-terminal frente a proteasas y altera la afinidad por el colágeno (Engel *et al.*, 1987; Maurer *et al.*, 1992; Pottgiesser *et al.*, 1994). SPARC también se une a  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  (Vernon and Sage, 1989). La secuencia de aminoácidos ubicada entre los residuos 113 y 130 posee elevada afinidad por el  $\text{Cu}^{2+}$  (Lane *et al.*, 1994), y péptidos conteniendo la secuencia KGHK (199-122) son capaces de regular la angiogénesis *in vitro* (Lane *et al.*, 1994) e *in vivo* (Iruela Arispe *et al.*, 1995).

Ligando	Tipo de molécula	Referencia bibliográfica
$\text{Ca}^{2+}$	Catión bivalente	(Maurer <i>et al.</i> , 1995; Maurer <i>et al.</i> , 1992)
$\text{Ca}^{2+}$	Catión bivalente	(Lane <i>et al.</i> , 1994)
$\text{Fe}^{2+}$	Catión bivalente	(Vernon and Sage, 1989)
PDGF	Factor de crecimiento	(Gohring <i>et al.</i> , 1998; Raines <i>et al.</i> , 1992)
VEGF	Factor de crecimiento	(Kupprion <i>et al.</i> , 1998)
Colágeno tipo I	Componente de la MEC	(Sasaki <i>et al.</i> , 1998; Termine <i>et al.</i> , 1981)
Colágeno tipo II	Componente de la MEC	(Sage <i>et al.</i> , 1989b)
Colágeno tipo III	Componente de la MEC	(Sage <i>et al.</i> , 1989b)
Colágeno tipo IV	Componente de la MEC	(Maurer <i>et al.</i> , 1995; Mayer <i>et al.</i> , 1991)
Colágeno tipo V	Componente de la MEC	(Sage <i>et al.</i> , 1989b)
Colágeno tipo VIII	Componente de la MEC	(Sage <i>et al.</i> , 1989b)
Vitronectina	Componente de la MEC	(Rosenblatt <i>et al.</i> , 1997)
Trombospondina-1	Componente de la MEC	(Cleazardin <i>et al.</i> , 1988)

**Tabla 2. SPARC y sus interacciones moleculares descriptas.** Adaptado de Yan *et al.* (Yan and Sage, 1999).

## SPARC y su relación con los factores de crecimiento

SPARC modula la actividad de al menos tres factores de crecimiento. SPARC murino es capaz de unirse a dímeros AB y BB de PDGF por interacción con la cadena B del PDGF. Esta interacción interfiere con la unión del PDGF a su receptor en fibroblastos e inhibe la proliferación de células de músculo liso estimulada por PDGF (Raines *et al.*, 1992). SPARC se une a la cadena B del PDGF mediante su dominio EC con elevada afinidad ( $K_d \sim 10^{-9}$  M), la cual no es modificada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Raines *et al.*, 1992). En un trabajo más reciente, Göhring *et al* demostraron que la cadena A de PDGF presentada en fase sólida sobre la superficie de un chip de biosensor es capaz de unirse a SPARC con una afinidad de  $5 \times 10^{-9}$  M (Gohring *et al.*, 1998). Recientemente se ha mostrado que SPARC es capaz de inhibir la proliferación de células de músculo liso aórtico inducida por PDGF AA, AB y BB (Motamed *et al.*, 2002). SPARC indujo el arresto del ciclo celular

## Introducción General

en una etapa tardía de la fase G1, inhibiendo la actividad de Cdk-2, los niveles de p107 y de ciclina A, y el nivel de fosforilación de pRb (Motamed *et al.*, 2002). El efecto antiproliferativo fue observado tanto con SPARC completa como con dos péptidos pertenecientes al dominio FS (aas 54-72) y al dominio EC (aas 254-273). Resulta interesante que ambos péptidos se encuentran espacialmente próximos en las estructuras obtenidas por difracción de rayos-x (Hohenester *et al.*, 1996) (ver **Figura 4B**).

SPARC y péptidos derivados del dominio EC (aas 254-273) y FS (aas 54-72) también se unen a VEGF, interfiriendo con la unión del VEGF a su receptor VEGF-R1 en células endoteliales, e inhibiendo la proliferación de dichas células (Kupprion *et al.*, 1998). SPARC es capaz de inhibir la fosforilación de VEGF-R1 inducida por VEGF, pero no es capaz de inhibir la activación de VEGF-R2 (Kupprion *et al.*, 1998). La unión de SPARC a VEGF se da a través de secuencias presentes en el dominio FS (Kupprion *et al.*, 1998).

SPARC y péptidos derivados del dominio EC (aas. 254-273) inhibieron la actividad de FGF-2 sobre células endoteliales aórticas bovinas (Hasselaar and Sage, 1992; Sage *et al.*, 1995). Tanto SPARC como péptidos derivados del dominio EC inhibieron la fosforilación de FGF-R1 y MAPK inducida por FGF-2 en células endoteliales humanas y en mioblastos a través de un mecanismo mediado parcialmente por PKA (Brekken and Sage, 2000; Motamed *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha podido demostrar aún la interacción de SPARC con FGF-2 (Hasselaar and Sage, 1992), sugiriendo que SPARC sería capaz de inhibir la fosforilación de FGF-R1 a través de un mecanismo que no depende de la interacción de SPARC con FGF-2.

TGF- $\beta$ 1 es capaz de regular la expresión de SPARC en fibroblastos (Wrana *et al.*, 1991a). Recientemente se ha reportado que SPARC es capaz de inducir la expresión de TGF- $\beta$ 1 en células mesangiales murinas *in vitro* y en un modelo de glomerulonefritis *in vivo* en ratas (Bassuk *et al.*, 2000; Francki *et al.*, 1999). Células mesangiales provenientes de ratones nulos para SPARC mostraron una disminución en el contenido de ARNm y proteína TGF- $\beta$ 1 respecto a células obtenidas de ratones normales. Además, el agregado de SPARC indujo la producción de TGF- $\beta$ 1 por las células provenientes de ratones nulos hasta niveles similares a los observados en células de ratones normales (Francki *et al.*, 1999). El agregado de SPARC recombinante a un modelo *in vivo* de injuria de células mesangiales en ratas indujo un aumento en el contenido de ARNm y de proteína TGF- $\beta$ 1 (Bassuk *et al.*, 2000). La regulación mutua entre SPARC y TGF- $\beta$ 1 sugiere la posible existencia de un ciclo de retroalimentación positiva en la expresión de ambas proteínas durante procesos de **fibrosis y cicatrización de heridas**.

## Introducción General

### Interacción de SPARC con otros componentes de la MEC

Como se mencionó en el apartado anterior, SPARC interacciona con el colágeno tipo I, II, III, IV, V y VIII. La interacción de SPARC con el colágeno tipo I resulta particularmente interesante, ya que en ratones *mov-13*, que poseen una mutación letal en el gen del colágeno  $\alpha 1(I)$ , la deposición de SPARC en la matriz extracelular se encuentra impedida (Iruela-Arispe *et al.*, 1996). Además, células derivadas de ratones nulos para SPARC mostraron una disminución en la producción de colágeno tipo I (Francki *et al.*, 1999). Sin embargo, el agregado de SPARC a cultivos de células de osteosarcoma MG-63 indujo una disminución en la producción de colágeno tipo I (Kamihagi *et al.*, 1994). La interacción de SPARC con colágeno tipo IV en presencia de calcio puede ser responsable de la acumulación de SPARC en las membranas basales y de la ruptura de las cápsulas de las lentes observada durante procesos de cataratas en ratones nulos para SPARC (Gilmour *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 1991; Nischt *et al.*, 1991).

SPARC también se une a la vitronectina, una proteína de la matriz extracelular abundante en la lámina basal de los vasos sanguíneos y en la piel, y asociada con la progresión tumoral (Schvartz *et al.*, 1999). La vitronectina colocaliza con SPARC *in vivo*, e interacciona mediante su región de unión a heparina con el dominio EC de SPARC (Rosenblatt *et al.*, 1997). También existen evidencias recientes de que SPARC sería capaz de interactuar con laminina-1 (Brekken *et al.*, 2003). SPARC también interacciona en forma específica con trombospondina-1 con una Kd  $\sim 0,8$  nM en forma dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$ , y forma complejos en los gránulos de las plaquetas (Cleardin *et al.*, 1988).

## SPARC y cáncer

### Aspectos que vinculan la progresión tumoral con la MEC

Como mencionamos anteriormente, la progresión del cáncer es el resultado de una interacción dinámica entre las células malignas y el estroma circundante, compuesto principalmente por fibroblastos, endotelio y células infiltrantes del sistema inmune. Los componentes del estroma tumoral funcionan como el suelo sobre el que crecerá y se diseminará la masa tumoral. Una vez más, el concepto de suelo puede interpretarse como una función pasiva restringida al sustento físico de las células malignas. No obstante, el estroma le provee a las células neoplásicas muchos de los factores necesarios para su crecimiento (Mueller and Fusenig, 2004). Tal es el caso de ciertos

## Introducción General

estudios donde se demuestra la contribución de fibroblastos derivados del tumor humano al establecimiento y la progresión del cáncer en transplantes xenogénicos en ratones (Mueller and Fusenig, 2004; Tuxhorn *et al.*, 2002). Estos y otros resultados mencionados anteriormente reafirman de manera clara el rol central que cumple la MEC en la progresión tumoral.

Durante los últimos años, el papel que cumplen las proteínas de la MEC, secretadas por las células tumorales y por las del estroma, fueron tomando mayor importancia en relación al rol que tendrían durante el crecimiento, invasión y diseminación del tumor (Murphy-Ullrich, 2001). Como ya hemos visto, uno de los componentes transientes de la MEC es SPARC. También mencionamos que SPARC está funcionalmente asociada con una familia de proteínas antiadhesivas que pueden desarmar contactos de adhesión focal para promover un estado de adhesión intermedia (Yan and Sage, 1999).

SPARC es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. Además, fue descrito que SPARC se une a distintos factores de crecimiento o interactúa con su cascada de señalización en los casos del VEGF, PDGF y el bFGF, sugiriendo que podría jugar un importante rol en la vasculogénesis (Yan and Sage, 1999). También fue descrito que SPARC regula la expresión y actividad de MMP en células normales y tumorales, sugiriendo un rol activo en la progresión y agresividad tumoral (Lane and Sage, 1994; Ledda *et al.*, 1997a; Yan and Sage, 1999). Más aún, varios estudios, incluyendo el análisis de expresión mediante la tecnología de microarreglos, indican que la hiperexpresión de SPARC se encuentra asociada con el incremento en la agresividad de diferentes tipos de cánceres, tales como el melanoma (Ledda *et al.*, 1997b), el glioblastoma y el meningioma (Rempel *et al.*, 1999), el cáncer de mama (Bellahcene and Castronovo, 1995; Briggs *et al.*, 2002; Gilles *et al.*, 1998), el cáncer de colon (Porter *et al.*, 1995; Van Beijnum *et al.*, 2002), el cáncer de páncreas (Sato *et al.*, 2003), el mieloma (De Vos *et al.*, 2002) y el cáncer de próstata (Thomas *et al.*, 2000), entre otros. En otros casos, como en varios adenocarcinomas, SPARC se encuentra ausente o muy levemente expresada en las células malignas, sin embargo, su expresión en los fibroblastos del estroma del cáncer de pulmón y el carcinoma de colon también correlacionan con un mal pronóstico (Framson and Sage, 2004; Koukourakis *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 2003).

Debido a su capacidad antiadhesiva, se ha propuesto que el rol de SPARC reside en promover el desensamblado de las células malignas de la MEC, promoviendo la migración y diseminación de las mismas hacia los tejidos circundantes (Ledda *et al.*, 1997a; Rempel *et al.*, 2001). Coincidentemente, SPARC fue considerada promotora de la migración e invasión del melanoma y el glioblastoma (Golembieski *et al.*, 1999; Ledda *et*

## Introducción General

*al.*, 1997a; Rempel *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 1998). Más aún, SPARC fue encontrada como factor quimiotáctico para células de cáncer de próstata, sugiriendo un rol importante en la metástasis de hueso (Thomas *et al.*, 2000). Más recientemente, SPARC fue identificada como una de las proteínas que le confiere a las células de cáncer de mama la propiedad de metastatizar en pulmón (Minn *et al.*, 2005). Sumado a eso, SPARC no sólo controlaría el crecimiento tumoral promoviendo la migración y la metástasis, dado que estudios de nuestro grupo demostraron que la proteína es capaz de modular la capacidad del sistema inmune innato (específicamente de los polimorfonucleares) de eliminar células de melanoma en estudios *in vitro* (Alvarez *et al.*, 2005). Mientras las evidencias anteriormente descritas sugieren un rol protumorigénico de SPARC, en otros tipos de tumores humanos los datos muestran que SPARC esta asociada con efectos inhibitorios de la proliferación celular (Framson and Sage, 2004; Motamed, 1999; Yan and Sage, 1999). El mecanismo mediante el cual SPARC retrasa la entrada en la fase S de ciclo celular ha sido parcialmente develado. De hecho, SPARC modula negativamente la señal de varios factores de crecimiento incluyendo bFGF, VEGF, IGF, PDGF e inhibe la activación de MAPK y ciclinas CDKs (Framson and Sage, 2004; Kupprion *et al.*, 1998).

Contrariamente a las evidencias reportadas en la mayoría de los canceres humanos, la expresión de SPARC fue también asociada con un buen pronóstico en neuroblastoma humano (Chlenski *et al.*, 2002). SPARC producida por las células de Schwann estaría inhibiendo la angiogénesis, y con ello, limitaría el crecimiento de las células malignas (Yang *et al.*, 2004). Por otra parte, en un modelo de cáncer de ovario de ratones knockout para SPARC se observó una disminución en la tasa de sobrevivida, sumado a una importante diseminación peritoneal del tumor (Said and Motamed, 2005). Otros demostraron que SPARC exógena inhibe el crecimiento *in vitro* de algunas líneas celulares humanas de páncreas (Puolakkainen *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2003). Más aún, los efectos de SPARC en cáncer de mama también muestran una aparente controversia. Datos recientemente publicados demostraron que la expresión ectópica de SPARC en las células de cáncer de mama MDA-MB231 inhibió la capacidad de metastatizar en diferentes órganos incluyendo hueso y pulmones (Koblinski *et al.*, 2005). Además, la re-expresión de SPARC en células de cáncer de colon las sensibilizó a drogas pro-apoptóticas, sugiriendo que niveles reducidos de SPARC podrían promover resistencia a la apoptosis (Tai *et al.*, 2005).

Las evidencias anteriormente mencionadas plantean una clara controversia. Esto indicaría que los efectos de SPARC en el cáncer podrían ser dependientes del tipo de tumor. Una complejidad adicional para comprender el rol de SPARC en la progresión del cáncer obedece al hecho de que la proteína es producida no sólo por las células

## Introducción General

malignas, sino también por los fibroblastos y las células circundantes. Hasta el momento de comenzar este trabajo de tesis no se sabía o, mejor dicho, era poco claro si SPARC producida por distintos componentes de la masa tumoral podrían tener diferentes roles en el crecimiento tumoral. De hecho, publicaciones recientes que abordaron el tema del rol de SPARC derivado del hospedador utilizando ratones nulos para el gen SPARC llevaron a resultados contrapuestos. Uno de los grupos mostró en su trabajo que existe una exacerbación del crecimiento de tumores tales como carcinoma de pulmón y linfoma de células T (LLC y EL4 respectivamente) (Brekken *et al.*, 2003), mientras que el otro grupo muestra un crecimiento impedido del carcinoma primario de mama (N1G, N2C y N3D) en ratones inmunodeficientes (Sangaletti *et al.*, 2003). A pesar de la discrepancia, ambos grupos sustentan sus resultados en que el rol principal de SPARC se encuentra asociado con el ensamblado y la densidad de la MEC.

Por todo lo dicho hasta el momento podemos concluir que si bien existen numerosas funciones descritas para la proteína SPARC, el o los mecanismos moleculares que justifican dichas funciones, especialmente en el desarrollo tumoral, son todavía confusas.

## Potenciales mediadores del efecto de SPARC: El modelo de *Drosophila melanogaster*

Al momento de definir los objetivos de esta tesis hacían falta nuevas estrategias<sup>8</sup> experimentales para esclarecer la vía molecular de acción de SPARC. Con el objeto de abordar desde un nuevo ángulo la pregunta de **cuales serían los mediadores del efecto de SPARC** decidimos inclinarnos hacia modelos biológicos “**más simples**” (respecto del número de componentes) y “**ricos**” (respecto de las herramientas genéticas y moleculares disponibles) como es el caso de la mosca del vinagre o *Drosophila melanogaster*. En las siguientes secciones resumiré los supuestos y evidencias que nos llevaron a buscar intermediarios moleculares de la acción de SPARC en el modelo de *Drosophila melanogaster*.

<sup>8</sup> Si bien hasta el momento no se explicitaron los objetivos generales y específicos del proyecto de tesis, consideré necesario hacer un paréntesis en el contexto de la introducción, para justificar la aparición del modelo biológico de *Drosophila melanogaster* en el estudio de los mediadores del efecto fisiológica de la proteína SPARC.

## Introducción General

### Evolución de la adhesión celular

Como ya hemos comentado, los organismos multicelulares requieren de mecanismos especializados para la **comunicación** y, mucho más básicamente, para la **cohesión** intercelular. Las esponjas y los corales más primitivos dependen de la adhesión de sus células para la organización funcional del individuo como un todo. Esta afirmación es igualmente aplicable a insectos, nematodos e incluso a nosotros, los vertebrados.

Muchas secuencias genómicas de diferentes organismos se encuentran hoy disponibles, planteando la posibilidad de abordar este estudio mediante el uso de modelos de organismos inferiores. Dos de los invertebrados más estudiados en este aspecto son la mosca del vinagre y el gusano *C. elegans* (Adams *et al.*, 2000; Consortium and Sequencing, 1998). En el caso de *Drosophila*, se sabe que cerca de 500 genes (aproximadamente un 4 % del genoma) se encuentran implicados en procesos de adhesión, ya sea en las uniones célula-célula, como en las uniones célula-matriz.

Del primer tipo de uniones, las cadherinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas se encuentran bien representadas en *Drosophila* (Hynes and Zhao, 2000). Mediante la búsqueda de dominios citoplasmáticos fue posible encontrar tres clases de cadherinas con sitios de unión a cateninas (DE-cadherinas, DN-cadherinas clásicas y un nuevo grupo de DN-cadherinas); en total unos 17 miembros (Hynes and Zhao, 2000). Por su parte, la superfamilia de inmunoglobulinas también se encuentra bien representada en estos invertebrados; con unos 150 miembros en *Drosophila* y 70 miembros en *C. elegance*.

Al analizar las proteínas involucradas en la adhesión célula-matriz se observa que estas están igualmente conservadas que los componentes asociados a las uniones intercelulares. No obstante, el dato más llamativo es que los celenterados tienen membranas basales tan complejas como los animales superiores. El colágeno tipo IV, la laminina, la entactina y los proteoglicanos del tipo perlecanos están presentes y con una altísima homología. Si bien estos compuestos forman solo la base de la que está compuesta esta membrana basal “temprana”, evolutivamente hablando, también existen ciertos detalles que se encuentran bien preservados aún desde los inicios. A lo largo de los tres phyla podemos encontrar los tipos de colágeno XV/XVII, las netrinas, la anosmina e incluso SPARC. Todas estas moléculas fueron identificadas originalmente en vertebrados (de Castro, 2003; Pihlajaniemi and Rehn, 1995), pero su alta conservación en gusanos y moscas hace pensar que éstas cumplen funciones fundamentales en dichos organismos (Hutter *et al.*, 2000; Hynes and Zhao, 2000). Quizás el dato más importante sale a la luz cuando se analiza la presencia de los receptores de la matriz extracelular. Los

## Introducción General

heterodímeros  $\alpha\beta$ -integrinas, encargados de unir a la matriz con el citoesqueleto celular también se encuentran presentes en las esponjas, los corales, los nematodos, los equinodermos y los mamíferos (Burke, 1999; Hynes, 1992). No obstante, existe una gran diferencia en el número de moléculas que conforman la familia de receptores.

*Drosophila* solo cuenta con 5 subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  (Gotwals *et al.*, 1994) en comparación a las 18 subunidades  $\alpha$  y las 8 subunidades  $\beta$  de mamíferos (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Pero no solo se encuentran diferencias en las integrinas. Los componentes ausentes en la matriz de *Drosophila melanogaster* son el colágeno fibrilar, la fibronectina, la vitronectina, la elastina, las fibulinas, la osteopontina, el factor de von Willebrand, las tenascinas y el fibrinógeno. En algunos casos no se encuentran las moléculas completas pero si dominios característicos como por ejemplo los dominios Fn3 (un tipo de dominio de la fibronectina) y los dominios vWF-C y D (dos tipos de dominios del factor de von Willebrand) (Hynes and Zhao, 2000). Teniendo en cuenta que SPARC no solo esta presente sino que además conserva un alto porcentaje de homología pensamos que estas características convertirían a la mosca en un atractivo modelo, muy simplificado, para la búsqueda de moléculas receptoras o mediadores moleculares de SPARC.

## Un nuevo modelo para el estudio de SPARC

Parte de lo que hoy sabemos de la proteína SPARC no ha sido dilucidado a partir de células, tejidos o muestras humanas, sino a través de organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Bos taurus* y *Mus musculus*. Especialmente durante la última década, estos modelos biológicos han servido para estudiar la hiperexpresión de SPARC, la expresión ectópica, la regulación negativa del ARNm y la pérdida de función del gen (Bradshaw and Sage, 2001; Damjanovski *et al.*, 1997; Fitzgerald and Schwarzbauer, 1998). Como producto de dichos trabajos se ha establecido que SPARC está involucrada en diversas funciones biológicas relacionadas con la adhesión, la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Pero, ¿cuáles son los mecanismos moleculares liderados por SPARC? Sin duda, la respuesta a este interrogante podría llevarnos a la comprensión de procesos biológicos tan importantes como la cicatrización de heridas, el desarrollo de ciertos tejidos e incluso la progresión tumoral. Por dicha razón, nuestro laboratorio viene hace muchos años estudiando, mediante diversas aproximaciones experimentales, los mecanismos moleculares de acción de esta glicoproteína de matriz. Como parte del desarrollo de herramientas necesarias para el trabajo experimental, se clonó en un vector apropiado el ADNc completo de SPARC humano para producir la proteína recombinante en células S3 de

## Introducción General

*Drosophila melanogaster*<sup>9</sup>. Durante el proceso de producción observamos que las células de mosca que expresaban SPARC mostraban una adherencia reducida al sustrato, sugiriendo que al menos la función anti-adhesiva de SPARC se encontraba conservada entre humanos e insectos. Este descubrimiento, como veremos en la sección de resultados, marcaría un punto de inflexión en el desarrollo de este trabajo.

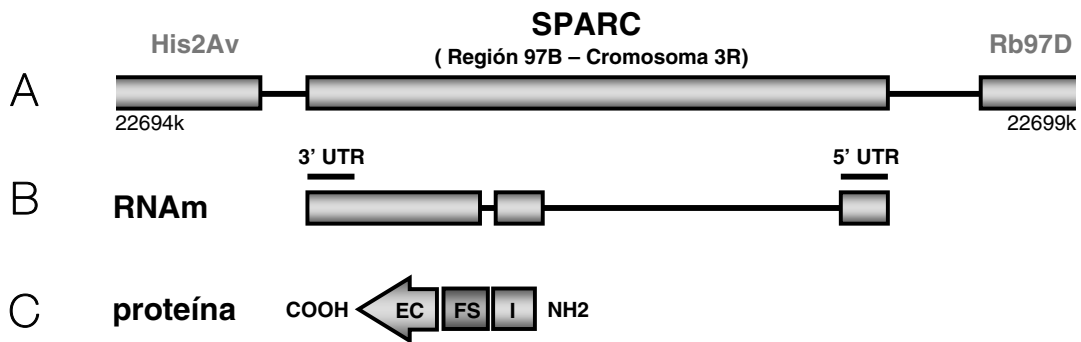
### SPARC en *Drosophila melanogaster*

El genoma de *Drosophila* codifica un ortólogo de SPARC de vertebrados involucrado en el desarrollo del mesodermo (Furlong *et al.*, 2001). El locus de SPARC mapea en la región 97D5 del brazo derecho del cromosoma 3. La secuencia de la proteína y del ARN mensajero se conocen desde 1999 (Drysdale and Crosby, 2005) (**Figura 6**). Existe en la literatura solo un trabajo donde se realiza un estudio meramente descriptivo de la localización de SPARC en *Drosophila melanogaster*. Por hibridización *in situ* de embriones enteros se demostró que SPARC se expresa en hemocitos y cuerpo graso durante la embriogénesis tardía (Martinek *et al.*, 2002). Al igual que en los vertebrados, SPARC de *Drosophila* se encuentra asociada a la lámina basal, rodeando los órganos internos desde los comienzos del desarrollo (Martinek *et al.*, 2002). En larvas del segundo y tercer estadio se detecta ARNm en los discos imaginales, cerebro, cordón nervioso ventral y cuerpo graso. En adultos se realizaron estudios en ovariolas aisladas, en los que se encontró expresión de ARNm de SPARC en células somáticas de folículos previtelogénicos (estadios 1 a 6), y también de folículos más avanzados (a partir del estadio 9). La proteína resultante se acumula en la lámina basal adyacente a la superficie basal de las células foliculares que la sintetizan (Martinek *et al.*, 2002). Hasta el momento se desconoce el patrón de expresión en otros tejidos del adulto.

Respecto de los homólogos de SPARC en mosca, se ha reportado que Testican (CG2264 (Drysdale and Crosby, 2005)) es el único homólogo de la familia de SPARC que se encuentra en *Drosophila* (Hynes and Zhao, 2000). Como ya se ha mencionado, la identidad entre SPARC de *Drosophila* y SPARC de vertebrados es de un 30-32 %, dependiendo del algoritmo con el que se la compare (ver **Tabla 1**). Analizando más en profundidad, podemos decir que dicho porcentaje de identidad no se está distribuido azarosamente a lo largo de la molécula sino que, muy por el contrario, los aminoácidos fundamentales para el mantenimiento de la estructura y función de la proteína se encuentran perfectamente conservados.

<sup>9</sup> *Drosophila melanogaster* será la única especie de mosca utilizada en este trabajo de tesis. Por dicha razón, cuando en el texto se mencione el género *Drosophila* será en referencia directa a la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*).

## Introducción General



**Figura 6. El gen de SPARC en *Drosophila melanogaster*.** (A) Esquema de la región 97B del brazo derecho del cromosoma 3 de *Drosophila*. Flanqueando el gen SPARC se encuentran los genes His2Av y Rb97D. (B) El transcrito de SPARC tiene un largo de 2784 pb. Estructuralmente está formado por tres exones (cajas grises) de 90, 179 y 898 pb, separados por dos intrones (línea negra entre cajas) de 1552 y 61 pb. La secuencia traducida incluye el 2<sup>o</sup> y parte del 3<sup>er</sup> exón. (C) La proteína resultante tiene 304 aminoácidos. Se representan los tres módulos característicos. 5'UTR y 3'UTR: regiones no traducidas hacia los extremos 5' y 3' del ARNm. NH2: extremo amino terminal. COOH: extremo carboxilo terminal. I: Módulo I (uno). FS: Módulo similar a folistatina. EC: Módulo de unión a calcio extracelular.

Por lo dicho, no sorprende que la organización modular de SPARC se mantenga presente en los distintos grupos filogenéticos. Si comparamos la proteína de *Drosophila* con la de vertebrados, notamos que: (a) La porción menos conservada de la molécula es el **módulo I**, que en la mosca es más largo, mantiene la presencia de los 20 residuos acídicos característicos y carece de la secuencia blanco de transglutaminasas; (b) El **módulo II** conserva 11 de las 14 cisteínas de vertebrados, además de dos cisteínas conservadas entre las proteínas de invertebrados y carece del pentapéptido KKGHK implicado en la angiogénesis; (c) La conservación más alta se da dentro del **módulo III**, a tal punto que puede postularse la presencia de las dos manos de tipo EF como una característica conservada de SPARC, reflejando una función común a lo largo de los diferentes phila (Martinek *et al.*, 2002).

Además del estudio meramente descriptivo de Martinek *et al* existen al menos dos trabajos en donde SPARC fue identificada como gen de expresión diferencial, en estudios de genómica, utilizando el modelo de *Drosophila*. En el primero de los trabajos, SPARC fue vinculada al desarrollo del mesodermo (Furlong *et al.*, 2001). Mutantes del gene Twist (un factor de transcripción del tipo bHLH) involucrado en múltiples pasos del desarrollo del mesodermo producen una disminución de SPARC (citada en el trabajo como CG6378). Asimismo, la ganancia de función del receptor transmembrana Toll (gen de efecto materno que se ubica río arriba de la señalización generada por *twist*) produce un importante aumento de SPARC en estadios tardíos del desarrollo (Furlong *et al.*, 2001). Años más tarde, Butler *et al* describieron el patrón de expresión de genes involucrados en el desarrollo del disco imaginal de ala (Butler *et al.*, 2003). En dicho

## Introducción General

trabajo, el mensajero de SPARC fue encontrado aumentado en los mioblastos de la región dorsal del disco (*body wall*). Ambos trabajos confluyen en la idea de que SPARC estaría relacionada con el desarrollo del mesodermo de *Drosophila*, posiblemente como parte de una vía de señalización en la que *dorsal* (NF  $\kappa$ B en mamíferos), *snail* y *twist* (bHLH) formen parte de manera activa.

# Objetivos

## Objetivo general de la tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis fue profundizar el conocimiento sobre el rol de la proteína de matriz extracelular, SPARC, en el establecimiento y desarrollo del proceso neoplásico, en especial del melanoma humano. Abordamos esta pregunta mediante diferentes estrategias: (a) estudiar como la proteína SPARC afecta el comportamiento de células tumorales *in vitro*; (b) utilizando un modelo de desarrollo de tumores en ratones *nude*, como los cambios en los niveles de expresión de SPARC en células de melanoma humano o del estroma tumoral, modifican la arquitectura tumoral *in vivo* y (c) utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo, estudiar como la modificación de los niveles de expresión de SPARC altera la expresión de genes que pudieran ser mediadores del efecto molecular de nuestra proteína de estudio.

## Objetivos específicos

### SPARC y estroma tumoral

A los efectos de estudiar el efecto *in vitro* e *in vivo* de SPARC sobre las células tumorales y su estroma circundante seguimos la siguiente secuencia de objetivos específicos:

- Purificar SPARC humana a partir de células de melanoma
- Estudiar las características fisicoquímicas de SPARC producida por melanomas humanos y compararla con distintas construcciones de SPARC recombinante producidas en el laboratorio
- Estudiar el efecto de SPARC en la proliferación de células estromales y tumorales
- Construir los adenovectores portadores del mensajero antisentido y sentido de SPARC para modificar su expresión en las células tumorales y estromales

## Objetivos generales y específicos

- Determinar la participación de los PMN en el rechazo inducido por la disminución transiente de SPARC en células de melanoma humano
- Estudiar el efecto *in vivo* e *in vitro* de la modulación de los niveles SPARC en el crecimiento de melanomas humanos
- Determinar si el efecto de la hiperexpresión de SPARC sobre el desarrollo tumoral es dependiente de la célula productora (tumor o estroma) de dicha proteína

## Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

El uso de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico nos permitió abordar la búsqueda de moléculas intermediarias del efecto de SPARC siguiendo la siguiente secuencia de objetivos específicos:

- Construir una mosca transgénica que permita evaluar el efecto biológico de la ganancia de función de SPARC en el modelo de *Drosophila*
- Estudiar el efecto de la hiperexpresión de SPARC en *Drosophila* durante los movimientos morfogénicos asociados a funciones biológicas que recapitulan el desarrollo tumoral en mamíferos, como la migración, la adhesión, el cambio de forma celular y la proliferación
- Mediante la utilización de microarreglos de ADN, estudiar el transcriptoma derivado de la ganancia de función de SPARC, en el modelo de cierre dorsal de *Drosophila* con el fin de identificar uno o más componentes de la vía de señalización de SPARC

## Resultados (Capítulo I)

### Estudio bioquímico de SPARC nativa<sup>10</sup>, purificada de melanoma humano, y sus formas recombinantes

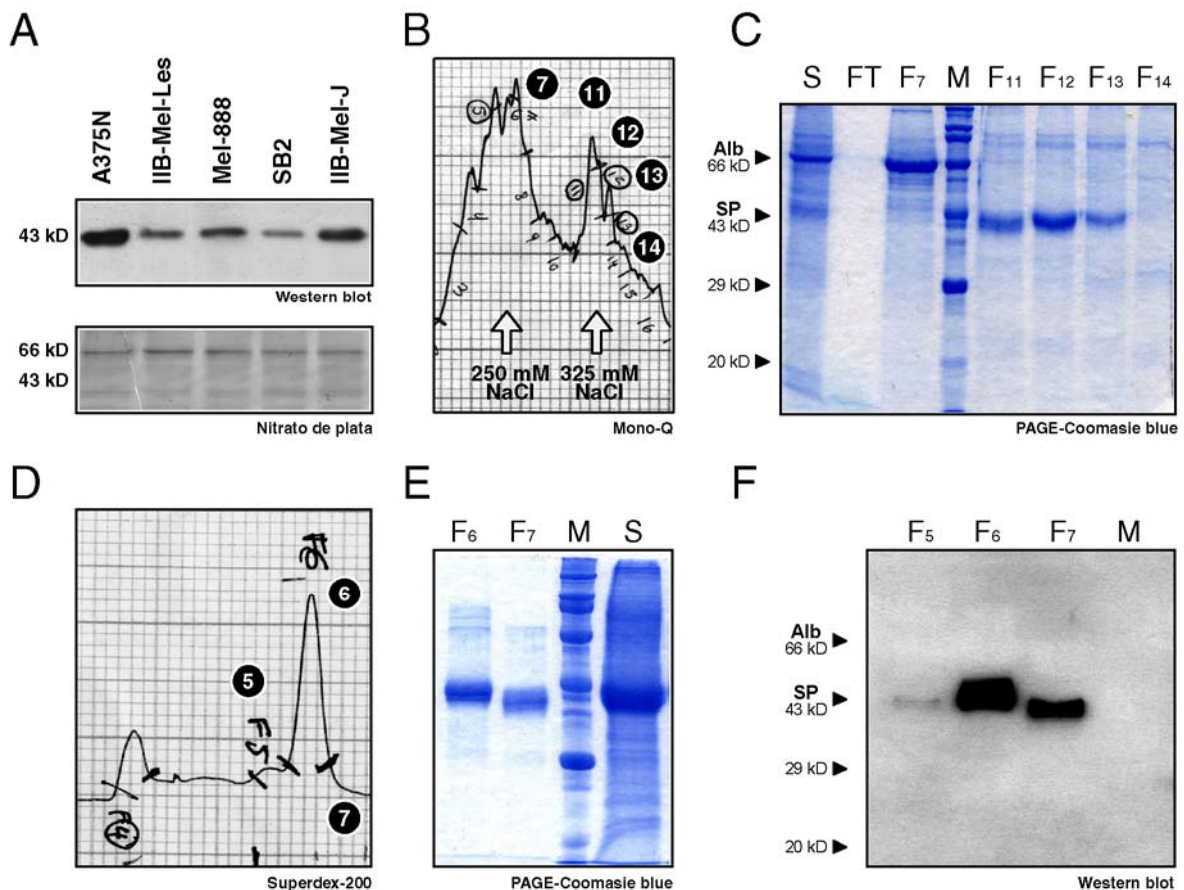
#### Purificación de SPARC nativa de melanoma humano

Dado que uno de los objetivos del proyecto era estudiar el rol de SPARC sobre la proliferación de células malignas y normales, definimos como una de las primeras metas la realización de un estudio detallado de las propiedades biofísicas de la proteína SPARC. El objetivo fue establecer si la molécula producida por el melanoma humano (hSPARC) difiere en una o más propiedades respecto de las anteriormente descritas en la literatura (Bassuk *et al.*, 1996b; Bradshaw *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 1987). Para ello, en una primera instancia pusimos a punto exitosamente la purificación de la proteína a partir de medio condicionado de células de melanoma humano crecidas en monocapa. Se estudiaron diferentes líneas de melanoma humano en busca de aquellas que poseyeran un mayor nivel de expresión. Dentro de las líneas evaluadas (IIB-Mel-LES; IIB-Mel-J; Mel-888; A375N y SB2) encontramos que las células A375N constituían una muy buena fuente de SPARC secretada al medio extracelular (**Figura 7A**). Los pasos para la purificación fueron diseñados con la idea de lograr un máximo rendimiento y un alto grado de pureza, poniendo énfasis en la eliminación de su más importante contaminante, la seroalbúmina bovina (BSA), proveniente del suero con el que se suplementa el medio de cultivo. La preparación consta de tres pasos bien definidos: (a) concentración del medio condicionado por ultrafiltración y diálisis del concentrado, (b) purificación por punto isoelectrico (Mono Q) (**Figura 7B y C**) y (c) un segundo paso de purificación por tamiz molecular (Superdex-200) (**Figura 7D-F**). El grado de pureza obtenido luego de esta metodología fue cercano al 95 % y el rendimiento final alcanzado rondó el miligramo de hSPARC por litro de medio condicionado de la línea A375N. Si bien en el Western blot de la figura 7A la proteína aparece como una única banda, al realizar la separación por el

<sup>10</sup> En esta trabajo de tesis llamaremos **proteína nativa** a la proteína producida naturalmente por las células de melanoma humano, en contraposición a aquella producida por la metodología del ADN recombinante (en el sistema de células de *Drosophila*) o mediante herramientas de terapia génica (como es el caso de los adenovectores).

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

tamiz molecular se evidencia al menos una variante de menor peso. Este dato, anteriormente reportado por nuestro laboratorio (Ledda *et al.*, 1997b), fue confirmado al observar varias isoformas secretadas mediante geles bidimensionales, con variaciones de pI y de PM (Sosa *et al.*, 2007). La masa total de proteína sembrada y las condiciones en las que se realiza el condicionamiento parecerían ser cruciales para evidenciar dichas isoformas a través de un Western blot. Hasta el momento se desconoce la relevancia biológica que pudieran tener dichas isoformas.



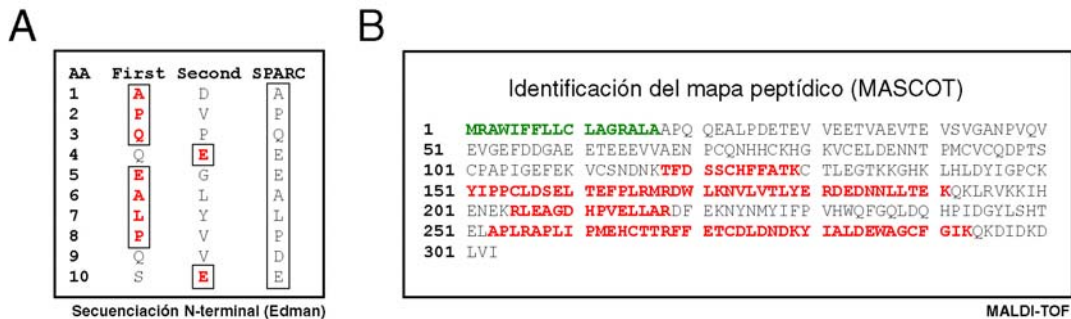
**Figura 7. Purificación de SPARC nativa de melanoma humano.** (A) Western blot de medio condicionado (2  $\mu$ g) de distintas líneas de melanoma humano con su respectivo control de carga (SDS-PAGE teñido con plata). (B) Perfil cromatográfico del primer paso de purificación (columna de intercambio iónico; Mono-Q) de la proteína SPARC a partir de medio condicionado de la línea A375N. (C) SDS-PAGE teñido con Coomassie blue de las fracciones de la Mono-Q indicadas. (D) Perfil cromatográfico del tamiz molecular (Superdex-200) utilizando la F12 como siembra. (E) Fracciones colectadas de la Superdex-200, corridas en un SDS-PAGE y teñidas con Coomassie blue. (F) Western blot como control de identidad proteica. Para los SDS-PAGE's se sembraron 20  $\mu$ l de cada fracción. S: siembra; FT: flujo a través de la columna; F#: número de fracción sembrada; M: marcador de peso molecular; SP: SPARC; Alb: seroalbúmina bovina.

### Identidad de la proteína nativa purificada

Seguidamente, procedimos a confirmar la identidad de la variante purificada realizando estudios de microsecuenciación del extremo N-terminal por el método de Edman (Figura 8A) y espectrometría de masa (MALDI-TOF) (Figura 8B). Con la ayuda de dichas

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

técnicas demostramos que la forma de SPARC humana purificada (43 kD) poseía el extremo N-terminal intacto y una huella peptídica correspondiente a la secuencia de SPARC humana ingresada en el banco de datos del NCBI.



**Figura 8. Identidad de la SPARC nativa de melanoma humano purificada. (A)** Secuenciación de extremo N-terminal (10 aa) de la proteína purificada mediante la técnica de Edman y su comparación con la secuencia publicada en el Entrez-Protein. *First* y *Second* representan la primer y segunda opción para cada uno de los 10 primeros aminoácidos. En rojo se muestran los aa que dan identidad con la secuencia consenso de SPARC. **(B)** Identificación de la huella peptídica mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF) utilizando el software MASCOT. En rojo se muestran los péptidos identificados y en verde el péptido señal.

Dado que nuestro objetivo consistía en el estudio fisicoquímico de la proteína nativa de melanoma seguimos adelante con la caracterización y validación estructural de la molécula purificada para realizar, a posteriori, los estudios funcionales planteados en la sección de objetivos.

### La estructura de SPARC nativa, estudiada mediante métodos biofísicos, es semejante a la de sus formas recombinantes

Realizar una comparación estructural de SPARC nativa de melanoma humano era uno de los objetivos propuestos para este trabajo de tesis. En nuestro caso, no sólo comparamos los parámetros analizados de la proteína nativa de melanoma con datos bibliográficos de otros grupos de investigación sino que, además, lo hicimos contra moléculas recombinantes producidas en nuestro laboratorio. La Dra. Andrea Llera diseñó y produjo una serie de proteínas recombinantes utilizando el sistema de células SL-3 de mosca (López Haber *et al.*, 2007).

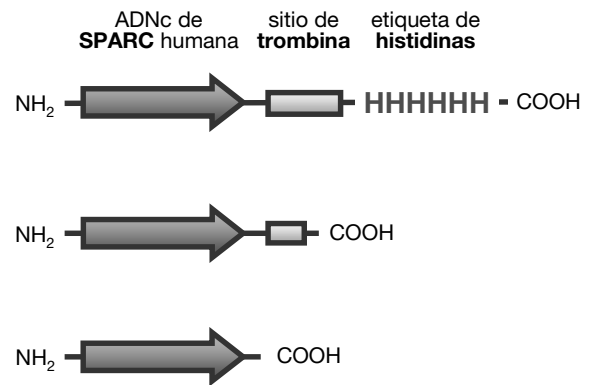
Estas nuevas herramientas fueron utilizadas en los ensayos estructurales y funcionales que mostraremos a continuación. El principal objetivo de dichos ensayos fue validar ambas fuentes de SPARC (nativa y recombinante) frente a lo anteriormente publicado.

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

**Whsi-His** → ADNc de SPARC completo con el agregado de una etiqueta de histidina precedido por un sitio de clivaje de trombina (purificación por columna de afinidad)

**Whsi** → Es la proteína Whsi-His clivada con trombina y repurificada para obtenerla sin etiqueta de histidina

**Whno** → ADNc de SPARC humano (purificación por punto isoelectrico y peso molecular)



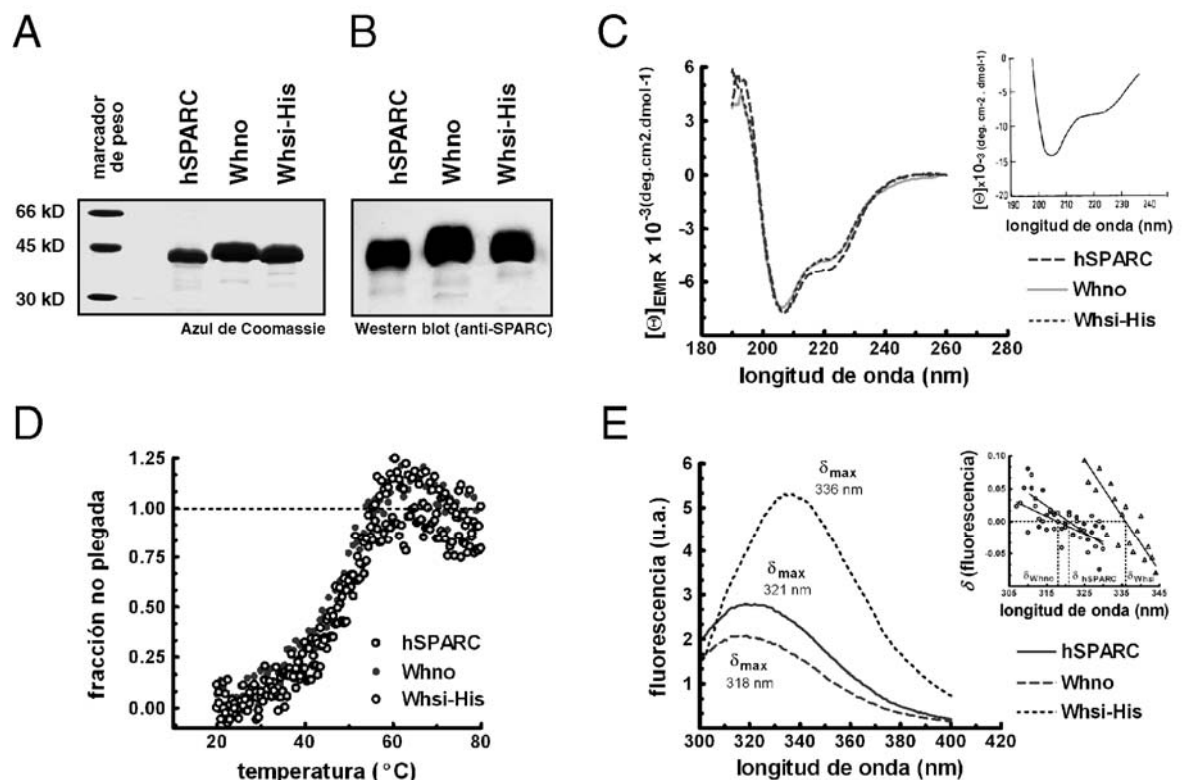
Concretamente, las estructuras secundaria y terciaria de SPARC nativa y sus formas recombinantes purificadas fueron evaluadas mediante las técnicas de **dicroísmo circular** y fluorescencia (**Figura 9**). Al comparar los perfiles de **dicroísmo circular** de la proteína de melanoma con las formas recombinantes encontramos que los mismos eran idénticos, indicando que la **estructura secundaria** de SPARC se mantiene inalterada en ambas fuentes (**Figura 9C**). Al mismo tiempo, pudimos concluir que la etiqueta de histidina no interfirió en el correcto plegamiento de la estructura secundaria de la proteína recombinante. Estos perfiles de dicroísmo circular coincidieron en gran medida con aquellos publicados en la literatura y provenientes de diversas fuentes naturales o recombinantes de SPARC (Bassuk *et al.*, 1996a; Bradshaw *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 1987) (**Figura 9C inset**). Además, como se observa claramente, estos perfiles corresponden sólo en parte a estructuras secundarias ricas en alfa hélices o láminas beta. No obstante, lejos de asociarse con los perfiles de proteínas desnaturalizadas, estos dicroísmos ponen en evidencia un tipo particular de estructura emparentada con las **proteínas nativamente desplegadas** o *natively unfolded proteins* (Uversky, 2002b). SPARC fue descrita como miembro de esta familia (Uversky, 2002b) y, coincidentemente con ello, su dicroísmo circular se asemeja en gran medida al de las proteínas nativamente desplegadas (**Figura 9C e inset**) (Uversky, 2002a).

Continuando con el análisis, decidimos estudiar la **estabilidad térmica**, un parámetro usualmente utilizado para relacionar o emparentar distintas estructuras, pues plegamientos secundarios similares conllevan a perfiles de **termodesnaturalización** o estabilidades térmicas semejantes (partiendo, claro está, de estructuras primarias idénticas). En la termodesnaturalización pudimos observar que tanto hSPARC como las formas recombinantes presentaron un perfil prácticamente idéntico (**Figura 9D**). Este análisis se realizó tomando como parámetro la elipticidad molar (medida a 220 nm) para cada punto de temperatura. El valor de elipticidad molar obtenido a 95 °C es considerado

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

como 100 % de proteína desplegada. Con este resultado validamos una vez más la estructura secundaria de ambas fuentes de SPARC.

La **fluorescencia** es uno de los parámetros más utilizados para el estudio de la **estructura terciaria** en proteínas que poseen triptofanos en su secuencia aminoacídica. SPARC secretada posee tres triptofanos. Lo que se evaluó con este método es si el centro de masa de la proteína es afectado o, dicho de otra manera, si se produce un corrimiento del centro de masa respecto de los triptofanos presentes en la molécula. Si bien un cambio de amplitud en la señal no tiene grandes implicancias en el análisis del resultado (generalmente atribuido a ligeras diferencias en la concentración de la muestra), los corrimientos de los máximos de fluorescencia son muy sensibles a las modificaciones en la estructura terciaria. Al analizar la fluorescencia de las distintas variantes de SPARC observamos que hSPARC y Whno poseen máximos muy similares, 321 y 318 nm respectivamente (Figura 9E).



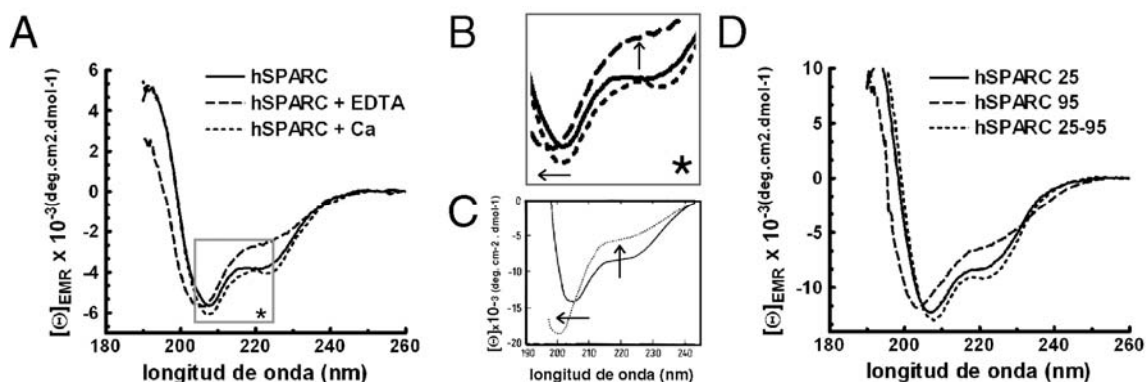
**Figura 9. Análisis estructural de la proteína nativa de melanoma y sus formas recombinantes.** (A) El SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie muestra la homogeneidad de las proteínas preparadas a partir del melanoma humano A375N (hSPARC) y las proteínas recombinantes, producidas en células de insecto. Whno (SPARC humana completa sin etiqueta de histidina) y Whsi (SPARC completa con etiqueta de histidina y sitio de clivaje para trombina). (B) Western blot de las mismas proteínas revelado con un anti-SPARC. (C) El espectro de dicroísmo circular de las moléculas muestra que la estructura secundaria de los diferentes tipos de fuentes y preparaciones son iguales. El inset muestra un espectro de dicroísmo circular a partir de SPARC murina purificada (adaptado de Mayer *et al* (Mayer *et al.*, 1991)), idéntico al producido por nuestras fuentes de

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

SPARC. **(D)** El perfil de pérdida de estructura secundaria (medida como porcentaje de elipticidad molar por residuo a 220 nm) en función de la temperatura muestra un comportamiento similar para todas las formas de SPARC analizadas. **(E)** El espectro de fluorescencia muestra una alta similitud en la estructura terciaria de hSPARC y Whno mientras que Whsi-His difiere significativamente de las primeras. En el inset se muestra el cálculo de las longitudes de onda para los máximos de fluorescencia.

Contrariamente a este último resultado, Whsi-His varía en el máximo de fluorescencia de manera notable, alcanzando su máximo a los 336 nm (**Figura 9E**). Los máximos de fluorescencia fueron calculados mediante la derivada de la función en los puntos cercanos al pico de la misma (**Figura 9E inset**). La diferencia en la estructura terciaria de la proteína recombinante Whsi-His podría estar relacionada con una posible interacción de la etiqueta de histidina con el extremo ácido N-terminal de la misma molécula. Siguiendo esta hipótesis, la interacción podría cambiar el centro de masa de la molécula sin alterar en mayor medida sus distintas estructuras secundarias internas, tal como lo refleja el dicroísmo circular mostrado anteriormente (**Figura 9C**).

Finalmente, antes de pasar a los ensayos de actividad funcional, analizamos la reversibilidad de la desnaturalización de SPARC, ya sea como producto del quelado de calcio o del aumento de la temperatura. Para ello se realizó un espectro de dicroísmo circular en el UV lejano con agregado de 1 mM final de EDTA para quelar el calcio presente en la solución y los átomos presentes en la coordinación de las manos EF de SPARC. Este tratamiento produjo una importante caída de la elipticidad molar a 220 nm y un corrimiento del valle de 208 nm hacia longitudes de onda menores (**Figuras 10A y B**) ambos parámetros atribuibles a la pérdida de estructura secundaria. Llamativamente, el agregado de calcio (5 mM  $\text{CaCl}_2$  final) revirtió en su totalidad la pérdida de estructura.



**Figura 10. Modificación reversible de la estructura secundaria de SPARC nativa. (A)** Modificación del espectro de dicroísmo circular mediante el quelado de  $\text{Ca}^{+2}$  y la recuperación total de estructura luego del agregado del catión bivalente secuestrado. **(B)** Amplificación de los perfiles de dicroísmo de la figura A. Las flechas muestran los corrimientos producidos por el arresto de  $\text{Ca}^{+2}$ . **(C)** Modificación de los perfiles de dicroísmo producidos al desnaturalizar la proteína con un tratamiento alcalino (línea de puntos) comparado con su control sin tratar (línea llena). Modificado de Mayer *et al* (Mayer *et al.*, 1991). Las flechas muestran los corrimientos producidos por el tratamiento desnaturalizante. **(D)** La desnaturalización térmica (calentamiento a

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

95 °C) produce una importante disminución de estructura respecto del espectro obtenido a temperatura ambiente (25 °C). La estructura secundaria se recupera al regresar a la temperatura ambiente.

Como había sido descrito para otras fuentes de SPARC, la desnaturalización de la molécula por cambios de pH produce un corrimiento similar al mostrado (Mayer *et al.*, 1991) (**Figura 10C**). De la misma manera, al analizar el espectro completo de la proteína nativa a 95 °C encontramos una importante disminución de elipticidad molar por residuo a 220 nm y un corrimiento a la izquierda del valle de 208 nm (**Figura 10D**). Al repetir el espectro a 25 °C, post desnaturalización a 95 °C, encontramos que la proteína recuperaba en su totalidad la estructura perdida. Por lo expuesto, podemos concluir que tanto la termodesnaturalización como la depleción de calcio son eventos que llevan a una desnaturalización reversible. Si bien el evento de pérdida de estructura inducido por el secuestro de calcio había sido ya descrito por otros autores partiendo de otras fuentes de SPARC, este resultado nos permitió validar una vez más la molécula nativa en su aspecto estructural. Más aún, la reversibilidad de la termodesnaturalización como caracterización biofísica de la molécula es un comportamiento inédito en el estudio bioquímico de SPARC.

**SPARC nativa y sus formas recombinantes poseen un efecto bifásico en la proliferación de fibroblastos, dependiendo de la concentración utilizada y el momento en el que se agrega la molécula**

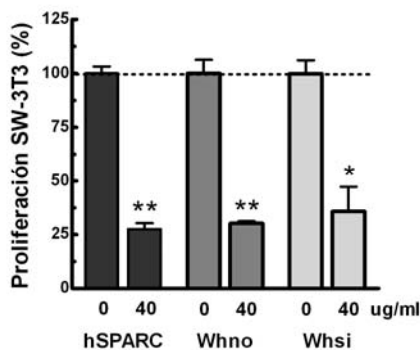
Para concluir con la validación de las proteínas desarrollamos un ensayo que permitiese:

- Determinar si las distintas fuentes de SPARC eran **biológicamente activas**
- Poner a punto un ensayo que sirviera como **control de calidad** de las futuras preparaciones
- Servir como punto de partida para el estudio de la actividad biológica en **células tumorales**

En base a la literatura, seleccionamos la inhibición de la proliferación de fibroblastos como el ensayo adecuado para realizar dichas validaciones. Para ello se utilizó un método colorimétrico (MTT o (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) que permite cuantificar el número de células vivas en un momento determinado del cultivo. Las células seleccionadas para este ensayo fueron las Swiss 3T3, una línea de fibroblastos embrionarios murinos profundamente caracterizada y de fácil crecimiento. Para comenzar con los ensayos de proliferación utilizamos 40 ug/ml de hSPARC, Whno y Whsi-His purificadas en nuestro laboratorio, las cuales fueron

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

agregadas cinco horas<sup>11</sup> después del momento del plaqueo de las células. Las tres proteínas produjeron una importante inhibición en la proliferación celular respecto de los controles (**Figura 11**). El porcentaje de proliferación se calculó a las 72 hs después del plaqueo celular y fue tomado como el número de células presentes en los cultivos tratados respecto de los fibroblastos control. Teniendo como base este resultado, decidimos continuar con el análisis utilizando un rango mayor de concentraciones y, al mismo tiempo, evaluar el efecto del agregado de SPARC antes y después de la adhesión y estiramiento de las células al plástico. Al agregar la proteína nativa conjuntamente con el plaqueo de los fibroblastos (**Figura 12A**) observamos que la inhibición era claramente dosis-dependiente (**Figura 12B**). Pero quizás, el resultado más llamativo fue el efecto pro-proliferativo observado a bajas concentraciones (menos de 10 ug/ml), haciéndonos hipotetizar sobre una posible curva de actividad biológica bifásica (**Figura 12B**).



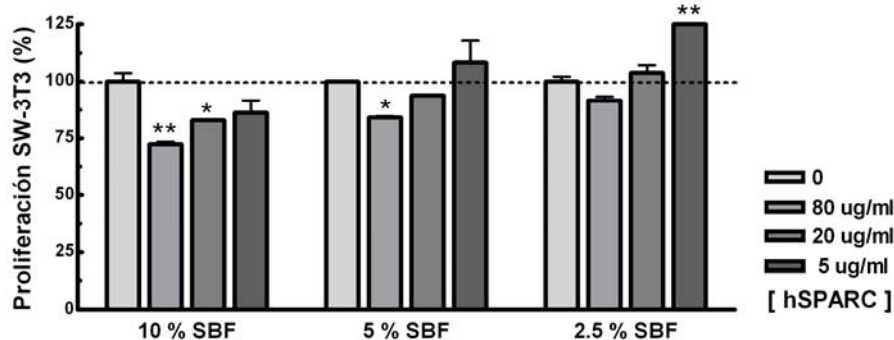
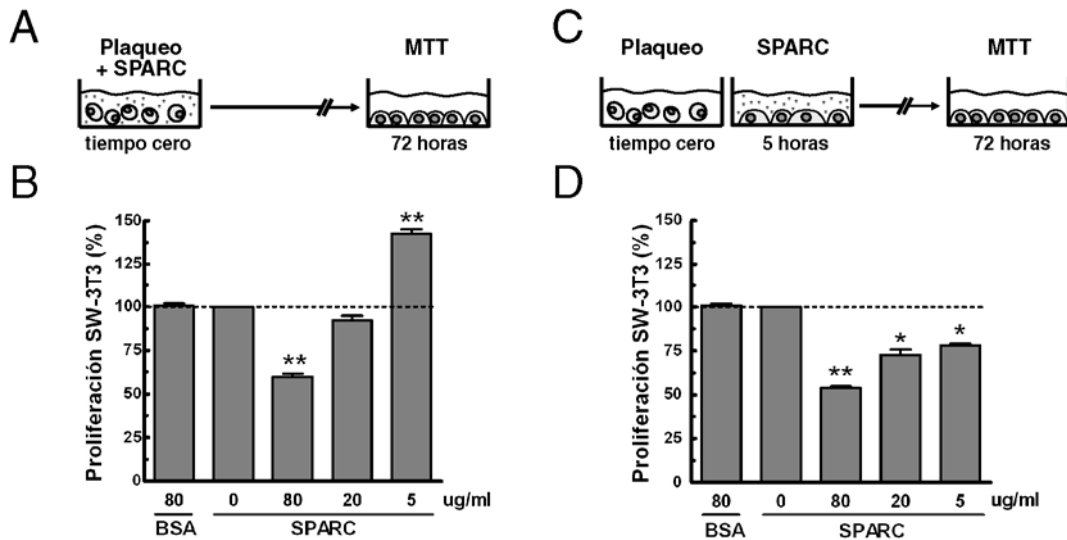
**Figura 11. Efecto antiproliferativo de SPARC nativa y recombinante sobre fibroblastos.** La proliferación de los fibroblastos murinos 72 hs luego del tratamiento con hSPARC, Whno y Whsi fue significativamente menor que en los controles. Las barras representan el porcentaje de células respecto de los controles como el promedio de dos experimentos  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

Sin embargo, al agregar la proteína 5 hs post-plaqueo (**Figura 12C**) observamos que el efecto pro-proliferativo a bajas concentraciones desaparece por completo (**Figura 12D**), haciendo que la proteína sólo muestre actividad inhibitoria de la proliferación en las concentraciones probadas. Un efecto similar se observó cuando el experimento fue realizado en presencia de distintas concentraciones de suero (SBF). La disminución de SBF, conjuntamente con los factores de crecimiento asociados, produce una disminución en la inhibición de la proliferación hasta alcanzar un efecto pro-proliferativo (**Figura 13**). Este llamativo efecto evidencia algún tipo de interacción entre SPARC y los factores de crecimiento presentes en el SBF. Regresando al efecto bifásico observado con la proteína nativa, nos concentramos en determinar si dicha actividad

<sup>11</sup> El **período de 5hs** fue determinado como el momento en el que más del 90% de las células plaqueadas se encontraban adheridas y estiradas (*spread*) sobre el sustrato. Como veremos más adelante, esta variable jugaría un papel muy importante en la actividad biológica de la proteína en los ensayos de proliferación *in vitro*.

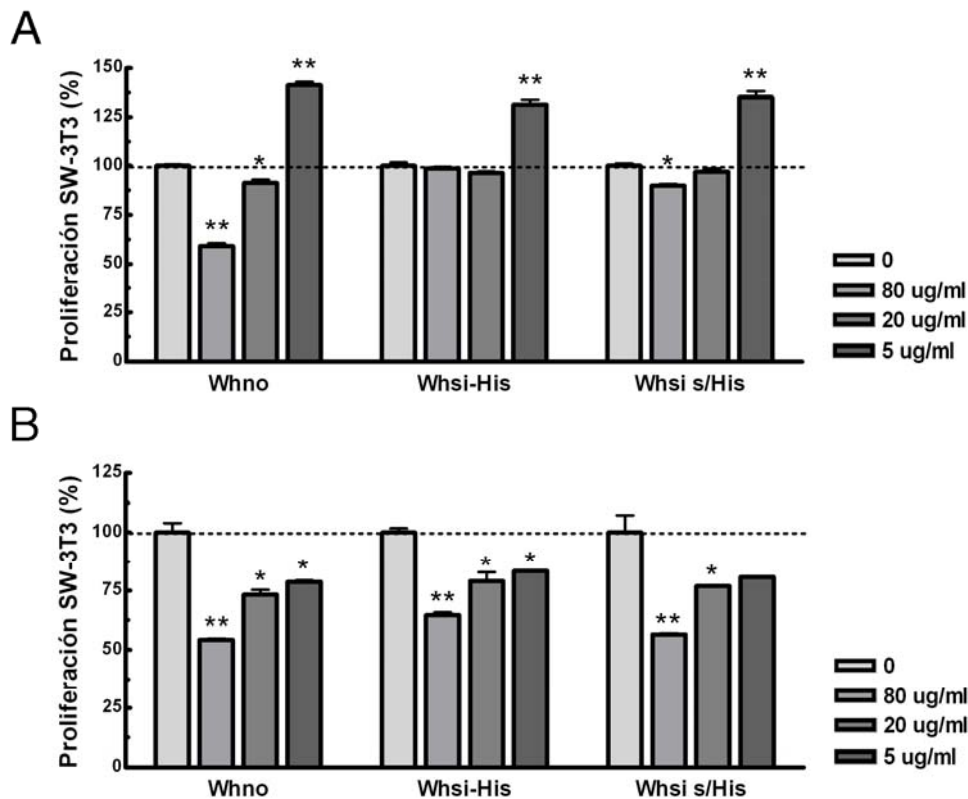
## Resultados – SPARC y estroma tumoral

también era observada con las proteínas recombinantes. Para ello, una vez más utilizamos las moléculas purificadas en nuestro laboratorio Whno y Whsi-His e incluimos la Whsi sin la etiqueta de histidina (Whsi sin/His), removida por la proteasa trombina.



## Resultados – SPARC y estroma tumoral

El efecto de estas proteínas resultó ser prácticamente idéntico al observado con la proteína nativa (Figura 14). Mientras que coplaqueando las moléculas con las células se observa claramente el efecto bifásico dosis dependiente (Figura 14A); cuando el agregado se produce post adhesión y estiramiento de las células, la actividad biológica sólo se manifiesta como inhibitoria de la proliferación (Figura 14B).



**Figura 14. Efecto bifásico en la proliferación de fibroblastos por parte de las proteínas recombinantes.** (A) El coplaqueo de las células con Whno produce un efecto bifásico idéntico al descrito para la proteína nativa. En cambio, en las proteínas Whsi y Whsi s/His predomina el efecto activador de la proliferación a 5 ug/ml. (B) El agregado al cultivo de las distintas formas recombinantes luego de las 5 hs necesarias para el estiramiento sólo evidenció un efecto antiproliferativo a las concentraciones probadas. Para ambos casos las barras representan el promedio de dos réplicas técnicas del número de células respecto del control sin proteína  $\pm$  SEM a las 72 hs del inicio del ensayo. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

## Las células tumorales no son afectadas por la actividad antiproliferativa de SPARC

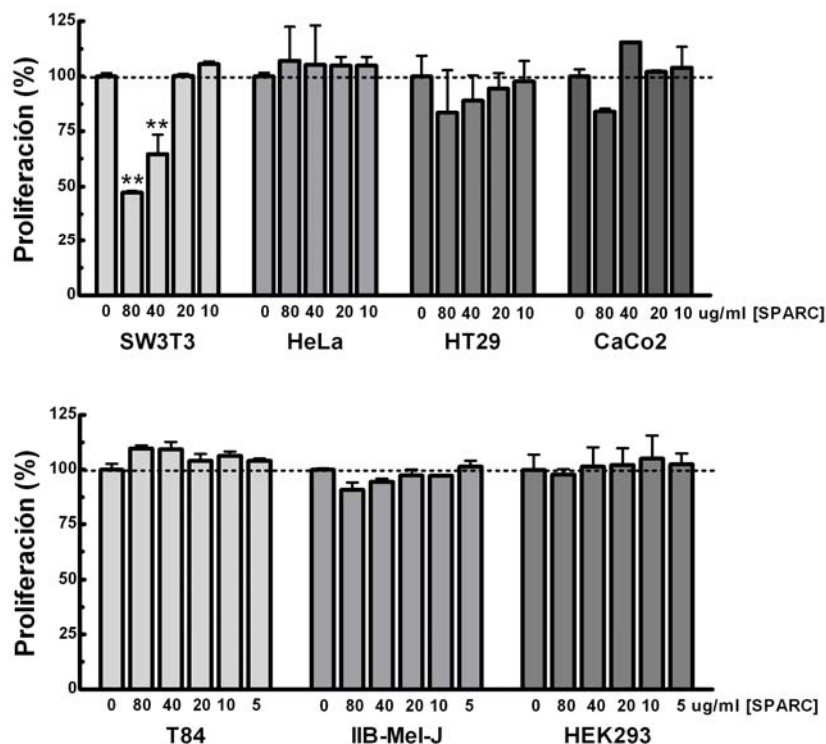
Con estos últimos resultados la actividad biológica de las moléculas recombinantes se encontraba definitivamente validada. No obstante, a la vista de poder utilizar este potente efecto sobre un problema aplicado, decidimos indagar acerca de su potencialidad sobre células tumorales.

Teniendo en cuenta que los efectos de SPARC en los tumores humanos podría depender de la acción concertada de diferentes componentes de la masa tumoral (Bos *et al.*, 2004),

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

decidimos analizar los efectos de SPARC exógena en distintas líneas tumorales. Y, aunque varios sistemas de producción de proteína recombinante (eucariota y procariota) ya fueron reportados como fuente de SPARC humana (Bassuk *et al.*, 1996a; Bradshaw *et al.*, 2000; Chlenski *et al.*, 2006; Kelm *et al.*, 1992b; Nischt *et al.*, 1991; Sage *et al.*, 1989a; Yost *et al.*, 1994), nunca se utilizó SPARC producida por las propias células tumorales en ensayos funcionales.

Por lo tanto seleccionamos un grupo de seis líneas tumorales/transformadas productoras de distintos niveles endógenos de SPARC y diferente origen ontológico. Las líneas HeLa (carcinoma de cervix humano), HT29 y CaCo2 (adenocarcinomas de colon humano) no expresan SPARC. La línea T84 (metástasis de carcinoma de colon en pulmón humano) expresa muy bajos niveles y las líneas IIB-Mel-J (melanoma primario humano), que secreta niveles intermedios y HEK293 (epiteliales transformadas de embrión humano), que expresa altos niveles de SPARC. La figura 15 muestra como ninguna de las líneas probadas es afectada consistentemente por el agregado exógeno de SPARC en un amplio rango de concentraciones (**Figura 15**). En la misma figura se observa el efecto de SPARC sobre la línea de fibroblastos SW3T3 como control (**Figura 15**).



**Figura 15. SPARC no afecta la proliferación de las células tumorales *in vitro*.** El agregado de SPARC recombinante (Whno) durante el plaqueo no inhibe la proliferación de las células tumorales en ninguna de las concentraciones probadas. Se realizaron al menos dos ensayos independientes. Para ambos casos las barras

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

representan el promedio del número de células respecto del control sin agregado de proteína (a las 72 hs del inicio del ensayo)  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$ .

De estos estudios podemos concluir que las proteínas purificadas, tanto en su forma nativa como recombinante, poseen patrones estructurales similares entre ellas y respecto de otras proteínas anteriormente publicadas en la literatura. Asimismo, la actividad biológica de todas las formas de SPARC fue validada mediante un ensayo funcional de proliferación de fibroblastos murinos, metodología adoptada en la actualidad por nuestro laboratorio como control de calidad de todas las preparaciones de SPARC. Además, partiendo de la evidencia mencionada en los párrafos anteriores, no existiría un efecto directo de SPARC sobre la proliferación de las células tumorales estudiadas. Dicho resultado sumado a posteriores trabajos de nuestro grupo, llevaron a la generación de un reporte aceptado recientemente en el *Internacional Journal of Cancer* (López Haber *et al.*, 2007), en el que se demuestra definitivamente que las células tumorales (expresen o no SPARC) son insensibles a la acción de SPARC exógena sobre la proliferación celular. Por lo tanto, nuestra hipótesis al respecto es que podría existir un mecanismo molecular propio de las células tumorales que permitiría que las mismas evadan la acción antiproliferativa de SPARC producida por fibroblastos y células endoteliales del estroma tumoral.

La segunda línea de investigación de la que nos ocuparemos en esta tesis, aborda el estudio de la modulación endógena y exógena de SPARC sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* del melanoma humano.

## Efecto de la modulación endógena y exógena de SPARC sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* del melanoma humano

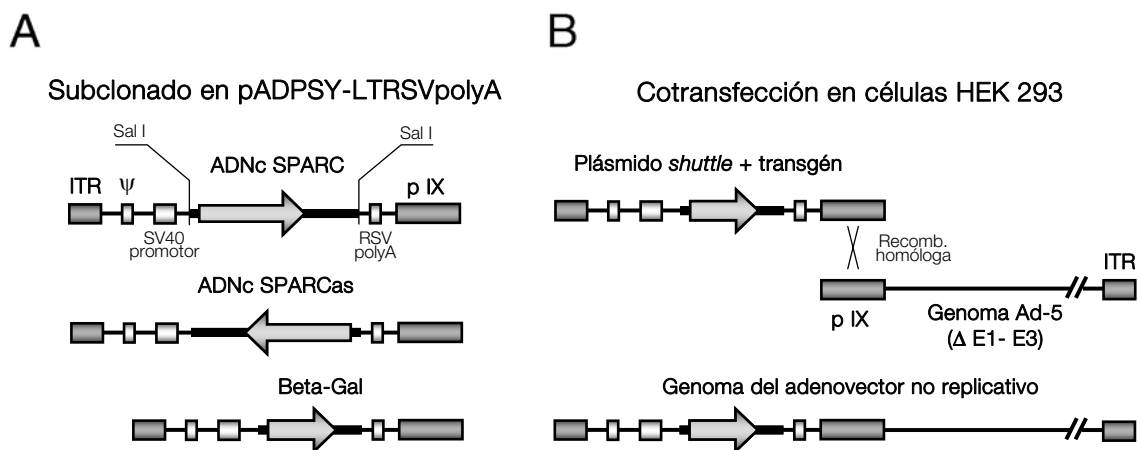
### La modulación de los niveles endógenos de SPARC no altera el crecimiento de las células de melanoma *in vitro*

Las construcciones necesarias para la generación de los vectores adenovirales se realizaron a partir del cDNA de SPARC humano clonado en el plásmido pBluescript-SPARC (Podhajcer *et al.*, 1996). Utilizando la enzima de restricción Sal I se liberó y purificó un fragmento de 1.7 kb conteniendo la secuencia codificante de SPARC. Dicho fragmento fue subclonado en ambas orientaciones (sentido y antisentido) en el sitio Sal I del sitio múltiple de clonado del plásmido pADPSY-LTRSVpolyA (Figura 16A). De la

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

misma manera, un fragmento de 527 pb conteniendo la secuencia codificante de la beta-galactosidasa bacteriana fue clonado en el plásmido pADPSY-LTRSVpolyA con el objeto de generar el vector control/reportero para todos los ensayos de transferencia génica realizados para este trabajo de tesis (Figura 16A). Luego de verificar por mapeo de restricción y secuenciación que las construcciones habían sido correctamente clonadas río abajo del promotor RSV y río arriba de la señal de poliadenilación del SV40, se generaron los adenovirus recombinantes de primera generación en los que los genes E1 y E3 se encuentran deletados (Figura 16B). Tanto los detalles de las construcciones como los controles de calidad realizados en la generación de los vectores pueden ser consultados en una sección especialmente creada para tal fin en los Materiales y Métodos de esta tesis.

El primer paso experimental con las herramientas generadas fue la búsqueda de la dosis viral adecuada para el trabajo con el modelo de interés. Las líneas de melanoma humano A375N e IIB-Mel-J fueron probadas en un estudio de eficiencia de transducción utilizando Ad-βgal (Figura 16A).

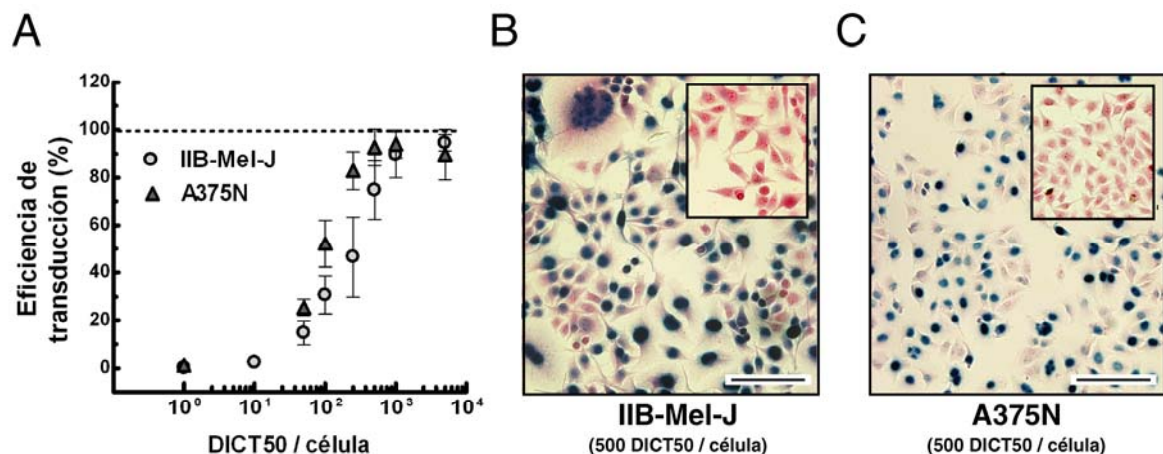


**Figura 16. Ingeniería genética de los vectores adenovirales no replicativos. (A)** Esquema del plásmido pADPSY-LTRSVpolyA con la secuencia codificante en orientación sentido y antisentido de SPARC humana y el transgén reportero de la β-galactosidasa bacteriana. **(B)** Representación esquemática de la generación de vectores adenovirales no replicativos mediante la técnica de cotransfección y recombinación homóloga en las células HEK 293 (transcomplementadoras del gen E1). Por último se esquematiza el genoma completo del adenovector de primera generación no replicativo (ΔE1 y E3). Para los detalles ver la sección de materiales y métodos.

Al igual que en el resto de las transducciones *in vitro* o *ex vivo*, y a menos que se indique lo contrario, las células se incubaron con los vectores por un período de 6 hs en ausencia de SBF. Luego de 36 hs post-transducción las células fueron fijadas para realizar la reacción de x-gal de manera de poder cuantificar la proporción de células positivas

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

(Figura 17A). Utilizando una multiplicidad de infección<sup>12</sup> (MOI) de 500 dosis infectivas de cultivo de tejido 50 por célula (DICT50/célula) o, lo que en nuestro laboratorio resultó equivalente empíricamente,  $5 \cdot 10^8$  DICT50/ml se consiguió una eficiencia de transducción de, al menos, 75 % en ambas líneas (Figura 17B y C). Con la dosis viral preseleccionada decidimos comenzar con los ensayos de transferencia génica. En vectorología y biología molecular en general, se asume que bajar la expresión de un gen es biológicamente más difícil<sup>13</sup> que hiperexpresarlo<sup>14</sup>. Por este motivo decidimos confirmar, en primera instancia, la funcionalidad del adenovector portador de la secuencia antisentido del ADNc de SPARC humano (Ad-SPas) y luego, utilizando la misma dosis, hacer lo propio con el vector que posee la secuencia en su orientación sentido (Ad-SP). Al medir los niveles de expresión del mensajero de SPARC mediante un Northern blot en células de melanoma transducidas con Ad-SPas, observamos una señal extendida a lo largo de la calle. Sospechamos que el efecto observado, a pesar de correr en condiciones desnaturalizantes, podía deberse a una asociación entre el ARN transgénico antisentido y el ARN endógeno (Figura 18A).



**Figura 17. Eficiencia de transducción de las líneas de melanoma humano.** (A) Curva de eficiencia de transducción a las 36 hs utilizando el adenovirus portador del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Las dosis virales están representadas como multiplicidad de infección (MOI = DICT50/célula). Cada punto en la curva representa la media del porcentaje de transducción  $\pm$  DS. (B) Microscopía óptica de células IIB-Mel-J transducidas con una MOI de 500 DICT50/célula. El inset muestra las células sin transducir. (C) Microscopía

<sup>12</sup> La **multiplicidad de infección (MOI)** fue utilizada en estos primeros ensayos como medida de la **dosis viral**. No obstante, como se explica en la sección de materiales y métodos, para el resto de la tesis se utilizaron como medida de dosis las **concentraciones de los virus al momento de la transducción** (DICT50/ml). Consideramos que esta manera de representar la dosis de transducción refleja con más exactitud el número de partículas infectivas con posibilidad de ser adsorbidas a la superficie de las células utilizadas en el ensayo.

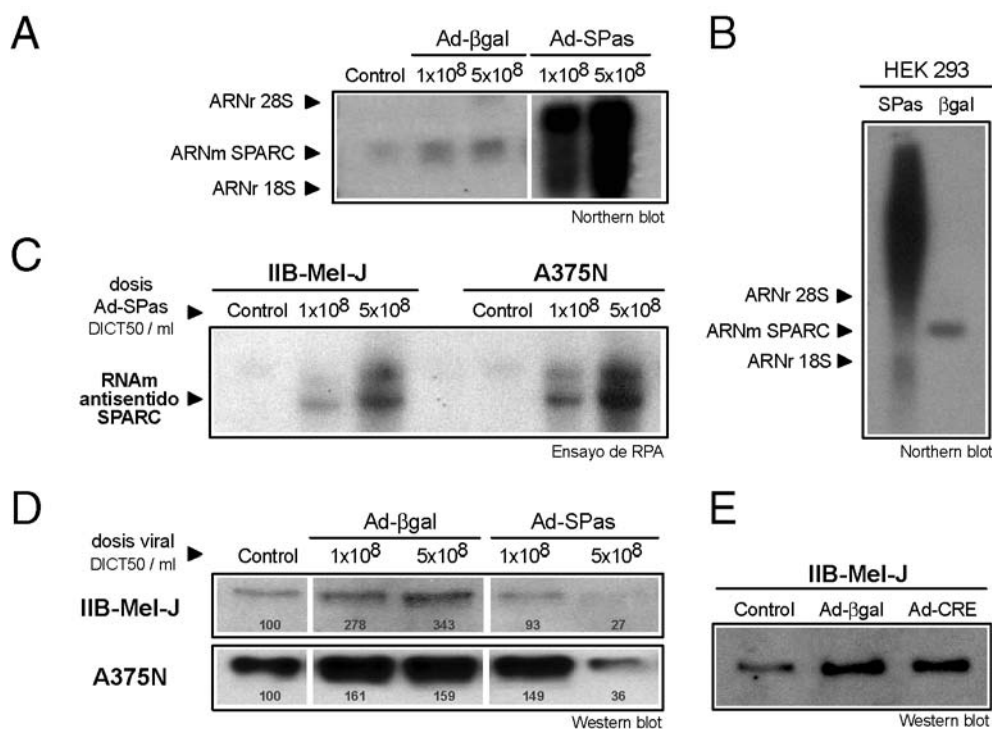
<sup>13</sup> El adjetivo “difícil” hace referencia a que, por lo general, las herramientas utilizadas para disminuir la expresión de un gen son de eficacia puramente empírica, cosa que generalmente no ocurre con aquéllas que se utilizan para expresar una nueva molécula o hiperexpresar una preexistente.

<sup>14</sup> La **hiperexpresión** es un término que será utilizado repetidas veces en este trabajo, haciendo alusión a la expresión de un gen por encima de los niveles endógenos de la célula u organismo involucrado.

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

óptica de células A375N transducidas con una MOI de 500 DICT50/células. El inset de cada fotografía muestra las células sin transducir. Para ambos casos, las células de color azul corresponden a transducciones efectivas utilizando el ensayo de x-gal. Todas las transducciones se realizaron en ausencia de SBF y por un período de 6 hs. La barra negra representa un tamaño de 50  $\mu\text{m}$ .

El mismo resultado fue observado infectando las células HEK 293 con el Ad-SPas (**Figura 18B**). Por esta razón decidimos medir la expresión del mensajero antisentido mediante un ensayo de protección de la ARNasa o RPA (de su sigla en inglés). Utilizando como sonda ARN sentido de SPARC, este ensayo mostró que el ARN transgénico se expresaba sólo en aquellas células que habían sido transducidas por el Ad-SPas (**Figura 18C**). Cosechando medio condicionado a partir de las células de melanoma transducidas con  $5.10^8$  DICT50/ml de Ad-SPas pudimos evidenciar un 65 % (A375N) y 70 % (IIB-Mel-J) de disminución en los niveles de SPARC secretado al medio de cultivo respecto de las células no transducidas (**Figura 18D**). De manera inesperada, las células de melanoma transducidas con el Ad- $\beta\text{gal}$  mostraron un importante aumento de la expresión de SPARC. Concordantemente con dicho resultado, el incremento de SPARC también fue observado en las mismas células transducidas con un adenovector que codifica para la recombinasa CRE (**Figura 18E**).



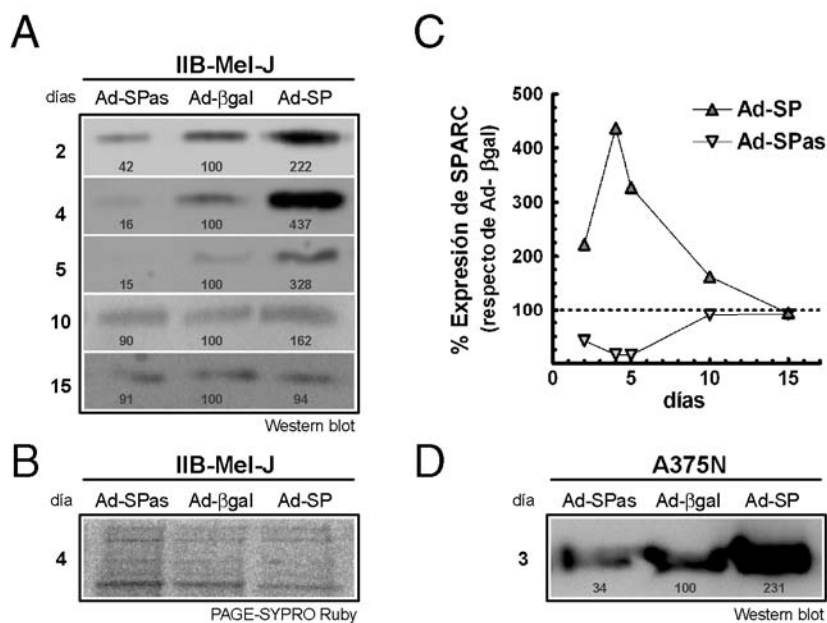
**Figura 18. Puesta a punto de la dosis viral necesaria para una eficiente modulación negativa del gen SPARC. (A)** Northern blot en células de melanoma transducidas con el vector antisentido de SPARC y sus controles. **(B)** Northern blot en células HEK 293 infectadas con el vector antisentido de SPARC y su control. **(C)** Ensayo de protección de ARNasa realizado. **(D)** Reducción de los niveles de la proteína SPARC en medios condicionados de las líneas de melanoma IIB-Mel-J y A375N producto de la transducción con  $5.10^8$  DICT50/ml de Ad-SPas. **(E)** Modulación de la expresión de SPARC con un adenovector no relacionado (Ad-

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

CRE). Los Western blots fueron realizados con 2  $\mu$ g de proteína total obtenida de los medios condicionados de las células tratadas.

Dicho comportamiento tendría una explicación plausible en el propio estrés producido por el evento de transducción viral. Teniendo en cuenta trabajos previos donde se define a SPARC como una proteína de respuesta a estrés (Kudo *et al.*, 1994) consideramos que la regulación positiva de esta molécula en los medios condicionados de células de melanoma, es consecuencia directa del tratamiento con los adenovectores.

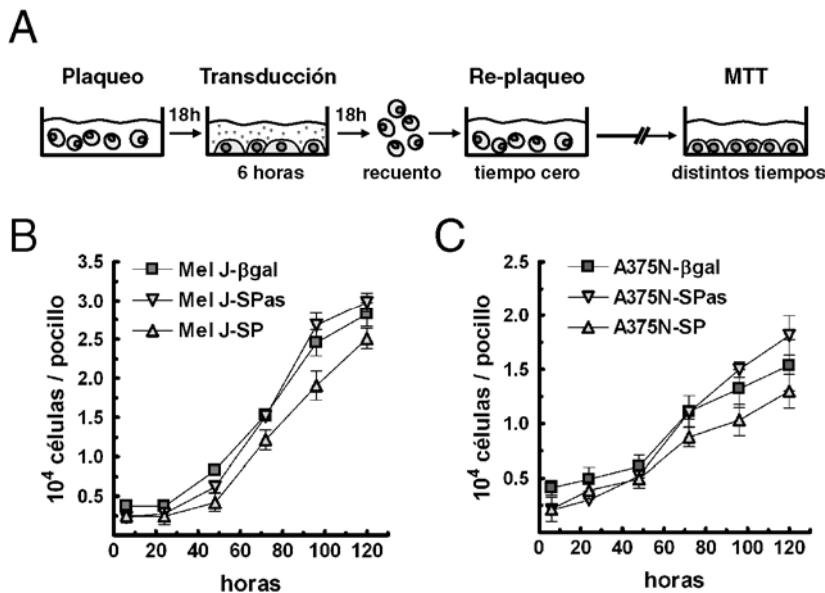
Mediante un estudio de cinética se analizaron los perfiles de expresión de SPARC en las líneas de melanoma IIB-Mel-J y A375N (Figura 19). Con el adenovector antisentido encontramos que la máxima supresión de SPARC secretada al medio ocurre entre los 4 y 5 días post-transducción (Figura 19A-C). Asimismo, utilizando el Ad-SP observamos un pico de producción de SPARC, respecto del control (Ad- $\beta$ gal), a los 4 días post-transducción de las células de melanoma (Figura 19A-C). Resultados similares fueron observados con el mismo diseño experimental en las células A375N (Figura 19D).



**Figura 19. Efectiva modulación transiente de los niveles de SPARC en las células de melanoma mediante el uso de adenovectores.** (A) Análisis de la expresión de SPARC, mediante Western blot, en medios condicionados de la línea IIB-Mel-J transducidas con  $5 \cdot 10^8$  DICT50 / ml de los distintos adenovectores. (B) SDS-PAGE teñido con SYPRO-Ruby como control de carga de los medios condicionados del día 4. (C) Representación de las densitometrías del Western blot de A, en función del tiempo. (D) Western blot de medio condicionado de A375N 72 hs post transducción. Todos los Western blots y SDS-PAGE's fueron realizados con 2  $\mu$ g de proteína total obtenida de los medios condicionados de las células tratadas. Los números debajo de las bandas representan el valor densitométrico de cada señal respecto del Ad- $\beta$ gal.

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

Mediante un ensayo de MTT se evaluó la cinética de proliferación para cada línea de melanoma transducida con los diferentes vectores (Figura 20A). Las células fueron crecidas en presencia de medio con SBF y el resultado obtenido mostró que a pesar de la eficiente modulación negativa de SPARC, la tasa de proliferación de ambas líneas, A375N e IIB-Mel-J, no fue afectada. En cambio, para el caso de la hiperexpresión de SPARC observamos un pequeño pero consistente efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* para ambas líneas de melanoma (Figuras 20B y C). Otra observación a destacar es que durante los dos primeros días del ensayo no encontramos ningún tipo de diferencia entre los tratamientos con los distintos vectores. No obstante, a medida que la cinética de crecimiento transcurre, paulatinamente comienza a evidenciarse un retraso en la velocidad de crecimiento de las células tratadas con el Ad-SP (Figuras 20B y C).



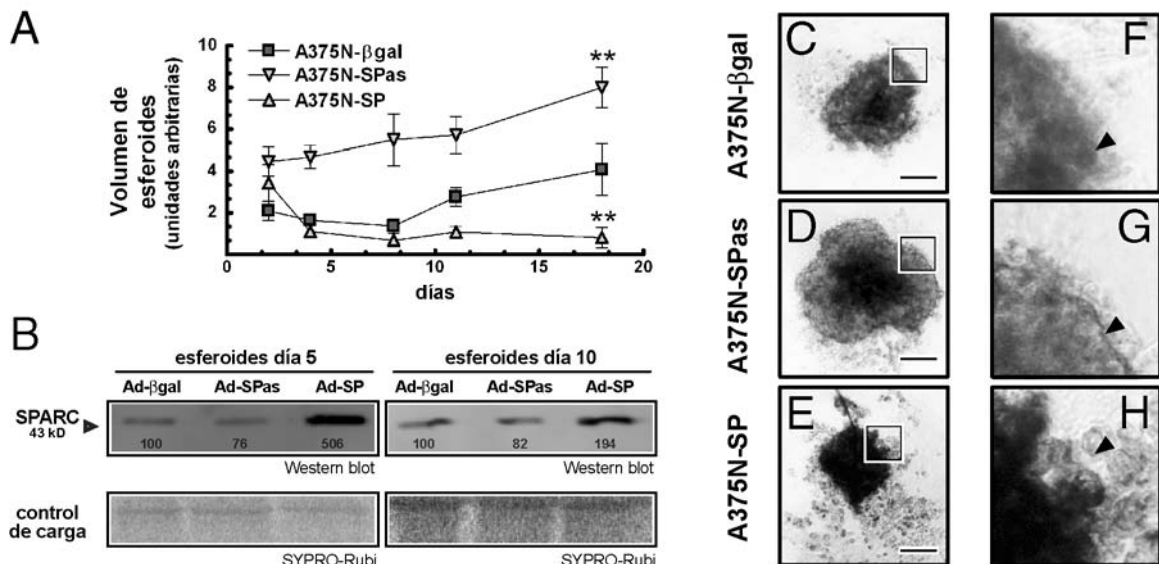
**Figura 20. La modulación en los niveles de SPARC no afecta significativamente su crecimiento *in vitro*.** (A) Representación esquemática del ensayo de proliferación *in vitro* incluyendo el tratamiento con los adenovectores. (B) Curva de crecimiento *in vitro* de la línea IIB-Mel-J transducida con  $5 \cdot 10^8$  DICT50/ml de los diferentes vectores adenovirales. (C) Curva de crecimiento *in vitro* de las línea A375N transducida con  $5 \cdot 10^8$  DICT50/ml de los diferentes vectores adenovirales. Los puntos de las cinéticas representan media  $\pm$  DS del número de células por pocillo. Se realizaron al menos tres ensayos independientes para cada línea celular.

El aumento y la disminución de los niveles de SPARC en melanoma inhiben o promueven, respectivamente, el crecimiento de esferoides

Como mencionamos anteriormente, en estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que tanto en los melanomas primarios como en las metástasis, SPARC es producida no sólo por las células tumorales sino también por el estroma circundante (Ledda *et al.*, 1997b). Con el objeto de determinar el rol de SPARC secretada por el tumor

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

y/o su entorno, utilizamos como modelo el crecimiento de esferoides *in vitro*. Los esferoides son estructuras pluricelulares tridimensionales formadas por uno o más tipos celulares (esferoides homotípicos o heterotípicos respectivamente) que crecen en ausencia de anclaje. Inicialmente, comenzamos analizando el efecto en la modulación de los niveles de SPARC sobre el establecimiento y la cinética de crecimiento de esferoides de melanoma homotípicos. Estos primeros resultados mostraron de manera concluyente que la hiperexpresión de SPARC en las células A375N transducidas con Ad-SP (A375N-SP) producía un importante efecto inhibitorio en el crecimiento de los esferoides (Figura 21A). Si bien este resultado ya era evidente a tiempos cortos, la diferencia en el volumen de los esferoides transducidos con el Ad-SP respecto de los controles se hizo más evidente a tiempos largos.



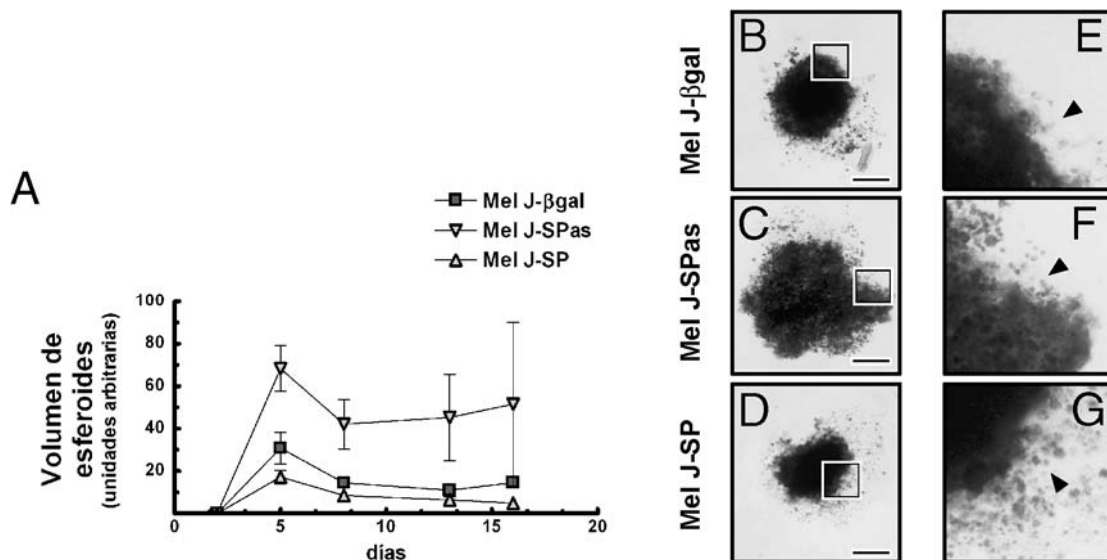
**Figura 21. La modulación de los niveles endógenos de SPARC en las células de melanoma afecta el crecimiento de esferoides.** (A) Cinética de crecimiento de esferoides homotípicos compuestos por células A375N transducidas con distintos vectores adenovirales. Los esferoides fueron medidos como se describe en materiales y métodos. Los datos están expresados como media  $\pm$  DS de al menos 7 esferoides y tres diferentes experimentos (\*\* $p < 0.01$ ). (B) Western blot y control de carga de medios condicionados durante 24 hs de esferoides a los 5 y 10 días post-plaqueo. (C-E) Morfología de los esferoides homotípicos a las 96 h de su plaqueo. (F-H) Vista aumentada de los contornos de los esferoides con los distintos tratamientos (ver flechas). Nótese la periferia bien delimitada en el caso del tratamiento A375N-SPas comparado con A375N-SP. La barra representa un tamaño de 500  $\mu$ m.

Contrariamente, la regulación negativa o *downregulation* de SPARC en las células A375N (A375N-SPas) indujo un aumento significativo en el crecimiento de los esferoides comparado con aquellos no transducidos o de transducción simulada o *mock* (donde se realiza el mismo protocolo pero no se le agrega el vector) (Figura 21A). Llamativamente, las células A375N transducidas con Ad-βgal (A375N-βgal) también mostraron una

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

capacidad reducida de crecimiento a tiempos cortos e intermedios, posiblemente debida al incremento de SPARC producto del tratamiento con el adenovector (discutido anteriormente en la Figura 18) (**Figura 21A**). La producción de SPARC en el medio condicionado de los esferoides transducidos con los distintos vectores (**Figura 21B**) mostró un perfil similar al observado con las células de melanomas crecidas en monocapa (ver **Figura 19A**).

Además del estudio de la cinética de crecimiento, decidimos evaluar el fenotipo de los esferoides tratados con los distintos vectores. Fenotípicamente, tanto los esferoides formados con células A375N- $\beta$ gal como los compuestos de células A375N-SPas mostraron dos zonas bien definidas estructuralmente. Desde adentro hacia fuera, dichos esferoides poseen un núcleo compacto seguido de una capa externa en donde la asociación entre células es claramente más débil (**Figuras 21C y D**). Contrariamente, los esferoides compuestos de células A375N-SP mostraron la pérdida o el desensamblado completo de la capa celular externa a partir del cuarto día de incubación (**Figura 21E-H**). Más aún, las células A375N-SPas mostraron bordes definidos que contrastaron con aquellos producidos por las A375N-SP, sugiriendo que en ambas poblaciones tratadas existen distintos tipos de uniones intercelulares, o bien, distintos estados de adherencia (**Figura 21G-H**). Respecto a la línea IIB-Mel-J, si bien la cinética de formación y el grado de compactación inicial de los esferoides obtenidos fue en esencia distinta, podemos concluir que los resultados generales son similares (**Figura 22A-G**).



**Figura 22. Efecto de la modulación de los niveles de SPARC en los esferoides homotípicos de células IIB-Mel-J.** (A) Cinética de crecimiento de esferoides homotípicos compuestos por células IIB-Mel-J transducidas con los distintos vectores adenovirales ( $5 \cdot 10^8$  DICT50 / ml). (B-D) Fotografías de luz transmitida de los esferoides a los 5 días de comenzado el ensayo. (E-G) Magnificaciones de las áreas marcadas en B, C y D respectivamente. Las puntas de flecha señalan los bordes irregulares según el tratamiento. Los esferoides fueron medidos como se describe en Materiales y Métodos. Los puntos de la cinética están expresados como

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

media  $\pm$  DS de al menos 5 esferoides y dos experimentos independientes. Las barras negras representan un tamaño de 1 mm.

Los esferoides homotípicos de células IIB-Mel-J necesitan un tiempo mayor para lograr un agregado tridimensional. Por esa razón solo pudieron comenzar a medirse a partir del día 5. Además, como puede visualizarse en la figura 22 las células poseen un período de compactación entre los días 5 y 10, a partir del cual la estructura se estabiliza (**Figura 22A**). Otra importante observación fue que la línea IIB-Mel-J parecería ser mucho más sensible al aumento de SPARC generado por el tratamiento control (Ad- $\beta$ gal). Por último, a medida que pasaba el tiempo, estos esferoides comenzaban a disgregarse, haciendo que el tratamiento con el antisentido (Ad-SPas) se diferencie del resto (**Figura 22A**). Por estas razones, si bien confirmamos el comportamiento generado por la modulación endógena de SPARC en ambas líneas de melanoma humano, decidimos seguir trabajando con los esferoides generados con la línea A375N. En su conjunto, estos datos indican que la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma inhibió el crecimiento tridimensional en ausencia de anclaje, mientras que la disminución o regulación negativa de la expresión de SPARC mostró efectos opuestos, evidenciando un leve incremento en la capacidad de crecimiento de los esferoides por sobre el control.

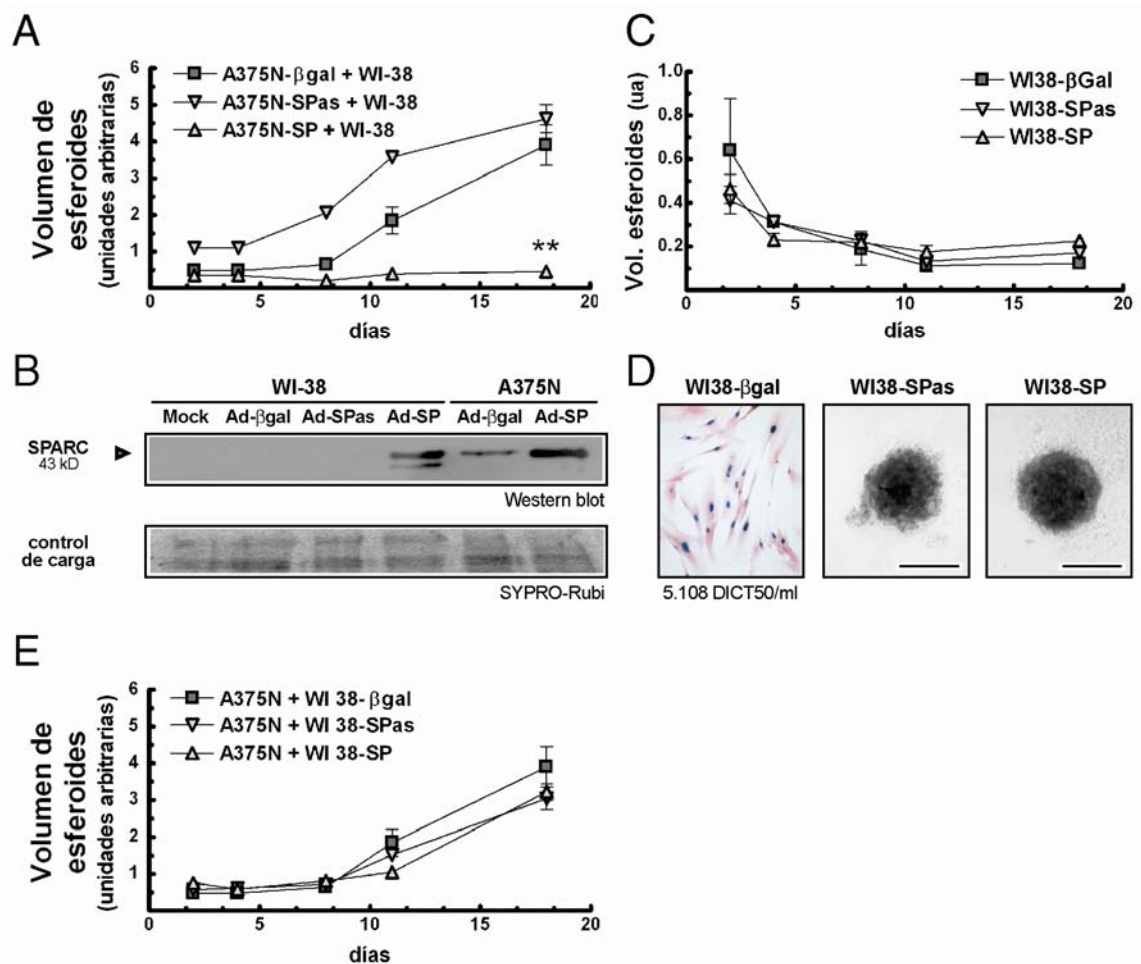
### La hiperexpresión de SPARC, por parte de los fibroblastos circundantes al melanoma, no altera la tasa de crecimiento de los esferoides heterotípicos

El siguiente paso del análisis se focalizó en subir un nuevo escalón de complejidad en nuestro modelo de crecimiento tridimensional carente de anclaje. En primer lugar, evaluamos cómo se vería afectado el crecimiento de los esferoides heterotípicos (A375N-WI38) compuestos por células de melanoma con distintos niveles de expresión de SPARC, en presencia de fibroblastos humanos WI-38 no modificados genéticamente. Los esferoides heterotípicos control, compuestos por igual cantidad de células A375N- $\beta$ gal y WI-38, no sufrieron un incremento significativo de tamaño durante los primeros 8 días del ensayo. No obstante, luego de dicho período, estos esferoides mostraron un crecimiento sostenido durante el resto del experimento (**Figura 23A**). Como se visualiza claramente en la figura 23, el crecimiento de los esferoides de A375N modificadas en presencia de WI38 resultó influenciado por la cantidad de SPARC producida por las células de melanoma. Es decir, mientras que los esferoides heterotípicos preparados con A375N-SPas mostraron una tendencia al aumento en su crecimiento en comparación

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

con sus controles, los esferoides heterotípicos compuestos de A375N-SP resultaron completamente inhibidos en su cinética (**Figura 23A**).

Habiendo observado el comportamiento de los esferoides heterotípicos con las células de melanoma modificadas, nos preguntamos si cambios en los niveles de expresión de SPARC por parte de los fibroblastos circundantes podrían afectar el crecimiento del esferoide. Con dicho propósito, tratamos las células WI-38 con  $5.10^8$  DICT50/ml de Ad-SP (WI38-SP) y realizamos un Western Blot de medio condicionado 72 hs post-transducción. Aunque los niveles endógenos basales de SPARC en las WI-38 fueron indetectables, a menos que se sembrara medio concentrado 10x (es decir, SPARC en WI-38 solo puede ser detectada utilizando 20 ug de proteína total los medios condicionados sin concentrar), las WI38-SP mostraron una alta expresión de SPARC, similar a la obtenida en las células de melanoma A375N transducidas con el vector Ad-SP (**Figura 23B**).



**Figura 23.** La modulación de los niveles de SPARC en los fibroblastos circundantes no tiene efecto en el crecimiento de los esferoides heterotípicos. **(A)** Cinética de crecimiento de esferoides heterotípicos compuestos por fibroblastos WI-38 y células de melanoma A375N transducidas con los distintos vectores adenovirales. **(B)** Producción de SPARC cuantificada por Western blots de medio condicionado de

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

fibroblastos WI-38 y células de melanoma A375N transducidos con Ad-SP y sus controles. **(C)** Cinética de crecimiento de esferoides homotípicos compuestos de fibroblastos WI-38 modificados con los vectores. **(D)** El Primer recuadro muestra una alta eficiencia de transducción (cercana al 90 % y medida con el ensayo de x-gal) de los fibroblastos humanos (aumento 40x). El segundo y tercer recuadro muestran la apariencia de los esferoides Wi38-SPas y Wi38-SP (respectivamente) a las 96 hs de su plaqueo. La barra negra representa un tamaño de 500  $\mu\text{m}$ . **(E)** Cinética de crecimiento de esferoides heterotípicos compuestos por la línea A375N y los fibroblastos WI-38 modificados con los vectores. Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  DS de al menos 7 esferoides y tres experimentos independientes. La dosis viral utilizada en todos los ensayos fue de  $5 \cdot 10^8$  DICT50 / ml. \*\*  $p < 0.001$ .

Llamativamente, los esferoides homotípicos compuestos de fibroblastos modificados no muestran un crecimiento diferencial respecto de sus controles (**Figura 23C**). A pesar de transducirse en un porcentaje mayor al 90 % (con una dosis de  $5 \cdot 10^8$  DICT50 / ml) los esferoides Wi38-SPas y Wi38-SP no difieren ni en su tamaño ni en su fenotipo de compactación (**Figura 23D**). Habiendo confirmado que la eficiencia de transducción en los fibroblastos fue suficiente para generar altos niveles de SPARC con el Ad-SP, decidimos evaluar la cinética de crecimiento de esferoides heterotípicos que poseían el melanoma humano A375N y las WI-38 genéticamente modificadas. En la **Figura 23** se muestra que el crecimiento de los esferoides heterotípicos no fue afectado por la producción de SPARC secretada por los fibroblastos circundantes (**Figura 23E**).

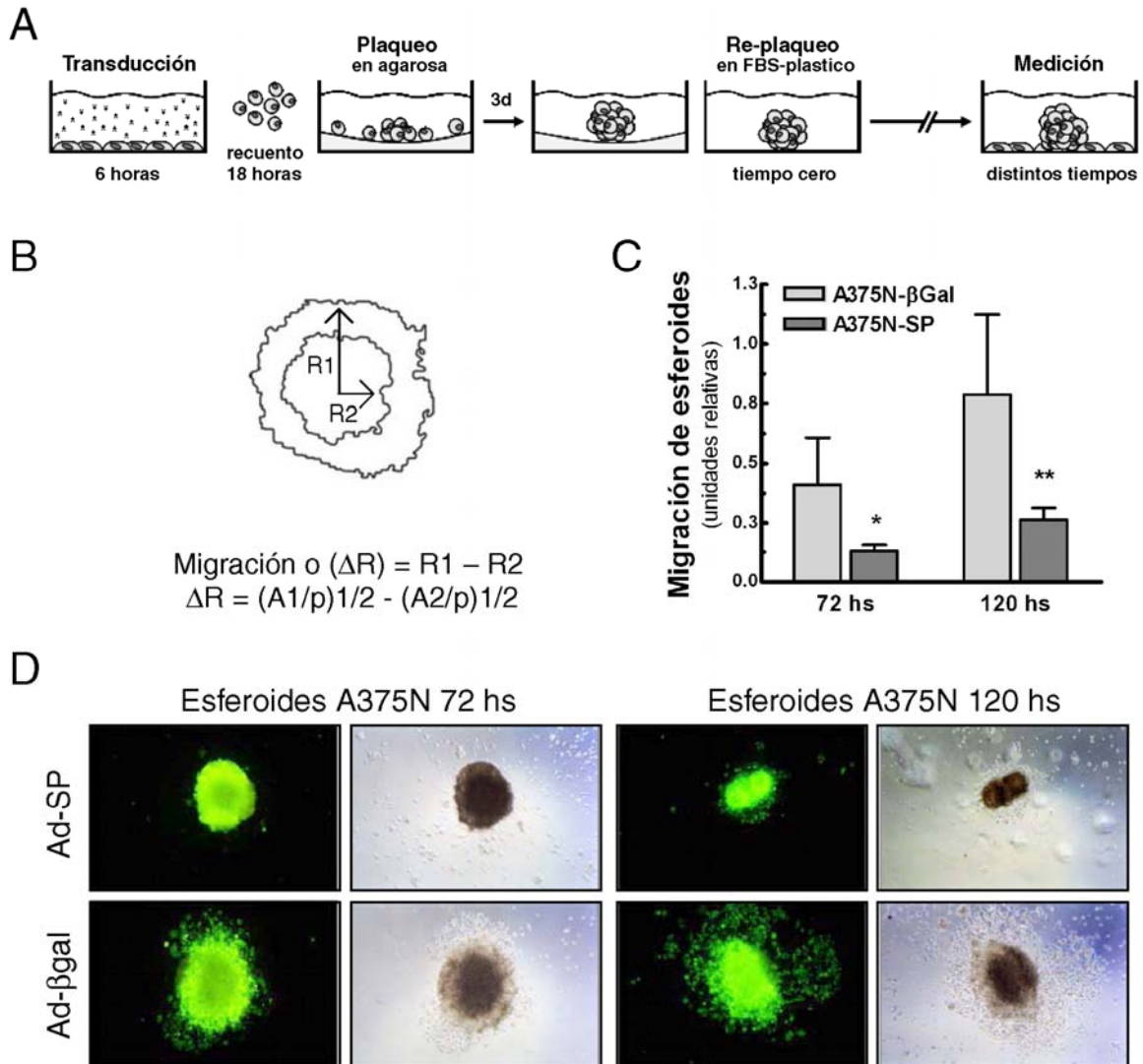
De estos experimentos se puede concluir que el crecimiento de los esferoides heterotípicos sólo se ve afectado por la cantidad de SPARC secretada por las células de melanoma *per se*, mientras que SPARC producida por los fibroblastos (el estroma circundante) no tiene efecto alguno sobre el crecimiento de los mismos.

### La hiperexpresión de SPARC disminuye la migración de las células tumorales utilizando el modelo de esferoides

Luego de haber encontrado que el aumento en los niveles endógenos de SPARC en las células de melanoma producía un importante efecto en la proliferación y crecimiento de los esferoides decidimos probar si dicho aumento también sería capaz de ejercer algún efecto en la migración de sus células. Aprovechando el modelo de los esferoides, contruidos con la línea de melanoma transducido, evaluamos la capacidad de las células para abandonar la esfera y migrar radialmente sobre plástico (**Figura 24A**). Para este experimento utilizamos la línea de melanoma A375N transfectada de manera estable con un plásmido portador de la proteína verde fluorescente (GFP). Los las células A375N-GFP, fue posible digitalizar fácilmente el perímetro máximo migrado por las células y con ello calcular la distancia media o radio de migración para cada esferoide (**Figura 24B**). Al realizar el experimento encontramos que las células tratadas con el Ad-SP migraban una distancia menor respecto del control transducido con el Ad- $\beta\text{gal}$

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

(Figura 24C y D). Si bien a las 72 hs del plaqueo ya encontramos diferencias significativas en la migración de las células de melanoma, el efecto inhibitorio inducido por la hiperexpresión de SPARC respecto del control se duplicó a las 120 hs del plaqueo (Figura 24C).



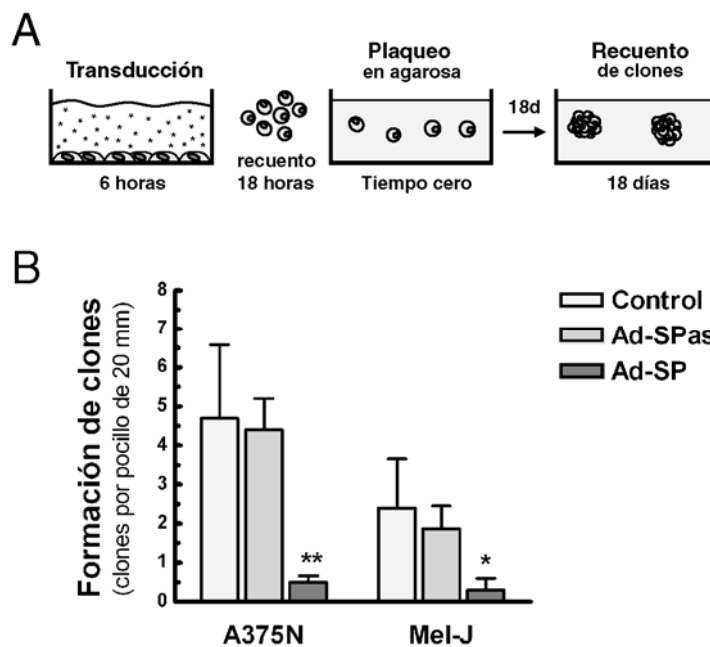
**Figura 24. La hiperexpresión de SPARC en células de melanoma inhibe su capacidad migratoria. (A)** Esquema experimental utilizado para evaluar la migración células A375N provenientes de esferoides transducidos con los vectores Ad-βgal y Ad-SP. **(B)** Ejemplo de digitalización de un esferoide (perímetro del esferoide y perímetro del área de migración). Se muestra el algoritmo utilizado para el cálculo de la distancia media migrada. **(C)** Migración de las células A375N-GFP transducidas con los distintos vectores. Las barras representan la migración media de 18 esferoides pertenecientes a dos experimentos independientes  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . **(D)** Fotografías representativas del fenotipo migratorio de los esferoides a 3 y 5 días post-plaqueo para los distintos tratamientos.

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

La capacidad formadora de clones en ausencia de anclaje es disminuída por la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma

Por último, decidimos analizar cual era el efecto de la modulación de SPARC en la capacidad clonogénica o crecimiento celular independiente de anclaje.

Las líneas de melanoma A375N e IIB-Mel-J transducidas se plaquearon a muy baja densidad en agar semisólido con el fin de cuantificar el número de colonias al cabo de 18 días (Figura 25A). Al realizar el recuento observamos que la hiperexpresión de SPARC disminuía significativamente la capacidad clonogénica de ambas líneas de melanoma (Figura 25B).



**Figura 25. La capacidad formadora de clones en ausencia de anclaje disminuye en las células de melanoma que hiperexpresan SPARC. (A)** Esquema experimental utilizado para evaluar la capacidad clonogénica de las células A375N e IIB-Mel-J transducidas con los vectores Ad- $\beta$ gal y Ad-SP. **(B)** Cuantificación del número de clones celulares crecidos bajo agar semisólido a los 18 días del comienzo del ensayo. Las barras representan la media del número de clones macroscópicos de al menos 4 plaqueos distintos  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$ .

De estos dos últimos experimentos podemos concluir que la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma genera una marcada disminución en la migración celular y en su capacidad clonogénica.

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

### Los PMN murinos son los responsables del rechazo de las células de melanoma humano que están expresando niveles reducidos de SPARC

Habiendo concluido acerca del efecto de SPARC en el crecimiento de esferoides, la capacidad clonogénica y su migración decidimos avanzar un nuevo escalón hacia la comprensión de la función biológica de esta proteína en la interrelación del tumor con su estroma. Concretamente, los siguientes experimentos se focalizaron en establecer si los cambios en los niveles de SPARC en melanoma y estroma subyacente, son suficientes para afectar la capacidad de crecimiento tumoral *in vivo*.

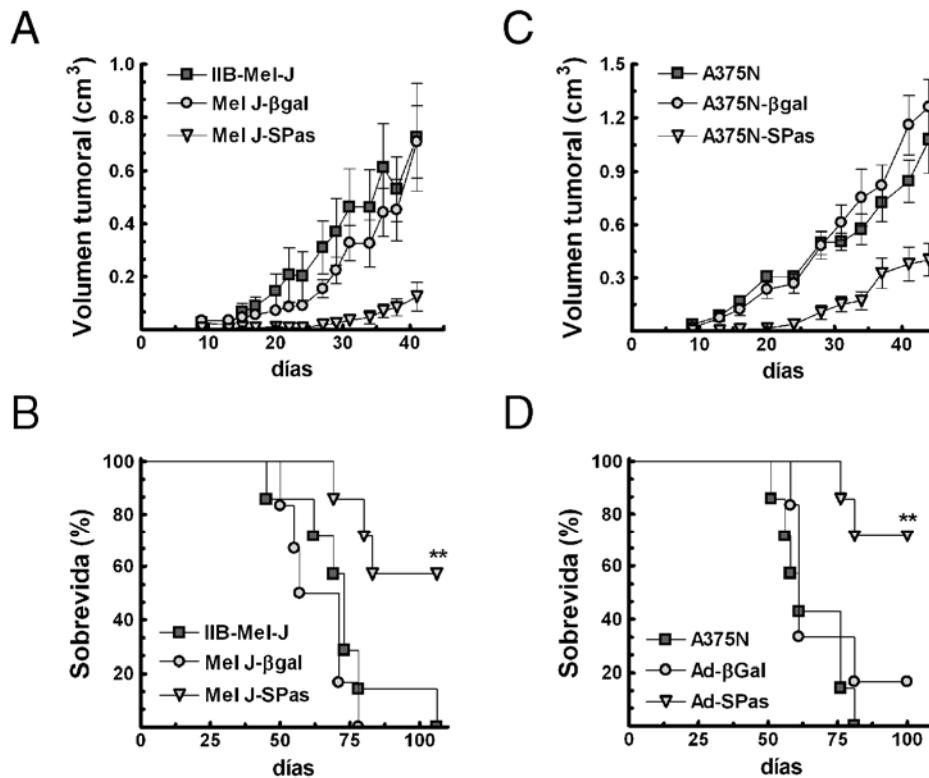
En trabajos previos nuestro laboratorio demostró concluyentemente que la reducción de los niveles de SPARC mediante la expresión estable de ARN antisentido era suficiente para gatillar un rechazo tumoral en un modelo de melanoma humano (Ledda *et al.*, 1997a). Si bien en el trabajo se describía un potente infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección de naturaleza polimorfonuclear (PMN), no se llegó a determinar si el evento era causa o consecuencia del rechazo. Todo hacía suponer que los PMN eran efectores, pero no fue hasta el trabajo de Alvarez *et al* que se confirmó que la disminución de SPARC activaba la inmunidad innata del hospedador (Alvarez *et al.*, 2005). En dicho trabajo se describieron en detalle las señales que participan del reclutamiento y activación de los PMN haciéndolos participar del evento de rechazo tumoral. No obstante, necesitábamos determinar si la actividad citotóxica de los PMN, como efectores, era suficiente para rechazar al tumor con expresión de SPARC disminuida. Es precisamente en este punto donde retomamos los resultados de este trabajo.

En primer lugar, realizamos estudios de cinética de crecimiento tumoral utilizando ambas líneas de melanoma. Tanto las A375N como las IIB-Mel-J fueron transducidas con  $5.10^8$  DICT50/ml de los vectores Ad-SPas, Ad- $\beta$ gal y el control de transducción simulada. Confirmando estudios previos de nuestro laboratorio (Alvarez *et al.*, 2005; Ledda *et al.*, 1997a), las células de melanoma que expresan niveles reducidos de SPARC (Mel J-SPas) muestran una importante inhibición de su capacidad de crecimiento *in vivo* en ratones nude comparada con el control Mel J- $\beta$ gal o con la transducción control de células de melanoma (**Figura 26A**). Llamativamente, el 50 % de los ratones inyectados con Mel J-SPas sobrevivió a los 100 días de ensayo; momento en el que 90 a 100 % de los animales control se encontraban muertos (**Figura 26B**). Efectos similares fueron observados con las células A375N (**Figura 26C y D**).

La disminución transiente de SPARC confirmó los resultados obtenidos anteriormente con células modificadas de manera estable (Alvarez *et al.*, 2005). La inhibición del

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

crecimiento tumoral, liderada por el vector antisentido de SPARC, fue acompañada de la aparición de infiltrado inflamatorio para los xenotransplantes de células IIB-Mel-J (Figura 27A y B) y un incremento del 400 % en el reclutamiento intratumoral de PMN en el caso de los tumores A375N (Figura 27C y D). En el caso de las células IIB-Mel-J el infiltrado intratumoral de PMN es exclusivo del tratamiento con el Ad-SPas ya que en los controles solo se observaron células del sistema inmune en la periferia tumoral (Figura 27B).

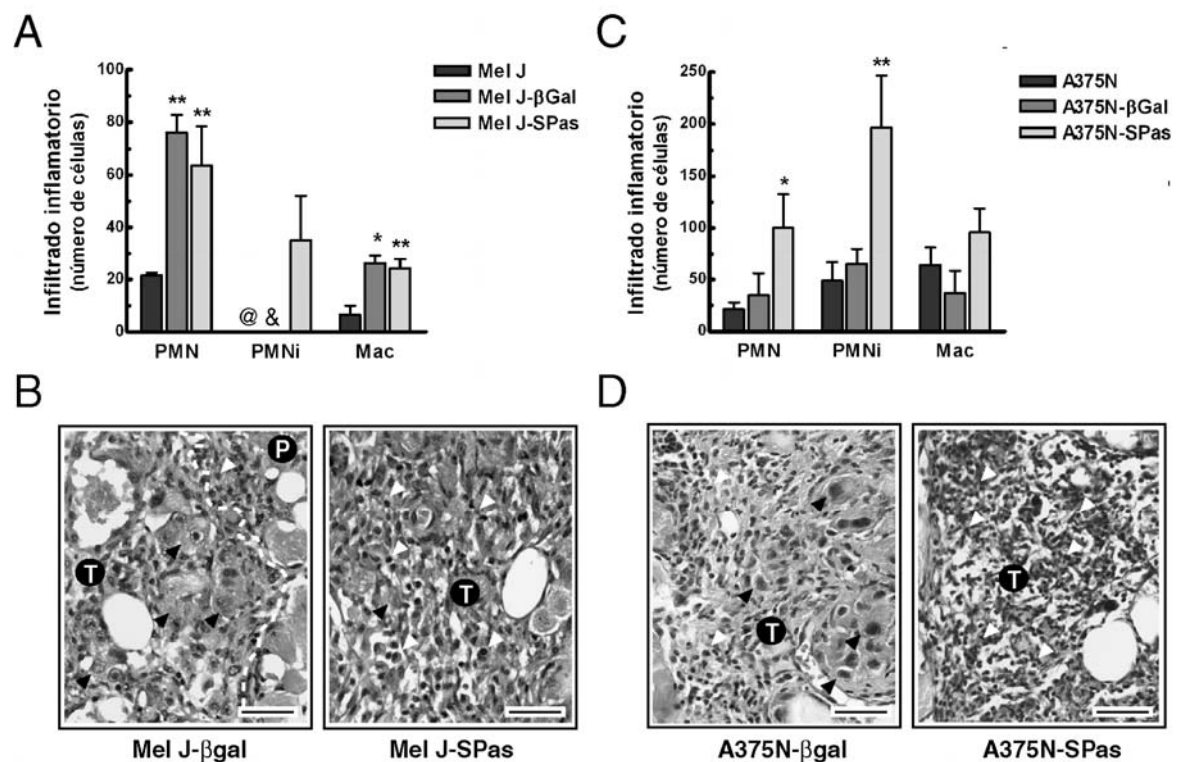


**Figura 26** La disminución transiente de SPARC inhibe la capacidad de crecimiento tumoral *in vivo*. (A) Las células IIB-Mel-J transducidas *ex vivo* con los distintos vectores fueron xenotransplantadas en los ratones *nude*. (B) Curva de supervivencia del mismo experimento. (C) Las células A375N transducidas *ex vivo* con los distintos vectores fueron xenotransplantadas en los ratones *nude*. (D) Curva de supervivencia del mismo experimento mostrado en C. El volumen tumoral fue expresado como la media  $\pm$  ES de al menos cinco animales y tres experimentos independientes para cada línea tumoral. \*\*  $p < 0.01$ .

En comparación, las células A375N generan un infiltrado intratumoral *per se* que es cuadruplicado por un efecto específico del transgén terapéutico, produciendo una marcada cariorrexis y picnosis nuclear, signos de una muerte celular patológica o necrosis tumoral (Figura 27C y D). Dado que nuestros estudios previos sugerían que los PMN residentes debían ser los responsables del rechazo de las células malignas, decidimos depletar de PMN a los ratones *nude* aceptores de tumores humanos (IIB-Mel-J) mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal neutralizante. Durante la puesta

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

a punto de la depleción vimos que la administración intraperitoneal de medio condicionado del hibridoma anti-Gr-1 (clon RB6-8C5) depletó al ratón de PMN por 4 días, detectándose el máximo efecto a las 48 hs post-administración (**Figura 28A**). Manteniendo las inyecciones de medio condicionado del clon RB6-8C5 cada tres días, pudimos hacer perdurar la depleción por al menos dos semanas (**Figura 28B**). Paralelamente comprobamos que la utilización de medio condicionado de hibridoma anti-CD4, como control, no provoca un efecto significativo en los niveles de PMN (**Figura 28B**).

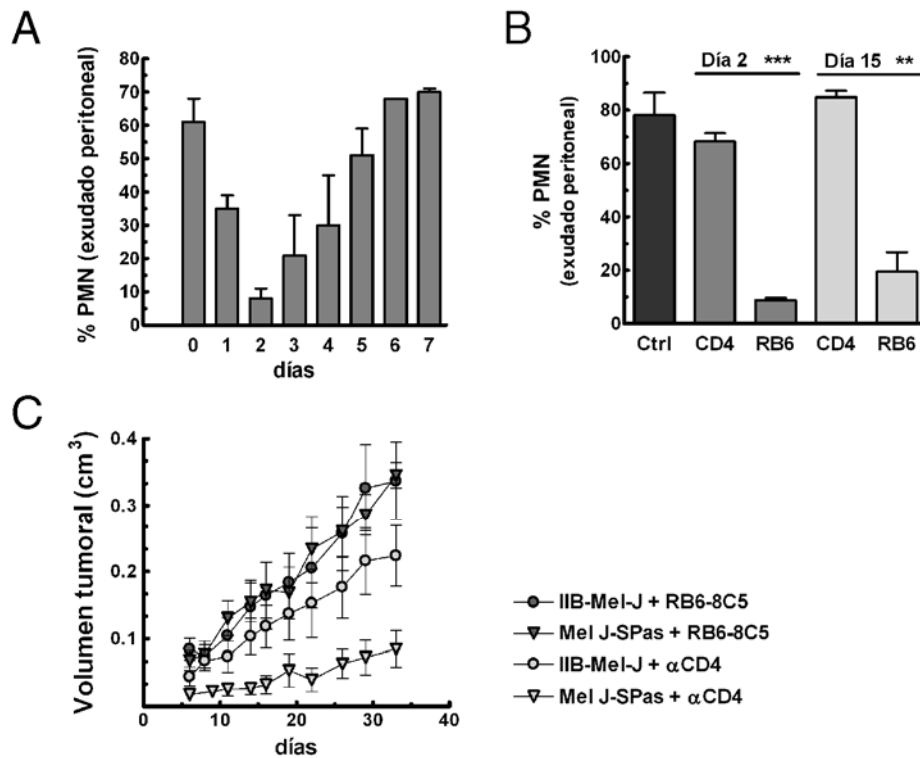


**Figura 27. Infiltrado inflamatorio inducido por la disminución transiente de SPARC.** (A) Sección histológica teñida con H&E a los 5 días, del xenotransplante en ratones *nude*, de células A375N transducidas con el vector Ad-SPas. El aumento muestra un detalle de los PMN intratumorales. (B) Cuantificación del infiltrado inflamatorio en los tumores A375N. (C) Sección histológica teñida con H&E a los 5 días, del xenotransplante en ratones *nude*, de células IIB-Mel-J transducidas con el vector Ad-SPas. El aumento muestra un detalle de los PMN intratumorales. (D) Cuantificación del infiltrado inflamatorio en los tumores A375N. Las barras de los gráficos representan la media  $\pm$  ES de al menos cinco animales para cada tratamiento. La cuantificación fue realizada mediante la sumatoria de 10 campos a 100x para cada sección analizada. Los triángulos negros señalan células tumorales viables y los blancos infiltrado inflamatorio. T: tumor; P: periferia tumoral; PMNi: polimorfonucleares intratumorales; Mac: macrófagos; @ y & corresponden a un valor nulo de infiltrado intratumoral de PMN para la línea IIB-Mel-J control y βgal. La barra negra de las fotografías representa un tamaño de 50  $\mu$ m. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

Al realizar los xenotransplantes de las células transducidas con el Ad-SPas, en ratones depletados con en anticuerpo RB6-8C5, comprobamos que los tumores crecían a niveles comparables a los de las células de melanoma sin tratar (**Figura 28C**). Por el contrario, el

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

tratamiento con el anticuerpo control no produjo ningún efecto en la cinética de crecimiento del melanoma IIB-Mel-J (Figura 28D). Por lo tanto podemos concluir que la administración del anticuerpo anti-PMN (RB6-8C5) revirtió completamente la inhibición del crecimiento del melanoma humano inducida por la disminución de los niveles de expresión de SPARC, indicando que los PMN residentes son los responsables del rechazo del melanoma en este modelo *in vivo*.



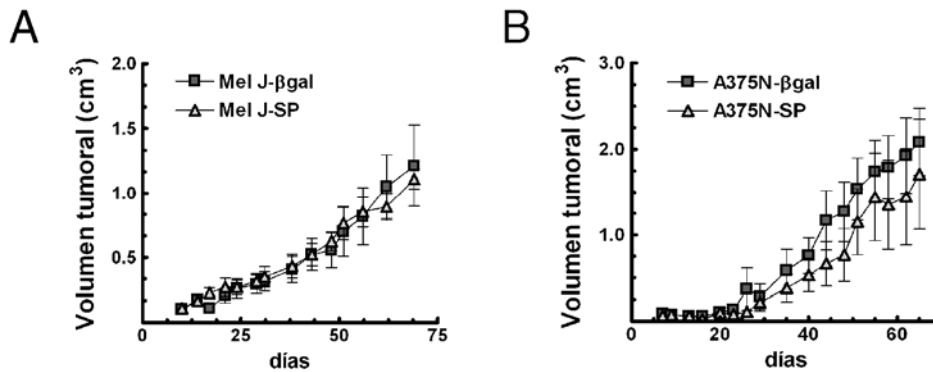
**Figura 28. La depleción de PMN inhibe el efecto antitumoral *in vivo* producido por la disminución transiente de SPARC en el melanoma humano. (A)** Recuento de PMN en el exudado peritoneal de ratones nude tratados con una dosis de medio condicionado del hibridoma RB6-8C5. **(B)** Recuento de PMN inyectando intraperitonealmente (cada 48 hs) anticuerpo anti-PMN o anti-CD4 como control. **(C)** Cinética de crecimiento de las células IIB-Mel-J transducidas *ex vivo* con el Ad-SPas en ratones nude depletados durante 15 días de PMN con el anticuerpo RB6-8C5 y controles (anti-CD4). El volumen tumoral fue expresado como la media  $\pm$  ES de al menos seis animales en dos experimentos. Las barras de A y B representan el porcentaje de PMN sobre las células totales identificadas en frotis de exudados peritoneales teñidos con May Grünwald-Giemsa. \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

La hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma promueve la reorganización del estroma sin afectar su crecimiento *in vivo*

Nuestros datos previos demostraron que el crecimiento del melanoma en esferoides resultó significativamente inhibido al hiperexpresar SPARC. Con la idea de establecer si la hiperexpresión de SPARC podría también alterar el crecimiento *in vivo* de las células de melanoma, realizamos xenotransplantes en ratones *nude* con células de melanoma

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

transducidas *ex vivo* con el Ad-SP. A diferencia de lo obtenido con los esferoides, la hiperexpresión de SPARC en las células A375N no mostró alteraciones en la cinética de crecimiento *in vivo* comparado con las células control transducidas *ex vivo* con el Ad- $\beta$ gal (Figura 29A). Similares resultados fueron obtenidos con la línea IIB-Mel-J (Figura 29B).

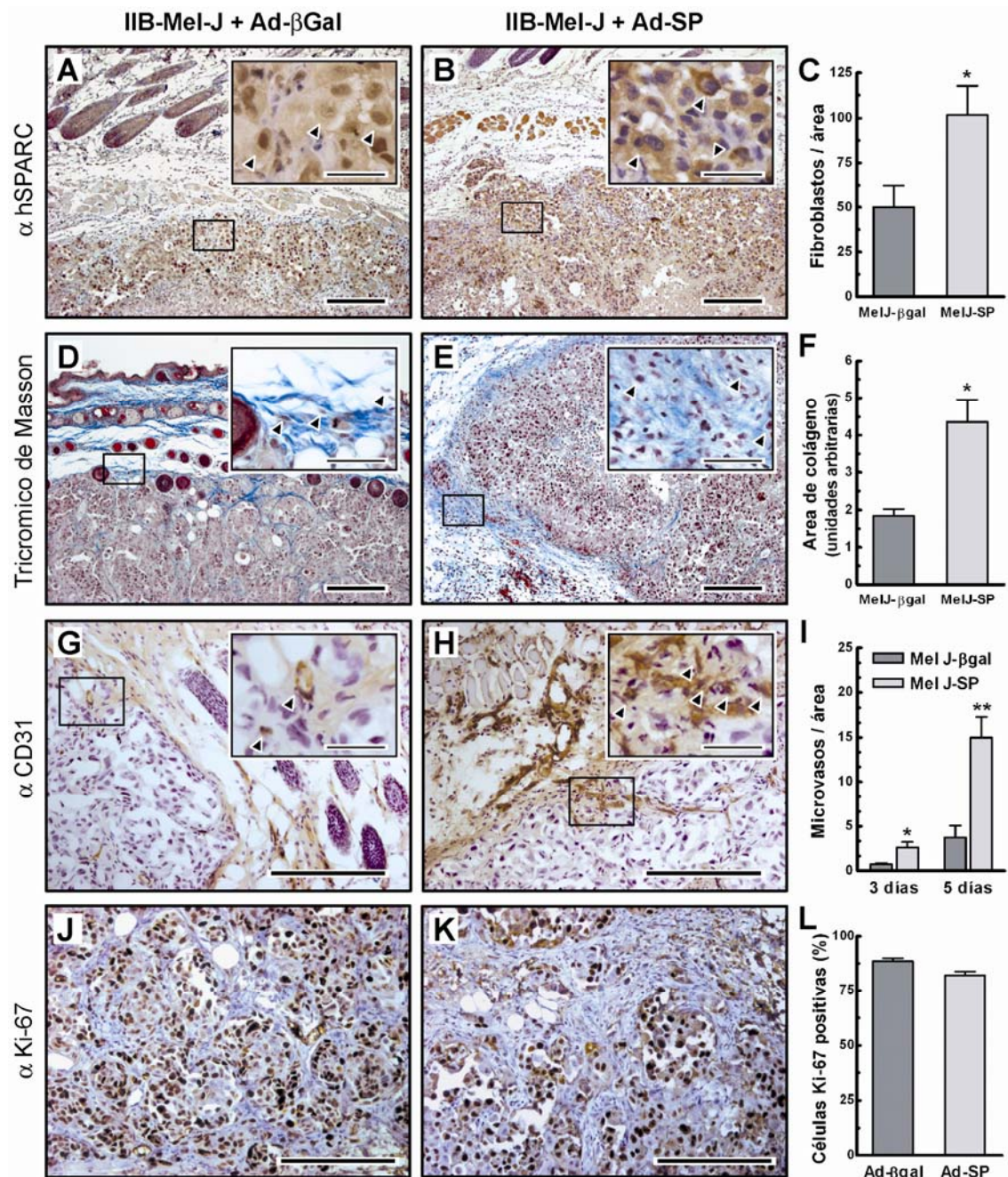


**Figura 29. El aumento de la expresión de SPARC en el melanoma humano no afecta su capacidad de crecimiento *in vivo*.** (A) Cinética de crecimiento *in vivo* de las células A375N transducidas con el vector Ad-SP. (B) Crecimiento *in vivo* de las células IIB-Mel-J transducidas con el vector Ad-SP. El volumen tumoral fue expresado como la media  $\pm$  ES de al menos cinco animales y tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

Sin embargo resultó muy interesante comparar las claras diferencias histológicas encontradas en las muestras de animales inyectados con tumores hiperexpresando SPARC vs. el control con Ad- $\beta$ gal (Figura 30A y B). La hiperexpresión de SPARC por parte de las células de melanoma fue acompañada por un importante incremento en la cantidad de fibroblastos localizados principalmente en la periferia del tumor e inmersos en un área rica en colágeno (Figura 30C). De hecho, la tinción de tricrómico de Masson reveló un incremento de dos veces en la deposición de colágeno circundante en aquellos tumores que hiperexpresaban SPARC comparados con los tumores control (Figura 30D-F). Como ya mencionamos, el colágeno depositado fue observado principalmente en la interfase entre los nidos malignos de la periferia tumoral y el estroma subyacente del hospedador (comparar Figuras 30D y E). Al medir la activación de los fibroblastos inmersos en el colágeno depositado (usando la actina de músculo liso, SMA, como marcador) no encontramos diferencias entre los distintos tratamientos. Llamativamente, la tinción de hematoxilina-eosina mostró un proceso angiogénico activo en aquellos tumores tratados con el vector Ad-SP. Por lo tanto, para confirmar y poder cuantificar dicho fenómeno decidimos realizar inmunotinciones con anti-CD31 (marcador de neovascularización). El incremento en la angiogénesis consistió en un aumento en la densidad de microvasos en aquellos tumores que hiperexpresaban SPARC (Figura 30G y H). Si bien esta diferencia se hizo evidente a los tres días post-

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

inyección de las células transducidas, a los cinco días mostró su máximo en el recuento de microvasculatura (Figura 30I). Seguidamente analizamos la proliferación *in vivo* de las células de melanoma utilizando el anticuerpo Ki-67. Este anticuerpo marca las células que se encuentran ciclando y, por ende, proliferando.

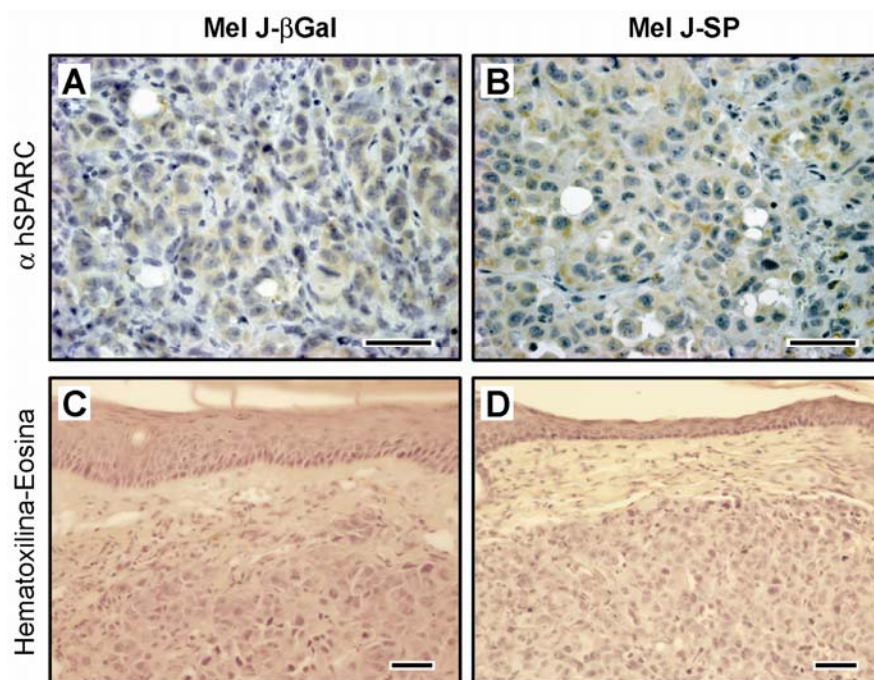


**Figura 30. La hiperexpresión de SPARC en los tumores de melanoma genera un incremento en la deposición de colágeno, la angiogénesis y el reclutamiento de fibroblastos sin afectar su cinética de crecimiento. (A)** Expresión de SPARC medida por inmunohistoquímica en las células MelJ-βgal. **(B)** Inmunohistoquímica anti-SPARC en las células MelJ-SP. Las flechas muestran la hiperexpresión de SPARC principalmente en el citoplasma. **(C)** Cuantificación de los fibroblastos reclutados en el área periférica al tumor. **(D-E)** Tinción tricrómica de Masson en las células control y las células tratadas con Ad-SP respectivamente. Las flechas negras señalan fibroblastos inmersos en colágeno. **(F)** Cuantificación del área de deposición de colágeno circundante al tumor. **(G-H)** Inmunohistoquímica anti-CD31 en los tumores control

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

y tratados con Ad-SP. Las flechas negras dentro de los inset señalan la microvasculatura incluida en una de las áreas de recuento. **(I)** Cuantificación de los capilares y microvasos presentes en cada tratamiento a los tres y cinco días post-inyección de las células tumorales. **(J-K)** Inmunohistoquímica anti-Ki67 de los tumores control y tratados con Ad-SP. **(L)** Recuento de células en proliferación (Ki67-positivas) en los distintos tratamientos. Los datos presentados en C, F, I y L se encuentran expresados como la media  $\pm$  DS (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ ). En todas las fotos, los rectángulos señalan el área magnificada en el inset. Las barras negras representan un tamaño de 200  $\mu\text{m}$  mientras que las barras de los insets representan 50  $\mu\text{m}$ . Salvo el caso de la vasculatura a 72 hs todas las muestras se colectaron 5 días post-inyección del tumor.

Estas inmunohistoquímicas no mostraron diferencias en las tasas de proliferación, confirmando una vez más que el efecto inhibitorio de la proliferación al hiperexpresar SPARC no se visualiza *in vivo* (**Figura 30J-L**). Finalmente decidimos evaluar estos mismos parámetros a largo plazo. Llamativamente, las autopsias de los ratones a los 40 días no mostraron diferencias ni en la cantidad de vasos macroscópicos (cuantificados por H&E), ni en el reclutamiento de fibroblastos intra o peritumorales ni en la deposición de colágeno adyacente al tumor (visualizado como tejido conectivo laxo) (**Figura 31A y B**).



**Figura 31. La reorganización del estroma liderado por la hiperexpresión de SPARC es un evento temprano que no se visualiza a los 40 días del xenotransplante. (A)** Inmunohistoquímica de SPARC en autopsias de xenotransplantes de Mel J-βgal a los 40 días post-inyección. **(B)** Ídem células Mel J-SP. **(C)** Hematoxilina&Eosina en los tumores Mel J-βgal y **(D)** Mel J-SP. Las barras negras representan un tamaño de 50  $\mu\text{m}$ .

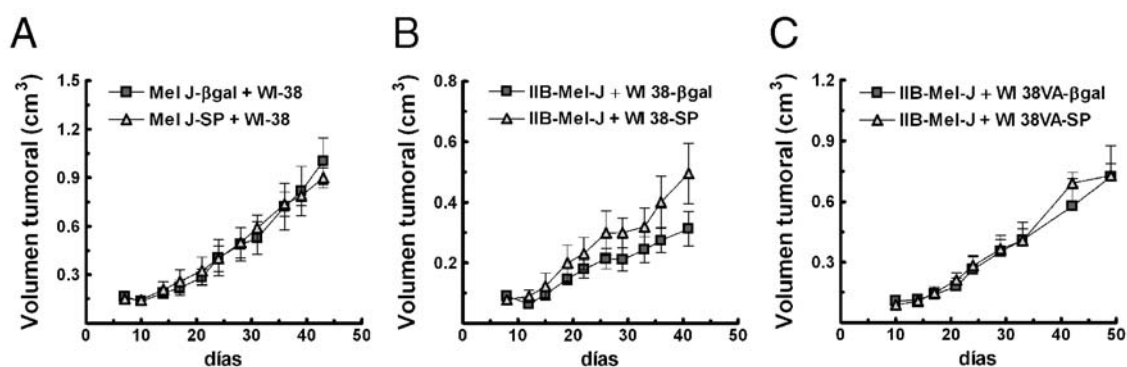
A pesar que los tumores generados durante una hiperexpresión transiente de SPARC no manifestaban a largo plazo diferencias en su estructura y tamaño respecto de los controles decidimos evaluar si los mismos poseían una capacidad metastásica

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

aumentada. Para ello, animales con tumores Mel J-SP y Mel J- $\beta$ gal de 50 días fueron operados para extirparle el tumor primario. A pesar del tamaño de los tumores y del compromiso local del peritoneo más del 80 % de los ratones sobrevivió a la operación. Dichos animales fueron sacrificados a los 90 días post-operación para la realización de una autopsia. En ninguno de los órganos analizados (cerebro, pulmón, hígado, intestino y cavidad abdominal) se encontraron histológicamente comprometidos con metástasis. Este resultado confirmó que incluso la capacidad metastásica de los tumores hiperexpresando SPARC no se encontraba aumentada. En su conjunto, estos resultados indican que, a pesar de haber observado importantes cambios en la arquitectura y composición del estroma circundante, la hiperexpresión transiente de SPARC no altera la cinética de crecimiento ni la progresión tumoral.

### La co-administración de fibroblastos hiperexpresando o no SPARC no afecta la progresión tumoral

A pesar de que los resultados *in vivo* demostraron que los niveles aumentados de expresión de SPARC producido por las células de melanoma no modificaron el crecimiento tumoral, se podía argumentar que las células humanas de melanomas podían haber sido incapaces de establecer interacciones con el estroma murino. Sobre esta presunción iniciamos estudios tendientes a establecer si la co-inyección de células de melanoma *in vivo* combinadas con fibroblastos humanos podía modificar su crecimiento y si cambios en los niveles de expresión de SPARC en los fibroblastos podía tener algún efecto. Inicialmente transdujimos células IIB-Mel-J *ex vivo* con Ad-SP y las co-inyectamos en ratones *nude* con una cantidad equivalente de fibroblastos WI-38. En la figura 32 mostramos que la co-administración de fibroblastos WI-38 no afectó la capacidad de crecimiento *in vivo* de las células Mel J-SP comparado con el control Mel J- $\beta$ gal co-administrado con las WI-38 (Figura 32A).



**Figura 32. La coadministración de fibroblastos expresando o no SPARC no tienen efecto alguno sobre el crecimiento de las células de melanoma *in vivo*. (A)** Cinética de crecimiento de fibroblastos humanos WI-38 co-inyectados en ratones *nude* con células de la línea IIB-Mel-J transducidas con Ad- $\beta$ gal o Ad-SP. **(B)**

## Resultados – SPARC y estroma tumoral

Cinética de crecimiento de células IIB-Mel-J co-inyectadas con fibroblastos WI38-βgal o WI38-SP. **(C)** Células IIB-Mel-J co-inyectadas en ratones *nude* con fibroblastos WI38 VA-βgal o WI38 VA-SP. El volumen tumoral fue expresado como la media ± ES. Se utilizaron al menos cuatro ratones por tratamiento y se realizaron dos ensayos independientes de cada experimento.

En concordancia con los datos obtenidos en experimentos *in vitro* con esferoides, la hiperexpresión de SPARC en fibroblastos WI-38 no tuvo efecto sobre el crecimiento *in vivo* de la línea de melanoma IIB-Mel-J parental (**Figura 32B**). Con el objeto de establecer si la co-administración de fibroblastos transformados podría tener algún efecto diferencial, decidimos co-inyectar células IIB-Mel-J con WI-38 VA (una variante de de los WI-38 establemente transformada con el antígeno T del SV40) transducidas *ex vivo* con el vector Ad-SP. En la figura 32 también mostramos que la hiperexpresión de SPARC en células WI-38 VA no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de células IIB-MEL-J (**Figura 32C**). Este grupo de experimentos mostró en su conjunto que la hiperexpresión de SPARC en fibroblastos no tiene efecto sobre el crecimiento del melanoma *in vivo*.

## Resultados (Capítulo II)

### Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

#### Búsqueda del receptor: Sistema de los dos híbridos en levadura e inmunoprecipitaciones magnéticas

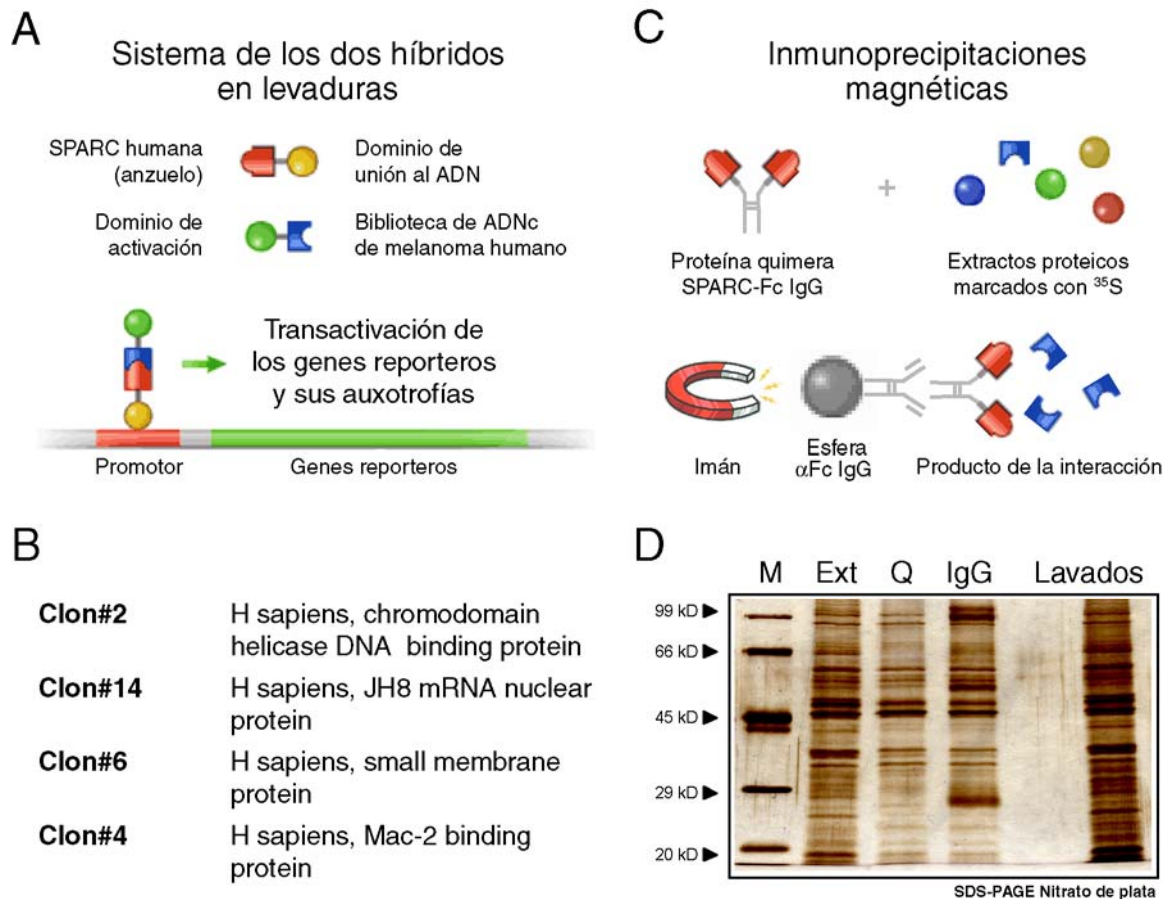
En la introducción hemos descrito un gran número de **interacciones moleculares** en las que SPARC está involucrada. La seroalbúmina bovina, ciertos factores de crecimiento, otros componentes de la MEC, cationes bivalentes, etc; componen una larga lista con una importante ausencia. La existencia de un **receptor** continúa siendo, a más de 20 años del descubrimiento de su ligando uno de los más importantes vacíos de conocimiento en el estudio básico de la proteína SPARC.

Si bien la búsqueda de interacciones proteicas no figura explícitamente dentro de los objetivos de esta tesis, es importante destacar que ha sido una de las metas buscadas en el periodo de mi doctorado. Como parte del trabajo de beca pusimos en marcha un *screening* o búsqueda sistemática de nuevas y posibles interacciones mediante el **sistema de los dos híbridos en levaduras** (Fields and Song, 1989) utilizando hSPARC como anzuelo y una biblioteca de melanoma humano como blanco (**Figura 33A**). Paralelamente se construyó y purificó, a partir del cultivo de células de hámster, una molécula quimera entre SPARC humana y la región constante de la inmunoglobulina G de ratón con el objeto de inmunoprecipitar extractos de distintos linajes celulares (**Figura 33C**). Lamentablemente ninguna de las estrategias utilizadas arrojó resultados positivos confiables que nos permitieran crear nuevas líneas de investigación abocadas a la identificación y validación de las moléculas candidatas involucradas en el accionar de SPARC.

En el caso del sistema de los dos híbridos de levaduras encontramos que hSPARC transactivaba los reporteros sin interactuar con un ligando (dato no mostrado). Es decir, nuestro anzuelo, SPARC, estaba funcionando como factor de transcripción. Este resultado fue confirmado y publicado posteriormente por Sodek y colaboradores (Sodek *et al.*, 2002). Modificando las condiciones del ensayo pudimos disminuir la transactivación del sistema para obtener una pequeña lista de candidatos interactuantes

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

de SPARC (**Figura 33B**). Aunque interesantes, las proteínas identificadas no fueron obtenidas en más de una oportunidad dentro del *screening*, hecho que invalidó técnicamente la búsqueda realizada.



**Figura 33. Estrategias utilizadas inicialmente para la búsqueda de moléculas interactuantes de SPARC.** (A) Sistema de los dos híbridos en levadura. Como anzuelo, SPARC humana (en rojo) fue clonada junto al dominio de unión al ADN (en amarillo) mientras que la biblioteca ADNc de células IIB-Mel-J (en azul) fue clonada en fase con el dominio de activación del sistema. (B) Clones positivos aislados a partir del sistema de los dos híbridos y secuenciados para su identificación. (C) Inmunoprecipitación magnética de extractos totales y de membrana de células HeLa utilizando la proteína quimera bivalente SPARC-FcIgG1 de ratón. (D) SDS-PAGE de las proteínas aisladas como diferenciales para la interacción de SPARC humana. M: marcador de peso; Ext: extracto proteico total; Q: proteínas que interactúan en presencia de la quimera; IgG: proteínas que interactúan en presencia de una IgG control; Lavados: proteínas que se liberan luego de lavar con condiciones astringentes.

Para la realización de experimentos de precipitación de moléculas interactuantes con SPARC, a partir de lisados celulares, y sospechando por evidencias previas que la afinidad de dicha interacción debía ser baja, decidimos construir una versión recombinante modificada de SPARC. La avidéz de interacción de muchas proteínas e incluso de ciertos factores de crecimiento puede ser aumentada considerablemente mediante la construcción de una proteína quimera entre dicha molécula y las regiones

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

constantes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Siguiendo esta línea de pensamiento, en nuestro laboratorio clonamos la quimera de SPARC humana-FcIgG1 de ratón en un plásmido de expresión eucariota. Mediante la transfección de células CHO, seleccionamos clones y purificamos la proteína recombinante quimera de cultivos en suspensión. Utilizando distintos extractos celulares marcados radiactivamente (proteínas totales y extractos de membrana plasmática), realizamos inmunoprecipitaciones magnéticas con microesferas metálicas acopladas a anticuerpos anti-IgG1 de ratón (**Figura 33C**). Lamentablemente en ninguna de las muchas condiciones de inmunoprecipitación probadas se pudo identificar de manera consistente bandas diferencialmente adheridas a la proteína quimera respecto de los controles (**Figura 33D**).

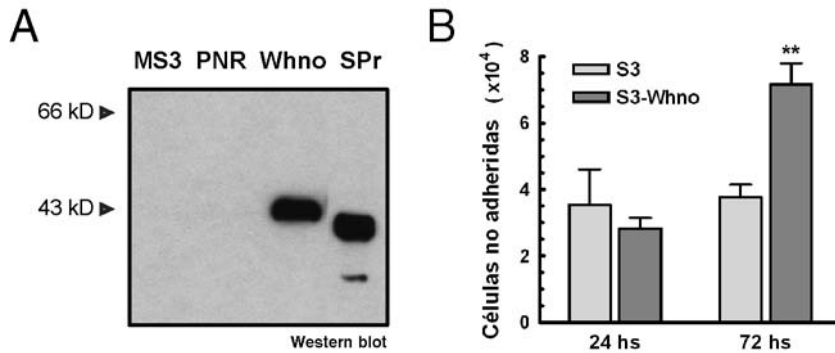
### SPARC en *Drosophila melanogaster*

Dados los infructuosos intentos de encontrar interacciones novedosas de SPARC por las técnicas mencionadas, decididos utilizar un sistema biológico mas “sencillo” que nos permitiera abordar con éxito el estudio de las interacciones que le permiten a SPARC lograr su efecto. Este cambio de estrategia se relacionó con una observación experimental que modificaría el rumbo de esta línea de investigación. Durante la preparación de nuestra proteína recombinante humana (Whno), extensamente descrita en la primer sección de los resultados de esta tesis, realizamos un interesante descubrimiento. La línea de células de *Drosophila melanogaster* S3, productoras de la proteína recombinante, poseían una adherencia llamativamente menor que las transfectadas con el vector control (**Figura 34A y B**). ¿Podría tener SPARC humana un efecto biológico antiadhesivo sobre las células de mosca? Ese interesante interrogante nos llevó a pensar que posiblemente SPARC, en el sistema de *Drosophila*, tendría actividades biológicas conservadas respecto de su homólogo en mamíferos<sup>15</sup>, convirtiendo al modelo en un interesante y nuevo sistema de estudio. Si bien la proteína endógena de *Drosophila* está muy poco descrita (Martinek *et al.*, 2002), la secuenciación completa del genoma de esta mosca ha permitido estudiar y confirmar la conservación de varias proteínas de la matriz extracelular, muchas de las cuales han mostrado interactuar con SPARC en vertebrados y especialmente en mamíferos. El hallazgo de un sistema de estudio *in vivo* más simple que el de mamíferos, en cuanto al número de componentes, podría ayudar a determinar la participación de SPARC en

<sup>15</sup> Es común observar este tipo de preguntas planteada de la manera opuesta. Es decir, si la función en mosca se encuentra conservada en mamíferos. En nuestro caso estábamos tratando de encontrar un sistema más simple para la búsqueda de interacciones génicas por lo que dicho planteo “mira hacia atrás” en la filogenia.

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

alguna vía de señalización y, posiblemente, permitiría identificar nuevos ligandos aún no descriptos.



**Figura 34. Las células de *Drosophila* S3 que expresan SPARC humano pierden adherencia al sustrato. (A)** Producción de SPARC humano (Whno) en medio condicionado de células S3 transfectadas con la construcción Whno. **(B)** Cuantificación de la adhesión al sustrato mediante el recuento de células despegadas luego de 48 hs de cultivo. Las barras representan la media del número de células despegadas  $\pm$  SE para cada grupo analizado. MS3: medio condicionado de las células S3 sin modificar; PNR: medio condicionado de células S3 produciendo una proteína no relacionada; SPr: SPARC recombinante producida en *E. coli* como control. \*\*  $p < 0.01$

## Fenotipos en el desarrollo de *Drosophila* asociados a la pérdida de función de dSPARC

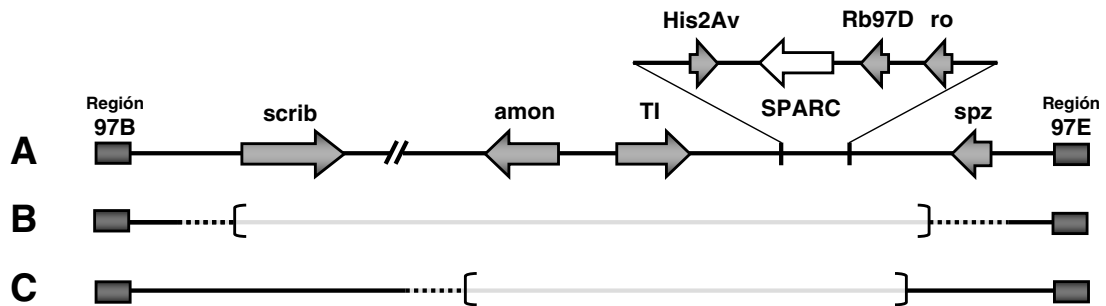
Con la estrecha colaboración del laboratorio del Dr. Pablo Wappner (Instituto Leloir), decidimos adoptar el modelo de *Drosophila melanogaster* como herramienta para intentar establecer las vías de señalización involucradas en el accionar de SPARC y *a posteriori* buscar sus homólogos en mamíferos.

En el modelo de *Drosophila*, es corriente la creación o utilización de mutantes nulos de un gen de interés con el fin de determinar el rol específico de uno o de varios genes durante la vida de la mosca muchas veces involucran la selección o creación de mutaciones en el gen de interés. Debido a que en *Drosophila* es complicado metodológicamente aplicar la disrupción génica dirigida por recombinación homóloga, las mutaciones en un gen particular rutinariamente se obtienen por mutagénesis al azar seguida de selección genética (Misquitta and Paterson, 1999).

Hasta la fecha no existían mutantes disponibles para SPARC en *Drosophila* (Consortium, 2003). Para realizar un estudio preliminar sobre los efectos de la pérdida de función de SPARC, decidimos emplear deleciones cromosómicas. Para ello se realizó una búsqueda en bases de datos de las deleciones que incluyen la región 97D5 del brazo derecho del cromosoma 3 donde se encuentra dSPARC. Se seleccionaron 2 líneas para el análisis de pérdida de función (Figura 34 y Tabla 3). La línea 1911 portadora de la deleción Df (3R)

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

Tl-I<sup>16</sup>, la llamaremos de ahora en más **Tl-I**, y la línea 2198 portadora de la deleción Df (3R) ro80b, la llamaremos **ro80b**.



**Figura 34. Deleciones cromosómicas que incluyen la región 97D5.** (A) Se representa una porción del brazo derecho del cromosoma 3 salvaje. (B) Esquema correspondiente a la deleción cromosómica teórica de la línea Tl-I. (C) Esquema de la deleción teórica de la línea ro80b. Solo se incluyeron algunos de los genes localizados en el intervalo 97B-97E. Las flechas en el cromosoma salvaje indican el sentido de la transcripción de cada gen. El locus de SPARC mapea en 97D5. Las líneas de puntos representan las zonas delecionadas. Entre paréntesis se indica la zona de incertidumbre para los límites de la deleción. Fuente Cytosearch, FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/maps/cytosearch.hform>).

Nombre de la deleción	Rango (regiones citológicas)	Tamaño	ESTs (*)	Genes incluidos (*) (mapeados molecularmente)
<b>Tl-I</b> <b>Df (3R) Tl-I</b> <b>(Bloomington</b> <b>línea-1911)</b>	<b>097B;097E</b>  Límite izquierdo por citología.  Límite derecho por inclusión de TI, Rb97D y spz y citología.	900 kb	143	<b>Deleciona:</b> E(rst)A5; E(rst)B6; E(rst)B37; E(rst)B47; E(rst)B80; E(rst)B203; E(rst)B246; E(rst)C6; E(rst)C14; E(rst)C41; E(rst)C45; E(rst)C109; E(rst)C137; E(rst)C317; E(rst)C329; E(rst)C383; E(rst)C389; E(rst)C532; E(rst)D19; E(rst)D151; E(rst)D184; E(rst)D187; E(rst)H54; E(rst)H74; E(rst)H125; E(rst)I2; E(rst)I12; E(rst)I19; Rb97D; TI; spz  <b>No deleciona:</b> I(3)mbt; I(3)rk344
<b>ro80b</b> <b>Df (3R) ro80b</b> <b>(Bloomington</b> <b>línea-2198)</b>	<b>097D01;097D02</b>  Límite izquierdo por inclusión de amon.  Límite derecho por inclusión de ro y falta de inclusión de spz.	285 kb	53	<b>Deleciona:</b> Ets97D; amon; doc; TI; I(3)97Db; I(3)lk11; I(3)lk12; I(3)lk21; I(3)03884; His2Av; ro  <b>No deleciona:</b> I(3)neo59; I(3)03077; spz

**Tabla 3. Deleciones cromosómicas estudiadas.** En negritas se indican los genes representados en la figura 3. (\*) La identidad y el número de genes/ESTs que mapean en la región se obtuvieron mediante el motor de búsqueda *CytoSearch* provisto por el FlyBase.

<sup>16</sup> La notación de genética clásica, especialmente de *Drosophila*, utilizada en esta parte de la tesis puede ser consultada en las publicaciones de Sullivan *et al* y Greenspan *et al* *Fly Pushing: The theory and Practice of Drosophila Genetics*: New York, 1997, Sullivan W, Ashburner M, Hawley S *Drosophila Protocols*: New York, 2000.

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

De acuerdo con la información disponible en el FlyBase, las deleciones cromosómicas seleccionadas poseen en sus límites físicos un rango de incertidumbre tal como se marca en la figura 28. Más aún, en muchos casos esta región es calculada por defecto, es decir, subestimando su tamaño real por varios kilopares de bases. Por dicha razón, decidimos cambiar el balanceador<sup>17</sup> de las líneas portadoras de las deleciones de manera de poder identificar los embriones sin el marcador GFP, es decir homocigotas para la deleción (ver “Caracterización molecular de las deleciones” en la sección de Materiales y Métodos). Con la ayuda de dicho marcador y utilizando PCRs a partir de ADN genómico de embriones únicos, determinamos molecularmente que ambas deleciones incluían el locus de dSPARC de manera inequívoca (**Figura 35A**). Coincidentemente con este resultado, el Western blot de los individuos homocigotas fue negativo comparado con embriones salvajes (*y w*) (**Figura 35B**).

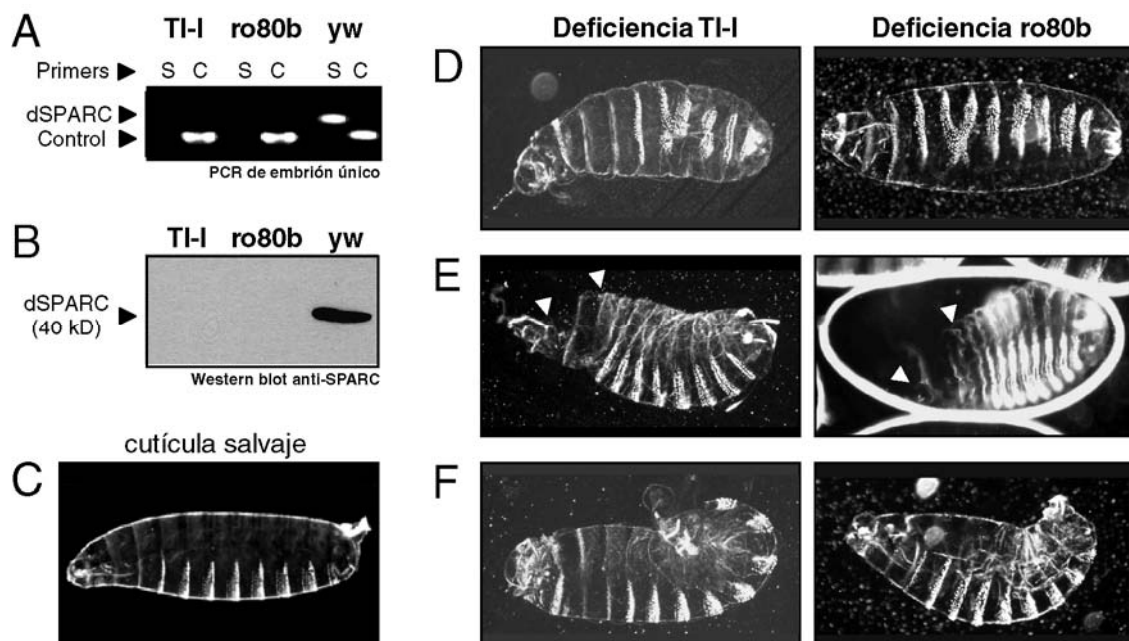
Como parte de la caracterización de las líneas portadoras de las deleciones de dSPARC se estudió la letalidad en individuos homocigotas (individuos sin el marcador del cromosoma balanceador, es decir, GFP-negativos<sup>18</sup>). En ninguna de las deleciones se encontraron adultos desprovistos del cromosoma balanceador, indicando que la letalidad se produce en estadios pre-imaginales. Más aún, todas las pupas y larvas del primer estadio poseían el marcador del balanceador por lo que decidimos estudiar ambas deleciones en estadios más tempranos. Si bien al analizar los huevos encontramos individuos homocigotas para las deleciones en casi todos los estadios, también observamos un llamativo enriquecimiento de embriones homocigotas en últimos estadios del desarrollo, incluso antes de la eclosión, manifestado por su movimiento dentro del huevo. Estos resultados mostraron que las deleciones cromosómicas T1-I y ro80b causan letalidad durante la embriogénesis y, especialmente, en sus últimos estadios de desarrollo. Principalmente por dicha razón decidimos comenzar evaluando las posibles anomalías morfológicas, asociadas a la ausencia de dSPARC, mediante el análisis de uno de los movimientos morfogénicos (ver Anexo de “Movimientos morfogénicos”) más estudiados en el modelo de *Drosophila melanogaster*: **el cierre dorsal**. Durante el cierre dorsal, se ponen en juego migraciones, cambios de forma celular, rearrreglos de citoesqueleto y variaciones en la adhesión del tipo célula-célula y célula-matriz. La preparación de cutículas embrionarias es la

<sup>17</sup> El **balanceador** es un cromosoma con múltiples inversiones (incapaz de recombinar de manera viable) que acompaña a las mutantes o deleciones letales de manera de mantener la línea en heterocigosis Greenspan R *Fly Pushing: The theory and Practice of Drosophila Genetics*: New York, 1997. Los cromosomas balanceadores poseen marcadores fenotípicos lo que permite hacer un seguimiento en las distintas generaciones. En nuestro caso el marcador GFP nos permitió identificar que embriones poseen balanceador o no.

<sup>18</sup> Los individuos homocigotas para el cromosoma balanceador también son letales pero sólo durante las primeras horas de su desarrollo. Fenotípicamente se observan como membranas vitelinas vacías.

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

metodología comúnmente utilizada para evaluar indirectamente el estado del epitelio al momento de la letalidad embrionaria. Los embriones homocigotas de las deleciones Tl-I y ro80b mostraron distintos tipos de anomalías morfológicas (**Figura 35C-F**). En ambas líneas, observamos consistentemente embriones con defectos en el patrón de denticulos (**Figura 35D**), lo que estaría reflejando defectos en el patrón de segmentación (ver Anexo “Patrón de segmentación”). También se observaron cutículas con agujeros dorsales anteriores (**Figura 35E**), producto de fallas en el cierre dorsal asociadas al movimiento de involución de la cabeza de los embriones y, por último, defectos en la retracción de la banda germinal (ver el Anexo de “Movimientos morfogénicos”) (**Figura 35F**).



**Figura 35. Fenotipos de cutículas en embriones homocigotas para las deleciones cromosómicas que incluyen el locus dSPARC.** (A) PCR de embriones únicos para individuos homocigotas de ambas deleciones. (B) Western blot de extractos totales de embriones homocigotas para la deleción Tl-I y ro80b. s: primers para dSPARC y “c” para el gen control. (C) Cutícula salvaje de embrión yw. (D) Embriones homocigotas para las deleciones Tl-I y ro80b con defectos en el patrón de denticulos. (E) Defectos en el cierre dorsal del área frontal. Se observan las mandíbulas desplazadas hacia fuera del individuo. Con flecha blancas se indican los extremos de la región afectada. (F) Fallas en la retracción de la banda germinal. Todos los embriones se muestran con membrana vitelina y ubicados de manera antero-posterior, dorso-ventral (izquierda-derecha, arriba-abajo). Las fotos fueron tomadas en campo oscuro (10x). Estos fenotipos son representativos de al menos tres cruzamientos independientes.

En resumen, ambas deleciones producen fenotipos similares analizados mediante la preparación de cutículas. Además, como la región delecionada en la línea ro80b está incluida dentro de la deleción Tl-I (ver **Figura 34**), se puede concluir que el/los genes involucrados en la aparición de estos defectos se encuentran físicamente localizados en la región mas pequeña (ro80b). Es notable que los cambios fenotípicos observados tienen relación con modificaciones que naturalmente se dan en procesos tumorales:

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

migraciones, rearrreglos de citoesqueleto y variaciones en la adhesión del tipo célula-célula y célula-matriz. De todos modos, si bien nuestro candidato para estos defectos es el gen dSPARC, como mencionamos anteriormente, existen otros genes incluidos en dicha región razón por la cual decidimos seguir adelante con una estrategia que involucre de manera inequívoca el gen dSPARC.

En paralelo a estos estudios iniciamos una colaboración interdisciplinaria en el 6<sup>o</sup> Programa Marco de la Unión Europea. Este programa incluía el estudio de los genes asociados al proceso de cicatrización de heridas para lo cual se realizaron estudios de expresión de genes durante la cicatrización de:

- (a) Heridas en modelos de injertos de piel humana en ratones *nude*
- (b) Heridas en pieles de dos cepas diferentes de ratón y
- (c) Heridas en células asociadas a discos imaginales de *Drosophila*
- (d) Cultivos organotípicos humanos que simulan la cicatrización

Uno de los 70 genes que cambian su expresión en el mismo sentido en todos los modelos es SPARC. Observamos que su expresión disminuye drásticamente en todos los casos durante el inicio del proceso de cicatrización. En base a esto y a nuestros propios estudios preliminares decidimos encarar el análisis de la ganancia de función de SPARC, mediante la fabricación de un individuo transgénico, con la hipótesis de que la hiperexpresión de SPARC debería impedir la correcta cicatrización de una herida o bien afectar drásticamente los movimientos morfogénicos utilizados como modelos de cicatrización en *Drosophila*, como es el caso del cierre dorsal.

### Ingenierización del individuo transgénico para estudios de ganancia de función de dSPARC

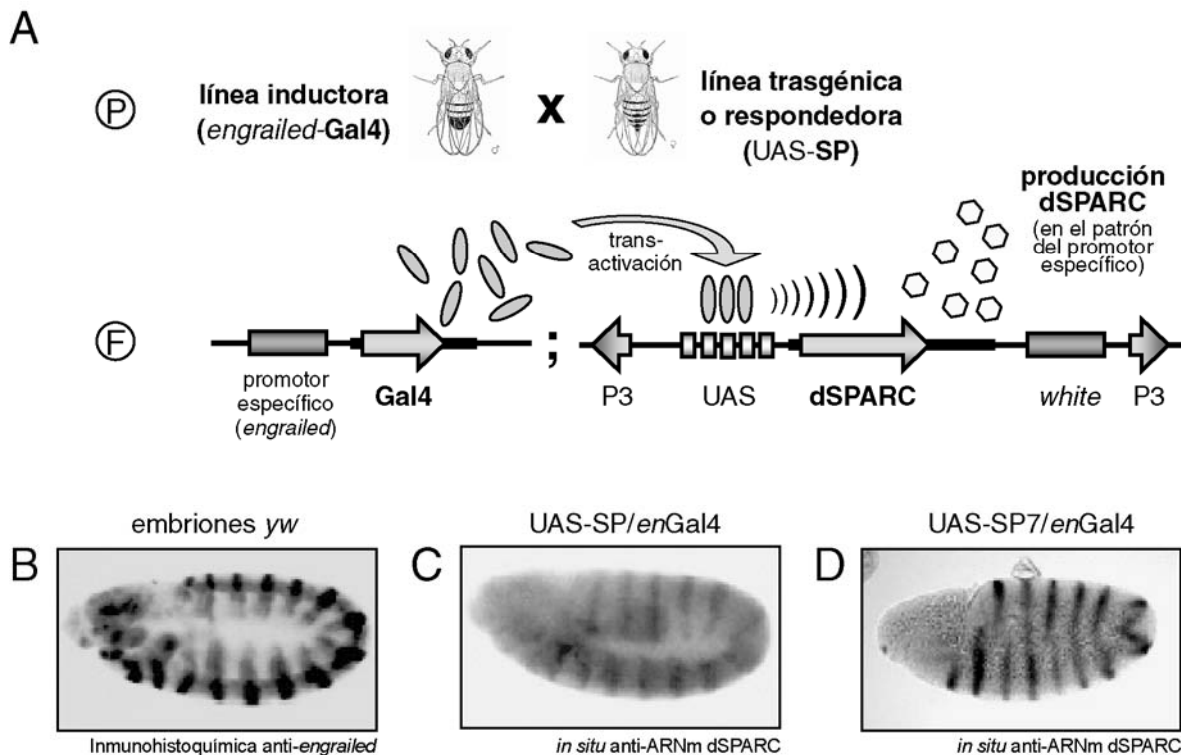
Habiendo caracterizado los fenotipos causados por las deleciones cromosómicas que incluyen al locus dSPARC, decidimos continuar con el estudio de la hiperexpresión de dicha proteína. Para ello, construimos un individuo transgénico<sup>19</sup> capaz de dirigir la hiperexpresión de dSPARC utilizando *in vivo* el sistema Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993).

A partir de un EST solicitado al *Berkeley Drosophila Genome Project* clonamos el ADNc completo de dSPARC en el plásmido CaSpeRUAS (pUAS) de *Drosophila*. El ADNc de dSPARC se clonó río abajo de varios elementos de respuesta a la proteína Gal4, llamado

<sup>19</sup> Si bien tanto las líneas inductoras utilizadas como las líneas UAS-SP creadas en nuestro laboratorio son individuos con transgenes insertados en su genoma, en esta tesis solo llamaremos “**líneas transgénicas**” a las UAS-SP y sus derivadas.

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

UAS (del inglés, *Upstream Activating Sequence*). Mediante la metodología de microinyección de embriones logramos obtener una línea transgénica con el elemento P en el cromosoma III (Figura 36A).



**Figura 36. Hiperexpresión de dSPARC en *Drosophila melanogaster* mediante el sistema GAL4/UAS. (A)** Esquema del sistema Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) utilizado para hiperexpresar dSPARC de manera específica en espacio y tiempo. En la línea inductora se encuentra el locus que genera la expresión de la proteína GAL4 bajo la influencia del promotor específico, mientras que en la línea transgénica o respondedora se encuentra el elemento P portador de la construcción UAS-SP. El individuo resultante "F", producto del cruzamiento de las moscas parentales "P", transactiva la producción de dSPARC en aquellas células donde el promotor de la construcción inductora dirige la expresión de Gal4. (B) Localización de la proteína *engrailed* por Inmunohistoquímica. Hibridación *in situ* del mensajero de dSPARC luego de realizar el cruzamiento de las líneas transgénicas UAS-SP (C) y UAS-SP7 (D) con el inductor de *engrailed* (nótese el "diseño" característico de 14 bandas correspondiente al patrón del promotor inductor). Las fotografías corresponden a microscopía de campo claro (10x). P: líneas parentales. F: individuo de la filial 1 producto del cruzamiento de los parentales. Los óvalos representan la proteína Gal4 y los hexágonos representan la proteína dSPARC producto de la transactivación. Los embriones de las fotos se encuentran en estadio de banda germinal extendida.

Dicho elemento transgénico nos permitiría hiperexpresar dSPARC de manera espacio-temporal específica mediante cruzamientos simples con las líneas inductoras seleccionadas (Figura 36A). Como control del sistema Gal4/UAS se hiperexpresó el transgén en el patrón del gen *engrailed* y, mediante una hibridación *in situ* del mensajero de dSPARC, se verificó su expresión con un patrón idéntico al generado con la sonda para *engrailed*, confirmando el funcionamiento del sistema (Figura 36B). Dado que durante el proceso de generación de la mosca transgénica sólo obtuvimos un individuo (UAS-SP parental o UAS-SP0), decidimos generar nuevas líneas para

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

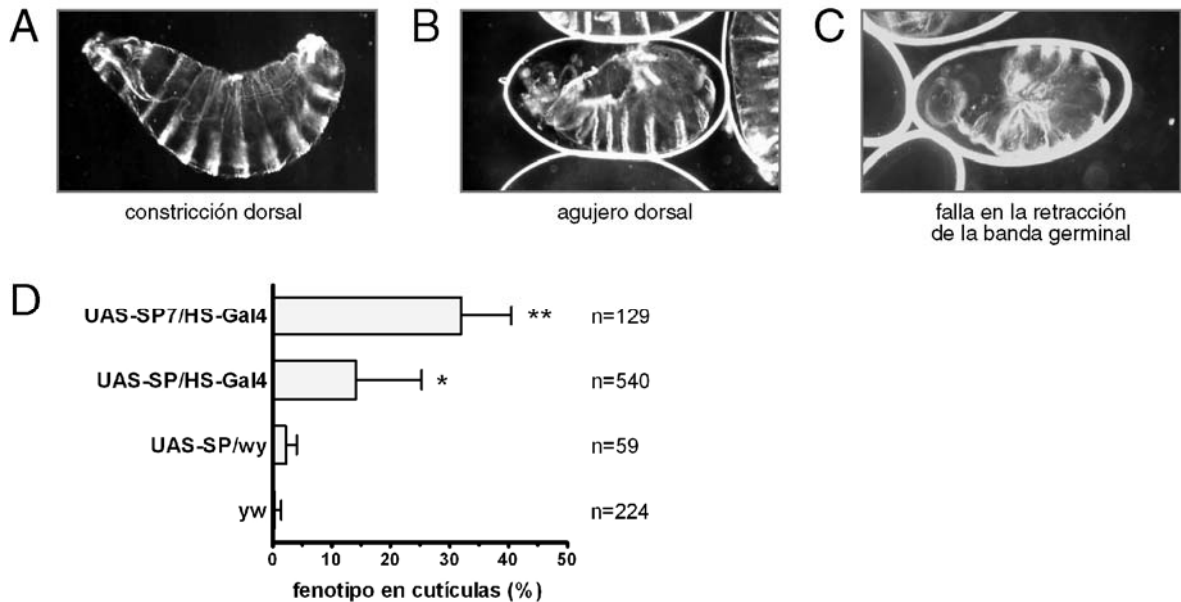
independizarnos de un posible **efecto de posición** que pudiese tener la línea original. Las nuevas líneas se fabricaron por transposición del elemento P original mediante la utilización de la transposasa  $\Delta 3-2$  (ver detalles en Materiales y Métodos). Las transgénicas generadas mediante dicha metodología (UAS-SP5, UAS-PS6 y UAS-SP7) también fueron chequeadas mediante hibridización *in situ* de la hiperexpresión de dSPARC con el inductor *engrailed*-Gal4 observándose el patrón característico de 14 bandas (**Figura 36C y D**).

### La hiperexpresión ubicua de dSPARC genera importantes defectos en el cierre dorsal y la retracción de la banda germinal

Con la mosca transgénica construida optamos por comenzar con la búsqueda de fenotipos hiperexpresando dSPARC de manera ubicua pero controlando el momento de la producción. En el siguiente diseño experimental la inducción de Gal4 estuvo controlada por un promotor activable por temperatura o choque térmico (HS-Gal4). Nuestro diseño para la inducción de dSPARC consistió en realizar ovipuestas cortas de 3 hs, un desarrollo de 5 hs a 25 °C y el choque térmico (30 min a 37 °C antes del estadio 12 del desarrollo), donde la retracción de la banda germinal está ocurriendo activamente y el cierre dorsal comienza minutos después (ver sección anexos “Movimientos morfogénicos”). La preparación de cutículas se realizó a las 24 del final de la ovipuesta. Al utilizar la mosca transgénica UAS-SP encontramos defectos variables (**Figura 37A-C**). Se observaron principalmente anomalías leves como la constricción dorsal (**Figura 37A**) y severas como los agujeros dorsales (**Figura 37B**) y fallas en la retracción de la banda germinal (**Figura 37C**). Los fenotipos de constricción y agujero dorsal mostraron una penetrancia mucho mayor que los fenotipos de falla en la retracción de la banda germinal, posiblemente debido al hecho que dicho movimiento ya se encontraba en marcha cuando se indujo la hiperexpresión mediante el choque térmico. Al repetir los experimentos con otra de las líneas transgénicas (UAS-SP7), observamos que los fenotipos encontrados fueron similares a los obtenidos con la línea UAS-SP original. La incidencia o penetrancia total de los fenotipos observados fue mayor en la línea UAS-SP7 respecto de la UAS-SP (**Figura 37D**). No obstante, teniendo en cuenta los desvíos observados no existieron diferencias significativas entre las líneas, descartando un efecto de posición o inserción. Más aún, como se muestra en la figura 37, las moscas UAS-SP/HS-Gal4 no producen fenotipos a menos que sean inducidas con el tratamiento de choque térmico (**Figura 37D**).

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

Como corolario de los experimentos descritos queda claro que la hiperexpresión de dSPARC afecta diferentes eventos de la morfogénesis embrionaria en *Drosophila melanogaster*.



**Figura 37. La hiperexpresión ubicua de dSPARC en embriones genera importantes defectos en el cierre dorsal. (A)** Fenotipos leves en el cierre dorsal liderados por la hiperexpresión de dSPARC en embriones UAS-SP/HS-Gal4 inducidos con un choque térmico a las 9 hs de su desarrollo. **(B)** Fenotipos severos en el cierre dorsal de (mismo genotipo y tratamiento que en A). Los agujeros dorsales se disponen principalmente en la región anterior de los individuos. **(C)** Retracción de la banda germinal incompleta en embriones UAS-SP/HS-Gal4 e inducidos con un choque térmico de 30 min a las 9 hs de su desarrollo. **(D)** Gráfico de penetrancia de los fenotipos totales encontrados con el inductor HS-Gal4 y las transgénicas UAS-SP y UAS-SP7 con sus respectivos controles. El número total de cutículas analizadas se indica al costado de cada genotipo. Todas las fotos corresponden a fenotipos representativos de al menos 5 experimentos independientes. Microscopía de campo oscuro (10x). Las barras representan el promedio de la fracción de embriones con fenotipos  $\pm$  ES. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  respecto del heterocigota UAS-SP.

Fallas en la retracción de la banda germinal y agujeros en el cierre dorsal pueden ser explicados por defectos en la migración y adhesión entre el tejido epitelial y la amnioserosa (ver “Retracción de la banda germinal” y “Cierre dorsal” en la sección de Anexos). Es por esta razón que nuestro siguiente paso consistió en evaluar el efecto de la hiperexpresión de dSPARC en dichos tejidos.

### Hiperexpresión de dSPARC en los tejidos involucrados en el cierre dorsal del embrión de *Drosophila*

El estudio de los efectos de la hiperexpresión de dSPARC fue realizado mediante la utilización de las líneas inductoras 69B-Gal4 y c381-Gal4, que dirigen la expresión al ectodermo y la amnioserosa respectivamente. En estos experimentos fue agregado, como control, la hiperexpresión de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando los

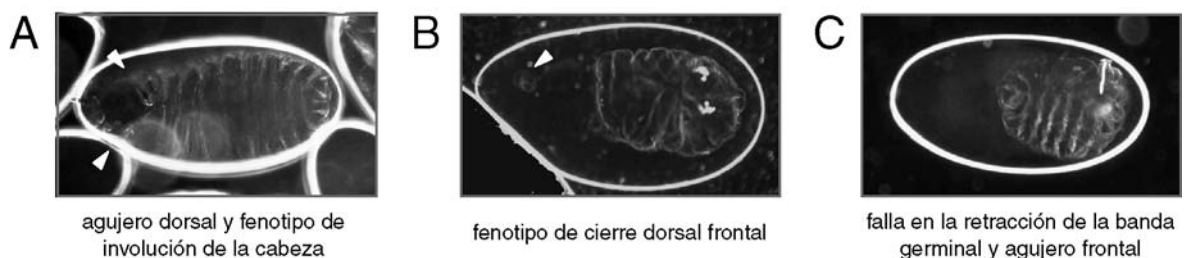
## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

mismos inductores. En ambos tejidos, la hiperexpresión de dSPARC causó fenotipos similares a los obtenidos por inducción ubicua de choque térmico (HS-Gal4). Defectos en el cierre dorsal y en menor medida en la retracción de la banda germinal fueron encontrados en los experimentos de ganancia de función de dSPARC en el ectodermo (Figura 38A-C) y en la amnioserosa (Figura 39A-C). Ni las líneas inductoras, hiperexpresando la proteína Gal4 en el patrón correspondiente, ni los embriones que hiperexpresaron GFP en el ectodermo causaron fenotipos detectables mediante la preparación de cutículas envejecidas (utilizando la línea UAS-*tau*GFP como proteína de fusión). Dicho de otra manera los genotipos control presentaron 100 % de larvas viables.



**Figura 38. La ganancia de función de dSPARC en el ectodermo genera fenotipos en el cierre dorsal y en la retracción de la banda germinal.** La descendencia del cruzamiento de la línea UAS-SP con la línea inductora 69B-Gal4 de ectodermo se dejó desarrollar 48 hs a 25 °C luego de la ovipuesta y los huevos no eclosionados fueron utilizados para preparaciones de cutículas sin retirar la membrana vitelina. **(A)** Agujeros dorsales anteriores (los extremos se indican mediante cabezas de flechas). Obsérvese además que en este embrión también se asocian defectos en el patrón de denticulos centrales. **(B)** Defectos en la retracción de la banda germinal; con cabezas de flecha se señalan los segmentos más caudales de la banda germinal no retraída. **(C)** Un importante número de embriones mostraron letalidad temprana antes del la secreción de cutícula, evidenciado por las membranas vitelinas vacías. Las fotos mostradas son representativas de los fenotipos encontrados en al menos cuatro cruzamientos independientes. Microscopía de campo oscuro (10x).

En todos los experimentos de hiperexpresión observamos un porcentaje de membranas vitelinas vacías (Figura 38C). Mediante la fijación de embriones con igual genotipo y tiempo de desarrollo, observamos que existía una pequeña cantidad de huevos sin fecundar, embriones que llegaban a gastrular, elongaban la banda germinal pero no alcanzaban a secretar cutícula (no mostrado).



**Figura 39. La ganancia de función de dSPARC en la amnioserosa genera fenotipos en el cierre dorsal y en la retracción de la banda germinal.** La descendencia del cruzamiento de la línea UAS-SP con la línea inductora PGawBc3.81-Gal4 de amnioserosa (c381) se dejó desarrollar 48 hs a 25 °C luego de la ovipuesta y

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

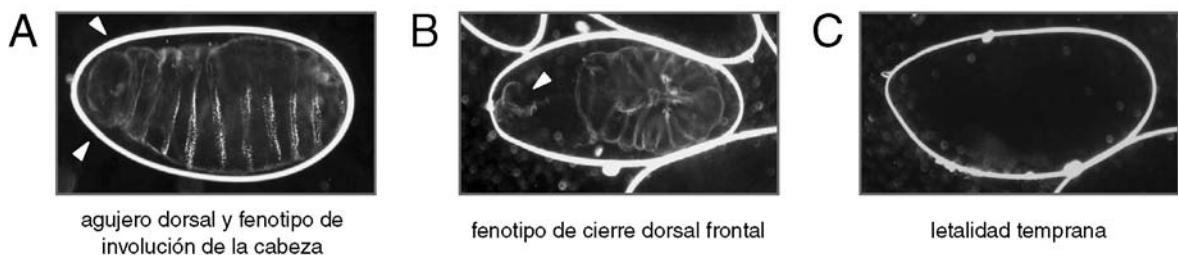
los huevos no eclosionados fueron utilizados para preparaciones de cutículas sin retirar la membrana vitelina. **(A)** Agujeros dorsales anteriores acompañados de anomalías en la involución de la cabeza fueron visualizados. Con cabezas de flecha se indican los extremos del agujero dorsal. **(B)** Fenotipo de cierre dorsal frontal con desplazamiento de mandíbulas. Con cabeza de flecha se marca la mandíbula extendida fuera del individuo. **(C)** Defectos en la retracción de la banda germinal también pudieron ser observados entre los fenotipos más comunes. Las fotos mostradas son representativas de los fenotipos encontrados en al menos tres cruzamientos independientes. Microscopía de campo oscuro (10x).

Por lo tanto concluimos que los fenotipos de membranas vitelinas vacías correspondían principalmente a embriones en los que la letalidad, producto de la hiperexpresión de dSPARC, ocurría tempranamente.

De estos resultados podemos concluir que la ganancia de función de dSPARC en los tejidos participantes del cierre dorsal del epitelio (la amnioserosa y el propio epitelio de origen ectodérmico) generan fenotipos similares a los encontrados con la hiperexpresión ubicua de dSPARC generada mediante el inductor de choque térmico.

### Hiperexpresión de dSPARC en hemocitos

Los hemocitos presentes en la hemolinfa de *Drosophila* son las células que participan en la respuesta inmune innata y en la remoción de células apoptóticas durante la metamorfosis. Durante la embriogénesis, los hemocitos se originan a partir de un grupo de células del mesodermo de la cabeza y luego se distribuyen por todo el cuerpo siguiendo un programa migratorio definido (Ribeiro *et al.*, 2003). Diversos estudios sugieren que los hemocitos son los productores más importantes de la matriz extracelular en todo el embrión, secretando proteoglicanos (Hortsch *et al.*, 1998), colágeno IV (Murray *et al.*, 1995) y SPARC (Martinek *et al.*, 2002), entre otros. Por dicha razón decidimos hiperexpresar dSPARC en este linaje celular. Mediante la utilización de un inductor específico de hemocitos se obtuvieron fenotipos muy similares a los obtenidos por hiperexpresión de dSPARC con el inductor de choque térmico (HS-Gal4). Sin embargo, en este último caso, la severidad de los fenotipos parece ser mayor, tal como lo evidenciaron los agujeros dorsales de mayor extensión (**Figura 40A y B**).



**Figura 40. Fenotipos de hiperexpresión de dSPARC en hemocitos.** Para el experimento se utilizó la línea inductora hml-Gal4 para dirigir la hiperexpresión de dSPARC en la población de hemocitos embrionarios. Se

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

muestran las cutículas de embriones no eclosionados con 48 h de desarrollo a 25 °C. **(A)** Los fenotipos de agujeros frontales aparecieron en gran medida acompañados por fallas en la involución de la cabeza. Con cabezas de flechas blancas se marcan los extremos del agujero. **(B)** Fenotipo clásico de cierre dorsal frontal con las mandíbulas expulsadas fuera del individuo. **(C)** Letalidad temprana evidenciada por la falta de secreción de cutícula por parte del epitelio. Las fotografías mostradas corresponden a fenotipos representativos de al menos dos cruzamientos independientes. Los embriones de la línea hml-Gal4 parental presentan cutículas salvajes. Microscopía de campo oscuro (10x).

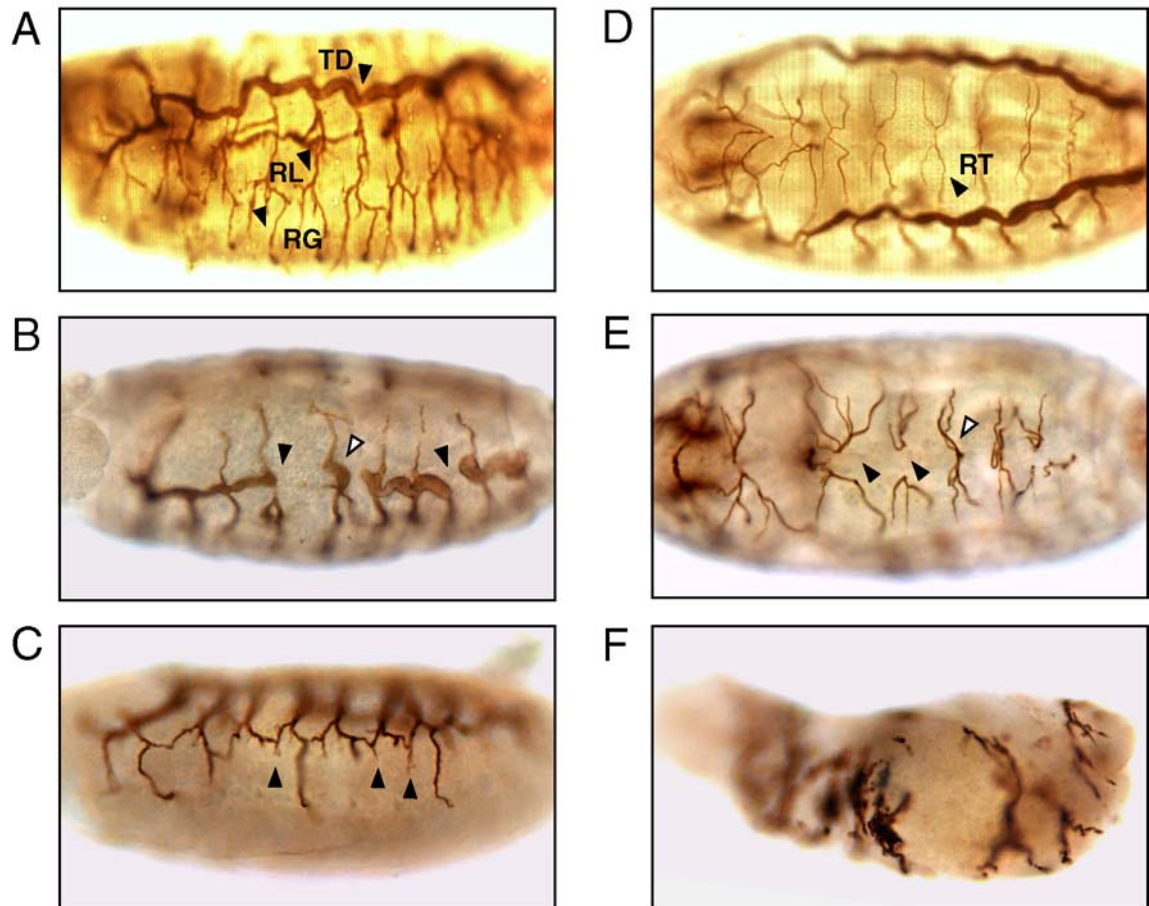
Al igual que en los anteriores experimentos de hiperexpresión de dSPARC, se observa un bajo porcentaje de letalidad temprana; este fenotipo se evidencia por la aparición de membranas vitelinas vacías (**Figura 40C**).

### La ganancia de función de dSPARC afecta el desarrollo del sistema traqueal

Hasta el momento observamos que el cierre dorsal, como movimiento morfogénico, es afectado severamente por la hiperexpresión de dSPARC. Como ya mencionamos, existen en el embrión de *Drosophila* otros modelos para estudiar la migración y la adhesión celular además del cierre dorsal. Luego de una primera etapa proliferativa, el sistema traqueal posee la característica de madurar durante la ontogenia valiéndose solamente de la migración, la adhesión y el cambio de forma celular. Por esta razón decidimos hiperexpresar dSPARC en las traqueas utilizando el inductor *bth*-Gal4 (*breathless* es el homólogo del receptor de FGF en *Drosophila* y posee una expresión temprana y ubicua dentro del sistema traqueal). Los fenotipos encontrados en las traqueas de embriones con la ganancia de función de dSPARC mostraron distintos grados de severidad (**Figura 41**). Al visualizar las traqueas mediante una inmunohistoquímica anti-lumen evidenciamos fallas en la migración y la adhesión de las células del tronco dorsal (**Figura 41A y B**). Asimismo, en los individuos salvajes cada uno de los segmentos traqueales posee una rama ganglionar que será la encargada de proveer el oxígeno al sistema nervioso (ubicado en la región ventral de la larva) (**Figura 41A**). La ganancia de función de dSPARC produce una falla en la migración de la rama ganglionar inhibiendo las prolongaciones y haciendo que las mismas permanezcan próximas a las ramas laterales anteriores (**Figura 41C**). Las ramas terminales también muestran un fenotipo de inhibición de la adhesión e importantes fallas en la ramificación de la célula terminal de cada segmento (**Figura 41D y E**). Por último, también observamos, con una menor penetrancia, fenotipos más severos manifestados con una pérdida completa de la arquitectura del sistema traqueal (**Figura 41F**). Confirmando la hipótesis planteada, estos resultados en su conjunto muestran que la hiperexpresión de dSPARC en el sistema traqueal genera fenotipos de adhesión y migración de las células que lo

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

componen. No obstante, dado que dSPARC es una proteína de secreción, es difícil determinar si el fenotipo descrito es causado directamente por el aumento de dSPARC en dichas células o bien es consecuencia de alguna otra anomalía global causada por la ganancia de función sistémica de dicha proteína.



**Figura 41. La ganancia de función de dSPARC genera defectos de severidad variable en el desarrollo del sistema traqueal.** Inmunohistoquímica anti-lumen de traquea (clon 2A12) de ovipuestas de 3 hs de embriones UAS-SP/bth-Gal4 desarrollados 24 hs a 25 °C. **(A)** Vista lateral de un embrión salvaje (UAS-SP/yw) con su tronco dorsal y ramas laterales en primer plano. **(B)** Embrión *btl-Gal4/UAS-SP* con fenotipos en la migración del tronco dorsal. La flecha blanca muestra un segmento traqueal completamente aislado del sistema. Las flechas negras muestran la discontinuidad del lumen del tronco dorsal. **(C)** Fenotipo de migración de las ramas ganglionares durante la hiperexpresión de dSPARC. Con puntas de flecha negra se muestran las ramas ganglionares abortivas. **(D)** Vista dorsal de un embrión salvaje (UAS-SP/yw) de las ramas terminales del sistema traqueal. **(E)** Ramas terminales de un individuo *btl-Gal4/UAS-SP*. Las flechas negras muestran ausencia de adhesión/fusión entre las ramas terminales. La flecha blanca señala un fenotipo en la ramificación de la célula terminal. **(F)** Vista lateral de un embrión con defecto severo en la formación del sistema traqueal. Microscopía de campo claro (10x).

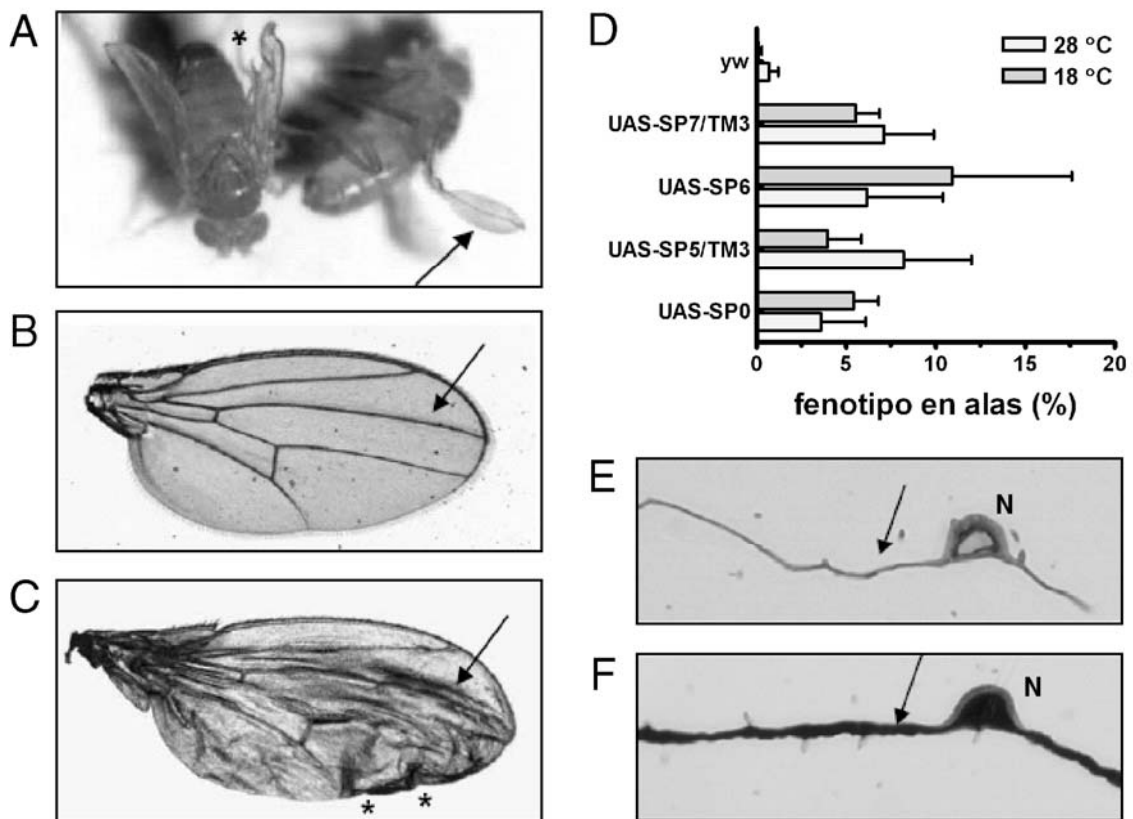
## Experimentos de hiperexpresión de dSPARC en pupas y moscas adultas

El desarrollo del ala de adulto de *Drosophila* permite analizar la adhesión celular de manera relativamente independiente de los procesos de migración y cambio de forma.

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

Por ello, consideramos que el efecto de SPARC en la adhesión podía ser testeado en el modelo de ganancia de función de dSPARC en el desarrollo del ala. Concretamente, decidimos hiperexpresar dSPARC en estadios larvales, pupales y en adulto para posteriormente analizar el fenotipo de las alas.

Lamentablemente, nuestros intentos de hiperexpresar dSPARC en el estadio pupal con inductores HS-Gal4 ocasionaron letalidad. Se intentaron distintas alternativas de choques térmicos (variando el momento en el que se lo aplicaba, la duración de choque e incluso utilizando temperaturas intermedias), pero en ninguna de las condiciones intentadas se logró que los adultos emergieran del pupario con fenotipo. Es decir, o emergían sin fenotipo alguno distinguible o presentaban letalidad en el pupario. Estos resultados permitieron inferir que pequeños aumentos en los niveles endógenos de dSPARC interferían en procesos claves del desarrollo, haciendo inviables a los individuos. Llamativamente, las alas de los adultos de las líneas UAS-SP puras, es decir, sin estar cruzadas por ningún inductor Gal4, exhibieron fenotipos tales como arrugas, plegamientos o ampollas llenas de líquido en el ala del adulto (evidenciando algún tipo de defecto en la adhesión de la bicapa celular del ala) (**Figura 42**). Todas las transgénicas estudiadas tenían una penetrancia similar (4 a 12 %) de dicho fenotipo (**Figura 42D**).



**Figura 42. Fenotipos en alas en las líneas UAS SP.** (A) Adultos de la línea UAS SP original con fenotipos en alas. La adhesión entre las capas del ala falla y como resultado se forma una ampolla llena de fluido (flecha). Cuando el fluido se pierde, se producen alas arrugadas (asterisco). (B) Ala de una hembra madura

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

salvaje (*Canton S*). Con una flecha se señala una vena normal. La superficie del ala es regular, las venas están bien delimitadas y los bordes son uniformes. **(C)** Ala de una hembra joven UAS-SP7 / TM3 con fenotipo de adhesión. Obsérvese que las venas están menos delimitadas que en un ala salvaje, con zonas en las que dejan de ser visibles. Los asteriscos indican irregularidades en los bordes. **(D)** Incidencia de fenotipos en las líneas UAS-SP. **(E y F)** Secciones semifinas de alas fijadas de adultos salvajes y UAS SP6 con fenotipo de alas arrugadas, respectivamente. Las barras de D representan el porcentaje promedio de individuos con fenotipos en al menos una de las alas de poblaciones crecidas a 28 °C o 18 °C. Las líneas indican el desvío estándar respecto de la media. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces con individuos de cruzamientos independientes. Microscopía de campo claro (100x). N: nervaduras o vénulas del ala.

No se observaron variaciones en el fenotipo variando las temperaturas de crecimiento. Para confirmar el fenotipo microscópicamente, las alas se fijaron e incluyeron en resina para poder realizar cortes histológicos sin dañar la estructura el tejido. El análisis reveló una separación de ambas superficies del ala en varias regiones del corte longitudinal (**Figura 42E y F**). Puesto que las anomalías fueron observadas en líneas sin inducción mediada por Gal4, presumimos que las mismas se deben a la expresión basal o inespecífica (*leaky expression*) a partir del promotor mínimo de choque térmico presente en las líneas UAS-SP. Resta confirmar esta hipótesis mediante la realización de PCR en tiempo real de adultos de las distintas líneas transgénicas. De ser así, estos resultados permitirán inferir que pequeños aumentos en los niveles de SPARC ocasionan defectos visibles en la adhesión de la bicapa celular del ala del adulto de *Drosophila*.

En resumen, el estudio de los fenotípicos asociados a la hiperexpresión de SPARC en *Drosophila* indica que los procesos de adhesión y migración (esenciales para el desarrollo tumoral) se encuentran profundamente afectados.

## Genómica de la hiperexpresión de dSPARC en *Drosophila melanogaster*

### Diseño experimental para el estudio del transcriptoma

Para el estudio del transcriptoma de la ganancia de función de dSPARC utilizamos dos patrones de expresión distintos. Dado que la muestra final para la extracción de ARN sería el embrión entero, decidimos incluir al menos una expresión ubicua de dSPARC de manera de asegurarnos la obtención de señal diferencial en los individuos tratados. Esto fue logrado con el inductor de choque térmico (inductor HS-Gal4), el cual no solo nos permitió expresar SPARC de manera ubicua sino que además nos permitiría inducir la hiperexpresión en el momento del desarrollo que consideráramos adecuado para nuestro análisis ulterior. Por otro lado, también decidimos utilizar la hiperexpresión de dSPARC en el ectodermo (inductor 69B-Gal4) del individuo en formación con la idea de

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

afectar directamente el principal tejido involucrado en los movimientos morfogénicos de interés: (a) la retracción de la banda germinal y (b) el cierre dorsal del epitelio. Por lo tanto, con el inductor ubicuo (HS-Gal4) lograríamos el objetivo de inducir la expresión de dSPARC de manera temporo-específica, mientras que con el inductor de ectodermo (69B-Gal4) la dirigiríamos de manera tejido-específica. Seguidamente se muestran las líneas, cruzamientos y genotipos buscados para el análisis del transcriptoma de la ganancia de función de dSPARC en *Drosophila*.

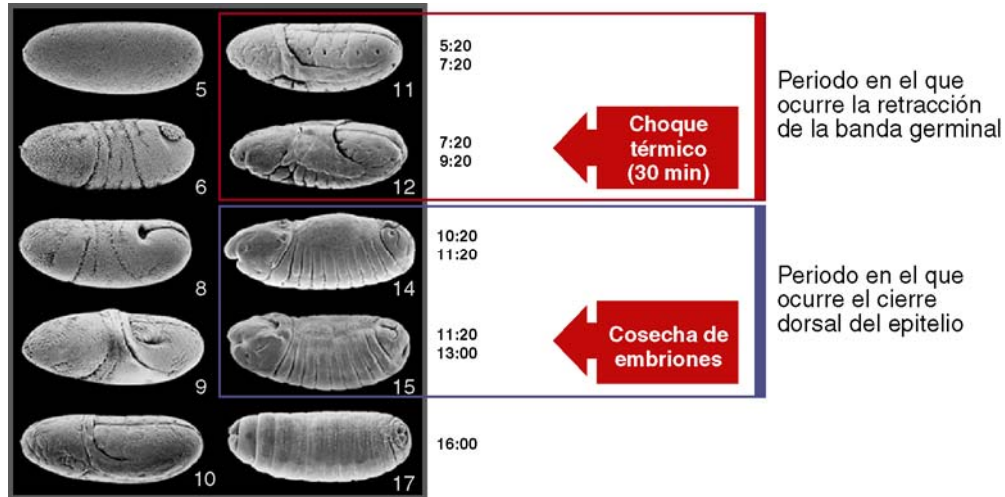
<b>Líneas inductoras seleccionadas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inductor de ectodermo (69B-Gal4/69B-Gal4)</li><li>• Inductor ubicuo de choque térmico (HS-Gal4/HS-Gal4)</li></ul>
<b>Cruzamientos realizados</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 69B-Gal4/69BGal4    <b>x</b>    UAS-SP/UAS-SP</li><li>• 69B-Gal4/69BGal4    <b>x</b>    +/+</li><li>• HS-Gal4/HS-Gal4    <b>x</b>    UAS-SP/UAS-SP</li><li>• HS-Gal4/HS-Gal4    <b>x</b>    +/+</li></ul>
<b>Genotipos buscados</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 69B-Gal4 / UAS-SP</li><li>• 69B-Gal4 / + (como control)</li><li>• HS-Gal4 / UAS-SP</li><li>• HS-Gal4 / + (como control)</li></ul>

Al trabajar con líneas homocigotas (tanto en los inductores como en nuestra mosca recombinante) los cruzamientos realizados arrojaron un 100 % de individuos con el genotipo buscado, haciendo innecesaria la selección de embriones para incluir dentro del análisis. Como control de la hiperexpresión de dSPARC utilizamos los embriones producto de los cruzamientos de las líneas inductoras con la línea *y w*. De esta forma, la hiperexpresión de Gal4 estaría presente en todos los genotipos analizados garantizando que cualquier efecto/defecto producido por dicha proteína sería “restado” del resultado global.

Como se mencionó anteriormente, el inductor 69B de ectodermo se activa durante las primeras horas del desarrollo del embrión de la mosca permaneciendo funcional por casi toda su ontogenia. En cambio, para el caso del inductor de choque térmico debimos decidir en que momento activarlo para lograr una expresión de dSPARC durante la retracción de la banda germinal y el cierre dorsal (**Figura 43**). Por dicha razón decidimos aplicar el choque térmico a las 8 hs de desarrollo (entre los estadios 11 y 12) (**Figura 43**). Asimismo, determinamos que la cosecha de los embriones se realice tanto para el inductor de ectodermo como el de choque térmico, durante el estadio 15 donde el cierre dorsal llega a sus últimas etapas (**Figura 43**). Dado que el transcriptoma de cualquier

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

individuo durante su desarrollo varía considerablemente con el tiempo, decidimos diseñar un esquema de colección de embriones que permitiera minimizar los desfases de desarrollo dentro de cada muestra (Figura 44A y B).



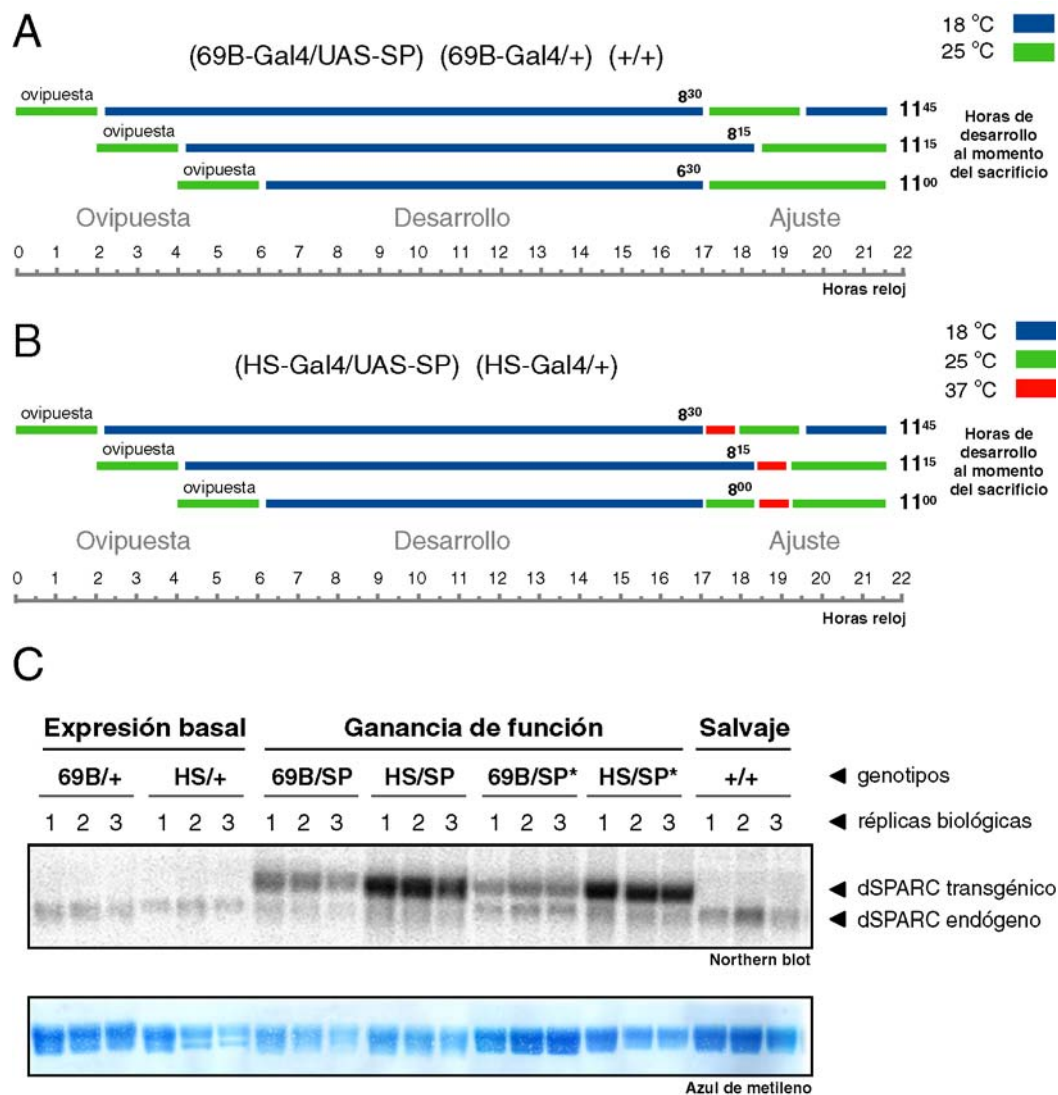
**Figura 43. Esquema de inducción térmica y cosecha de los embriones.** Representación esquemática de la inducción térmica y sacrificio de los embriones en función de los estadios de desarrollo. Dentro del cuadro negro se muestran fotos de microscopía electrónica por barrido de embriones de *Drosophila* en sus distintos estadios (abajo a la derecha de cada embrión se indica el número de estadio). A la derecha de los últimos cinco estadios mostrados se detalla la duración en horas de los mismos, tomando como hora cero la fecundación del huevo. La inducción térmica se realiza a las 8.5 hs de desarrollo y la cosecha y sacrificio de los mismos alrededor de las 11.5 hs. El recuadro rojo señala el momento donde la retracción de la banda germinal ocurre mientras que el recuadro azul hace lo propio con el periodo comprendido para el cierre dorsal.

Para ello se realizaron ovipuestas cortas (2 hs a 25 °C) para obtener una máxima sincronización de los embriones. Al final del esquema se logró un desvío de  $\pm 20$  min de desarrollo entre las distintas cosechas (Figura 44A y B).

Para obtener las muestras biológicas independientes se realizaron tres cruzamientos distintos con una diferencia temporal de 15 días. En todos los casos el 100 % de los embriones correspondía al genotipo buscado ya que tanto la mosca transgénica (UAS-SP) como los inductores utilizados son viables en homocigosis. La expresión de dSPARC en los genotipos buscados fue medida a los efectos de confirmar el funcionamiento de los sistemas de inducción. El mensajero endógeno de dSPARC en *Drosophila* fue detectado en todos los genotipos analizados (Figura 44C). Como era de esperar, la hiperexpresión ubicua liderada por el inductor de choque térmico generó una señal mucho más intensa comparada con la expresión en ectodermo. Este resultado fue también confirmado para los cruzamientos recíprocos (Figura 44C). Por último, decidimos verificar la aparición de fenotipos en los embriones sometidos a la ganancia de función. Tanto la hiperexpresión de dSPARC ubicua como la restringida a los tejidos

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

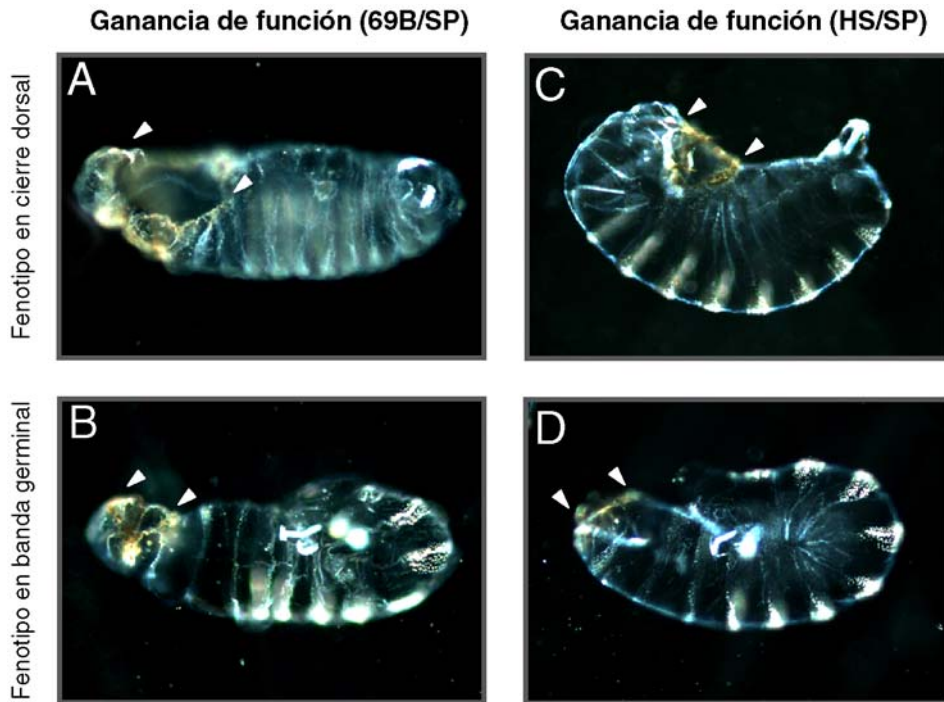
de origen ectodérmico generaron fenotipos similares a los anteriormente encontrados durante nuestra primera búsqueda (Figuras 45A-D).



**Figura 44. Expresión de dSPARC en los individuos transgénicos.** (A) Esquema de obtención de embriones con el inductor de ectodermo. Las tres ovipuestas provenientes de un mismo vaso de cruzamiento se mezclaron y sacrificaron a la finalización del esquema planteado. (B) Esquema de colección utilizado con el inductor de choque térmico (los tratamientos de 30 min a 37 °C se indican con barras naranjas). Las tres ovipuestas provenientes de un mismo vaso de cruzamiento se mezclaron y sacrificaron a la finalización del esquema planteado. (C) Cuantificación de la expresión de dSPARC en los genotipos buscados. El Northern blot fue realizado con ADNc de dSPARC como sonda. El recuadro inferior muestra, como control de carga, los ARNr teñidos con azul de metileno. Los genotipos identificados con un asterisco corresponden a cruzamientos recíprocos.

Con una penetrancia 40-50 % se visualizaron agujeros dorsales ubicados en la región anterior (Figuras 45A y C) mientras que las fallas en la retracción de la banda germinal las encontramos representadas en aproximadamente un 20 % de los embriones analizados (Figuras 45B y D).

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*



**Figura 45. Confirmación de los fenotipos asociados a la ganancia de función de dSPARC en los embriones utilizados para la preparación de ARN. (A-B)** Fenotipos preponderantes encontrados en la hiperexpresión de dSPARC en ectodermo. **(C-D)** Fenotipos encontrados en la hiperexpresión de dSPARC ubicua liderada por el inductor de choque térmico. Las cabezas de flecha señalan los extremos del agujero dorsal.

### Genómica de la ganancia de función de dSPARC en *Drosophila*

Para el análisis del transcriptoma de los embriones decidimos utilizar la tecnología de oligochips de Affymetrix. El modelo de chip utilizado fue el *Drosophila* 2.0 (GeneChip® *Drosophila* 2.0) con el que es posible estudiar la expresión de más de 18 500 transcritos de *Drosophila melanogaster* seleccionados a partir de la versión 3.1 de la base disponible en Flybase (Berkeley *Drosophila* Genome Project).

Nuestro diseño experimental contó con tres muestras biológicas independientes para cada genotipo analizado. Además, decidimos incluir una réplica técnica de una de las réplicas biológicas con el fin de evaluar la variabilidad del sistema utilizado (Tabla 4). Siguiendo este diseño, se utilizaron un total de 16 oligochips. La variabilidad entre los distintos tipos de réplicas se analizó mediante un gráfico de dispersión de intensidades por punto entre las distintas muestras (Figura 46A y B). Como esperábamos, las réplicas técnicas mostraron una variabilidad reducida. También pudo observarse como ciertos pares de muestras poseen menor dispersión que otros manifestando algún tipo de

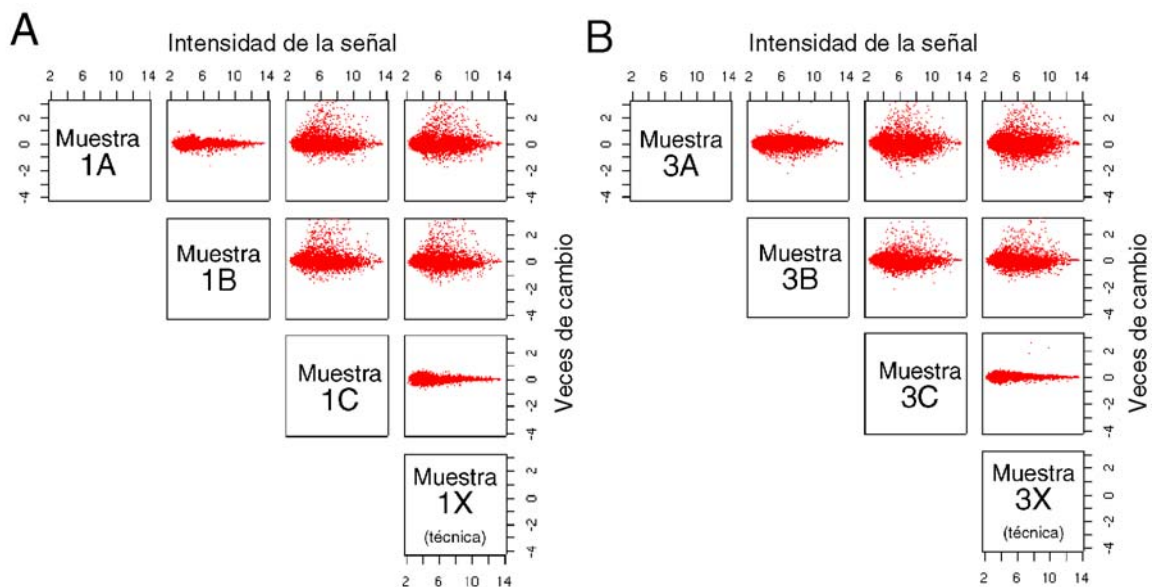
## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

asociación o pareamiento relacionado con la proximidad temporal entre las distintas preparaciones de embriones (las preparaciones A, B y C son consecutivas en el tiempo)

69B-Gal4/+	HS-Gal4/+	69B-Gal4/UAS-SP	HS-Gal4/UAS-SP
1A	2A	3A	4A
1B	2B	3B	4B
1C	2C	3C	4C
1X	2X	3X	4D

**Tabla 4. Réplicas biológicas y técnicas utilizadas en el análisis.** Las columnas representan los genotipos. Las tres primeras filas corresponden a las réplicas biológicas (utilizando la nomenclatura original) mientras que la última fila corresponde a la réplica técnica.

De aquí en más, todo análisis puesto en práctica fue llevado a cabo promediando las réplicas técnicas de cada genotipo de manera de trabajar solo con réplicas biológicas.



**Figura 46. Comparación de la dispersión de datos utilizados entre los distintos tipos de muestras.** Ejemplo de las muestras correspondiente a los genotipos 69B-Gal4/+ (A) y 69B-Gal4/UAS-SP (B). Cada recuadro representa la intensidad y las veces de cambio comparada de a pares entre todas las 4 muestras de cada genotipo.

Antes de comenzar con el análisis estadístico de los genes diferenciales se realizó un paso de pre-filtrado no específico de datos (ver sección “Materiales y Métodos” para los detalles del manejo de datos). Aquellos conjuntos de sondas (denominados *probe sets* según la tecnología Affymetrix) que reportasen una baja intensidad y/o una relación tratamiento/control baja fueron descartados del análisis estadístico ulterior. De esta forma se descartaron un importante porcentaje de datos, que en su gran mayoría solo

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

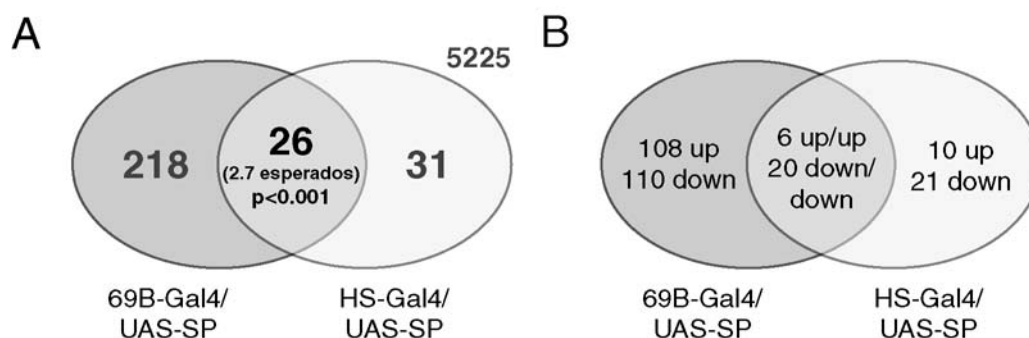
aportan al ruido global del sistema, logrando una considerable reducción de los falsos positivos dentro del grupo de genes diferenciales.

Seguidamente, la significancia estadística de la expresión de genes diferenciales fue medida utilizando el paquete Limma del repositorio Bioconductor. Los valores de  $p$  fueron corregidos por el criterio de FDR (del inglés *False Discovery Rates*) adecuado al modelo de comparaciones múltiples (Benjamini *et al.*, 2001).

Al analizar los datos encontramos que el grupo de genes diferencialmente expresados como resultado de la ganancia de función de dSPARC en ectodermo (237 genes con  $p < 0.35$  ajustado por FDR) fue sensiblemente más grande que el grupo compuesto por los genes diferencialmente expresados luego de hiperexpresión ubicua de dSPARC (38 genes con  $p < 0.35$  ajustado por FDR) (ver “Tablas de genes diferencialmente expresados” en la sección de Anexos). A pesar de que el inductor de choque térmico posee una expresión notablemente mayor de dSPARC (medida por Northern blot y confirmada por el oligochip) la diferencia en el tamaño de ambos conjuntos puede deberse al tiempo en el que el inductor se encontró activo dentro del organismo. Es decir, ni los niveles de dSPARC ni la inducción ubicua compensarían el efecto producido por la expresión en los tejidos de origen ectodérmico. En base a estas consideraciones decidimos analizar exclusivamente los genes presentes en ambas listas, es decir, estudiar el subconjunto intersección.

### Análisis de la intersección de las listas de genes diferencialmente expresados luego de la hiperexpresión de dSPARC

La genómica funcional es una herramienta de búsqueda sistemática cuyos resultados deben ser posteriormente validados técnica y biológicamente. En nuestro caso, el uso de dos inductores distintos nos permitió intersectar los resultados para responder la pregunta de cual es el conjunto de genes modulados por la ganancia de función de dSPARC (Figura 47A).



## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

**Figura 47. El subconjunto intersección de los genes diferenciales utilizando ambos inductores está enriquecido de manera significativa respecto del azar. (A)** Diagramas de Venn esquematizando la distribución de genes diferenciales presentes en cada genotipo. El número de genes esperados está calculado por teoría de probabilidades y el valor de  $p$  corresponde a la  $H_0$ : azar. Por fuera del diagrama de Venn figura la cantidad de genes no diferenciales totales que pasaron el prefiltro. **(B)** Descripción de los genes regulados positiva o negativamente en cada grupo. Nótese que en la intersección el 100 % de los genes coincide en el signo de su regulación (up/up: genes regulados positivamente en ambos grupos; down/down: genes regulados negativamente en ambos grupos). Debajo de los diagramas se encuentran los genotipos correspondientes a cada grupo analizado.

Esta intersección de datos funcionó en esta etapa como una validación biológica inicial. De hecho, el número de genes diferenciales que cambian en la misma dirección y que están incluidos en el subconjunto intersección difirió significativamente del obtenido por azar (**Figura 47B**). Al observar la lista de genes diferencialmente expresados con ambos inductores observamos que el transcripto dSPARC está presente (**Tabla 5**). Este resultado puede ser tomado como un control interno del experimento. La inducción ubicua de dSPARC mostró 4.7 veces de cambio mientras que la ganancia de función en el ectodermo solo fue de 2.2 veces de cambio (ambas expresadas en escala lineal). Al analizar la identidad del resto de los genes del grupo intersección observamos que esta compuesta por un alto porcentaje de transcritos no identificados y que solo 26 de los mismos poseen denominación y función potencial (**Tabla 5**). Por ello es que la lista resulta pequeña para realizar de manera automática un estudio de ontología clásico.

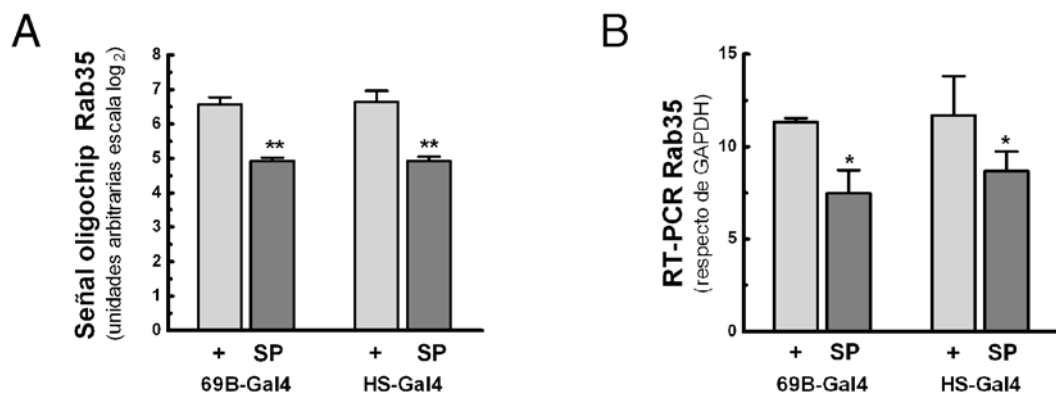
Locus Link	Símbolo	sonda affy	69B.p	69B.fc	HS.fc	HS.p
33014	Rab35	1624567_at	0.0049	0.3	0.3	0.0192
32340	rdgB	1634099_at	0.0635	0.5	0.6	0.23
40218	CG13813	1637644_at	0.0646	1.9	1.9	0.1174
43230	SPARC	1625825_at	0.0646	2.2	4.7	0.0192
41306	CG4570	1637691_at	0.0768	0.5	0.7	0.3782
32382	CG13404	1634502_at	0.1071	1.6	1.6	0.1976
33077	CG1529	1624100_at	0.1071	0.5	0.5	0.1516
192535	CG32032	1629205_at	0.1071	0.6	0.6	0.1516
33119	mst	1638175_at	0.1298	1.7	1.6	0.2073
41317	CG14696	1635764_at	0.1336	1.7	1.9	0.0771
31954	lpod	1628843_at	0.1336	0.3	0.3	0.0369
31965	CG17841	1623704_at	0.1336	1.6	1.5	0.2372
318131	CG32634	1633451_at	0.1772	0.6	0.7	0.3782
32488	CG7860	1634351_at	0.2293	0.6	0.5	0.2073
40754	NPFR1	1628982_at	0.2293	0.7	0.6	0.1976
318133	CG32638	1634787_at	0.2293	0.7	0.7	0.3735
38409	dro5	1627327_at	0.2293	0.6	0.6	0.3266
32278	HDAC4	1635284_a_at	0.2576	0.7	0.7	0.2372

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

32437	Lsd-2	1637359_at	0.2626	1.3	1.4	0.3735
42852	Hsp68	1638872_at	0.2633	0.5	0.5	0.3506
32547	CG9056	1633390_at	0.2671	1.3	1.5	0.1976
40117	CG9449	1628150_a_at	0.2733	1.3	0.5	0.0786
39075	Hsp26	1635044_at	0.2977	0.5	0.6	0.3746
37419	Glycogenin	1635000_at	0.2977	0.7	0.7	0.3735
42557	CG31233	1632461_at	0.376	0.7	1.4	0.3883

**Tabla 5. Listado de genes diferenciales compartidos entre ambos experimentos de inducción.** Los 26 genes se encuentran ordenados en forma ascendente según el p valor correspondiente al inductor 69B. Las veces de cambio (*fold-change*) están expresadas en escala lineal como veces de cambio del tratamiento vs. control. El LocusLink es tipo de denominación que provee un punto central de acceso de información biomédica, básica y molecular para genes, transcritos y proteínas otorgando una nomenclatura universal (provisto por el NCBI). Los códigos de CG son genes de *Drosophila* aún no nombrados.

Como se mencionó anteriormente, el parámetro utilizado para ordenar las listas presentadas es el valor de  $p$ , independientemente del parámetro veces de cambio. Tomando el caso del primer transcripto de la lista, correspondiente al gen Rab35, sus veces de cambio eran 0.3 (presentada en escala lineal como señal del tratamiento/ señal del control) lo que significó una disminución del 30 % (con el valor de sus respectivos controles por sobre el tratamiento) (Figura 48A). La validación por RT-PCR mostró una disminución de entre 30 y 40 % (dependiendo del inductor utilizado), semejante a la obtenida en el microarreglo (Figura 48B).



**Figura 48. Validación técnica del gen Rab35.** (A) Intensidad del juego de sondas de Rab35 correspondiente a la ganancia de función cuantificada mediante el oligochip de Affymetrix. (B) Validación del resultado obtenido con los chips mediante la cuantificación del mensajero de Rab35 mediante RT-PCR. Las barras representan la media de tres PCR con las tres muestras biológicas y sus respectivas réplicas técnicas por placa  $\pm$  ES. La cuantificación fue relativizada a la cantidad de los mensajeros control GAPDH.

Por los resultados mostrados en esta sección podemos concluir que existe un grupo de genes diferenciales presentes en ambos experimentos y que dicho grupo posee una alta

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

probabilidad de estar relacionado con dSPARC en una o varias vías de señalización en el modelo de *Drosophila melanogaster*. En la Discusión se hará referencia a las interrelaciones putativas entre este juego de genes y la actividad biológica de SPARC.

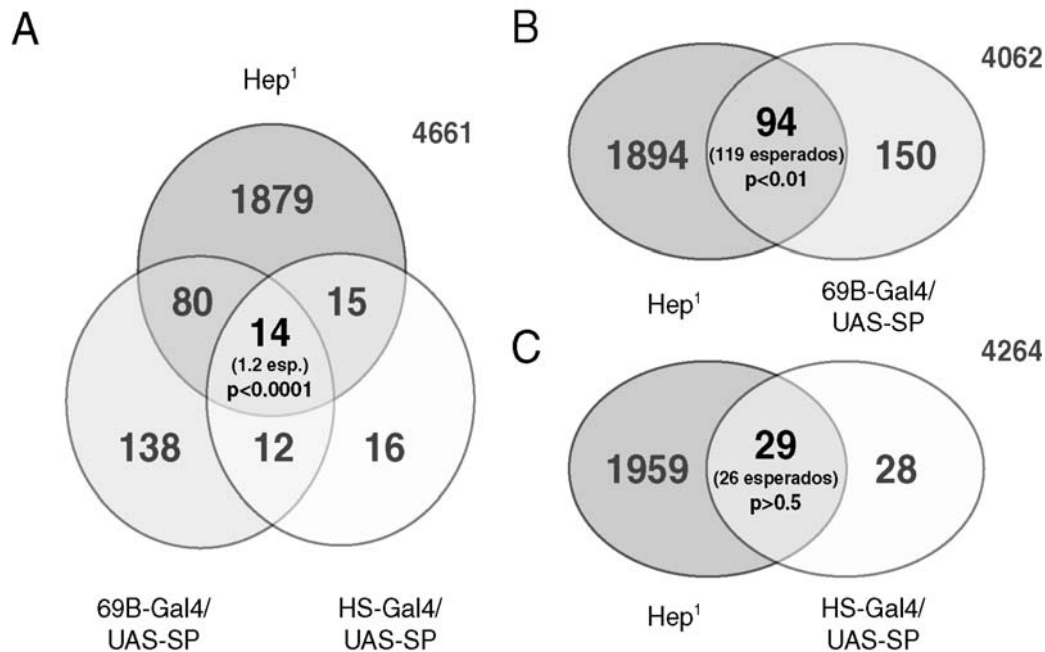
### La generación del fenotipo de cierre dorsal por hiperexpresión de dSPARC sería independiente de la vía de señalización de JNK

Las evidencias en la literatura indican que la vía de JNK participa en procesos tales como la regeneración de tejidos o la cicatrización de heridas en toda la filogenia (Harden, 2002). Para evaluar si la ganancia de función de dSPARC produce un fenotipo de cicatrización impedida en *Drosophila* a través de una vía paralela o compartida con la señalización de JNK decidimos incluir en el estudio de genómica el transcriptoma de la mutante de hemipterus (*hep*<sup>1</sup>), una de las kinasas de la vía de Jun en *Drosophila* (homóloga de JNKK de mamíferos). La colección de embriones y la purificación de ARN de estos estudios fueron realizadas por el grupo de Enrique Martín Blanco (Parque Científico, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Barcelona, España) como parte del Consorcio “*Wound*” del 6<sup>o</sup> Programa Marco de la Unión Europea.

Utilizando un procesamiento de datos idéntico al anteriormente realizado, encontramos que el número de genes diferenciales en la mutante de la kinasa de Jun fue llamativamente mayor que para la ganancia de función de dSPARC (**Figura 49A**). La lista de genes diferenciales de *hep*<sup>1</sup> puede consultarse en la sección de Anexos. Especulamos que dicha diferencia es debida principalmente al hecho de que las moscas *hep*<sup>1</sup> pueden ser retrocruzadas en cantidad sin necesidad de sincronización ni ajuste de desarrollo como fue el caso de la hiperexpresión de dSPARC. Además, la penetrancia de *hep*<sup>1</sup> es del 100 %, disminuyendo los falsos negativos en las listas y haciendo que el grupo de genes diferenciales aumente considerablemente. Al analizar la identidad de los genes y compararlos con los experimentos de ganancia de función de dSPARC encontramos que la triple intersección se encontraba enriquecida respecto del azar (**Figura 49A**). Es decir, el subconjunto intersección contenía más genes que los esperados por un muestreo al azar. *A priori*, este resultado indicó una clara relación entre los tres experimentos. Pero cómo determinar que dicho resultado no estuviese influenciado por la interacción, ya demostrada, de ambos modelos de ganancia de función de dSPARC y el alto número de genes diferenciales de la vía de JNK? Para ello, comparamos las intersecciones de genes diferenciales de a pares. Es decir, analizamos la intersección de los genes diferenciales de *hep*<sup>1</sup> con la ganancia de función de dSPARC en ectodermo (**Figura 49B**) y la intersección de los genes diferenciales de *hep*<sup>1</sup> con la ganancia de función de dSPARC ubicua (**Figura 49C**). En ninguno de ambos casos encontramos que el subconjunto

## Resultados – SPARC en el modelo de *Drosophila*

intersección mostrara un enriquecimiento respecto del azar, indicando que el aparente enriquecimiento de genes diferenciales comunes en la triple intersección se encontraba sesgado por la fuerte interrelación de ambos modelos de ganancia de función de dSPARC.



**Figura 49. Relación entre las vías de señalización de dSPARC y JNK de *Drosophila* para el cierre dorsal impedido. (A)** Diagramas de Venn en donde se muestra la triple intersección de genes diferenciales compartidos. **(B)** Número de genes compartidos entre el experimento de ganancia de función de dSPARC bajo el inductor de ectodermo y la mutante *hep*<sup>1</sup>. **(C)** Número de genes compartidos entre el experimento de ganancia de función de dSPARC bajo el inductor de choque térmico y la mutante *hep*<sup>1</sup>. El número de genes esperados para cada intersección está calculado por teoría de probabilidades y el valor de *p* corresponde a la *H*<sub>0</sub>: azar. Por fuera del diagrama de Venn figura la cantidad de genes no diferenciales totales que pasaron el prefiltrado inicial (ver sección de “Materiales y Métodos”).

En su conjunto, este análisis sugiere que la señalización mediada por JNK no está relacionada con aquella disparada por dSPARC, a pesar de generar fenotipos de cierre dorsal similares. El hecho de que la triple intersección de genes diferenciales esté enriquecida respecto del azar (**Figura 49A**) y las comparaciones de a pares no lo estén (**Figura 49B y C**) significa que la similitud de ambos experimentos de inducción de dSPARC sería la generadora del desvío observado en el resultado numérico, respecto al valor esperado.

## Discusión

### SPARC y estroma tumoral

El destino celular se encuentra regulado no solo por el genotipo de la propia célula sino también por las condiciones del medio que la rodea. Dicho en otras palabras, las señales fisicoquímicas internas y externas desencadenan cascadas moleculares capaces de determinar el futuro de la célula. Focalizándonos en el medio extracelular, las uniones célula-célula y célula-matriz son eventos fundamentales a la hora de fijar el destino celular. En el caso de las células neoplásicas estas interacciones son capaces de determinar el establecimiento y progresión del tumor. Factores de crecimiento, citoquinas, proteasas y moduladores de adhesión han sido implicados como reguladores de la composición de la MEC y la morfología celular. SPARC es un miembro de las llamadas proteínas matricelulares implicadas en procesos morfogénicos y de desarrollo en tejidos normales. Junto con otras moléculas como la tenascina y la trombospondina, SPARC posee una importante actividad anti-adhesiva. Esta glicoproteína se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución. Ontogénicamente la podemos encontrar durante casi todo el desarrollo embrionario, mientras que su expresión en el adulto está restringida en gran medida a tejidos en remodelación. Es por esta razón que a SPARC se la relaciona con la remodelación de la MEC y, como ya mencionamos, el entorno celular y en particular el de las células neoplásicas determina la progresión y metástasis de la masa tumoral. En función de esta serie de razonamientos, sumado a las evidencias propias (Alvarez *et al.*, 2005; Ledda *et al.*, 1997a; Ledda *et al.*, 1997b; Podhajcer *et al.*, 1996) y de otros grupos (Framson and Sage, 2004; Sodek *et al.*, 2002) presentadas en la introducción de este trabajo, decidimos profundizar los conocimientos sobre la participación de SPARC en el desarrollo y progresión del melanoma humano a través de la modificación del estroma o entorno tumoral.

### Purificación de SPARC nativa de melanoma

En la primer parte de este trabajo de tesis hemos mostrado que es posible purificar a homogeneidad SPARC nativa de melanoma humano consiguiendo, como se mostró, un rendimiento adecuado para controlar la calidad de la molécula y validarla frente a otras

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

fuentes biológicas. Además, pudimos comprobar la identidad del extremo N-terminal mediante microsecuenciación y analizar la huella peptídica mediante espectrometría de masa.

Además de las publicaciones previas donde se muestra la purificación de SPARC a partir de plaquetas (Chlenski *et al.*, 2002), hueso (Kaufmann *et al.*, 2004), células murinas (Funk and Sage, 1991), células embrionarias humanas (Chlenski *et al.*, 2006) y sistemas recombinantes eucariotas como el de la células de insecto Sf9 (Bradshaw *et al.*, 2000), solo un grupo presentó la purificación de SPARC a partir de células de melanoma B16 de origen murino (Kato *et al.*, 2000). No obstante, teníamos la sospecha de que para los estudios de actividad biológica podía ser relevante que la proteína fuera purificada sobre el mismo sistema y la misma especie de la que fue obtenida. Es decir, tal como lo hemos planteado en los objetivos de la tesis, nos abocamos al estudio de SPARC en el contexto del melanoma humano y, como fue mencionado en varias oportunidades, esta molécula posee distintas isoformas (Sosa *et al.*, 2007), muchas de las cuales podrían obedecer a modificaciones post-traduccionales propias de la especie y de la naturaleza tumoral de la célula en estudio. En relación a ello, un estudio reciente muestra que la N-glicosilación encontrada en SPARC de distintas fuentes puede modificar la afinidad por el colágeno fibrilar tipo I y potencialmente las variaciones en las actividades biológicas que se encuentren relacionadas con dicha interacción (Kaufmann *et al.*, 2004). Por esta razón pensamos que purificar la molécula de una fuente distinta respecto del sistema a testear representaría un problema a la hora de verificar la funcionalidad de la misma. Sin embargo, como fue demostrado en la sección de Resultados de esta tesis, tanto la proteína nativa purificada de melanoma humano como las formas recombinantes producidas en *Drosophila* son igualmente funcionales respecto de la actividad antiproliferativas medida sobre fibroblastos. Retomaremos este punto cuando se analice la validación funcional de las proteínas purificadas.

## Bioquímica de SPARC nativa y sus variantes recombinantes

Con la proteína nativa de melanoma humano purificada a homogeneidad comenzamos con los estudios fisicoquímicos que permitieron caracterizarla. Para esta parte del análisis incorporamos las proteínas recombinantes de insecto producidas por la Dra. Andrea Llera de nuestro laboratorio. Si bien la estructura secundaria de todas las formas de SPARC analizadas se mostraron de manera similar, al analizar la conformación terciaria mediante el espectro de fluorescencia vimos que la proteína Whsi-His poseía un importante corrimiento del centro de masa respecto de las otras moléculas. Suponemos que esos pocos aminoácidos que conforman la etiqueta de histidinas (seis

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

histidinas consecutivas precedidas por una secuencia blanco para el clivaje con trombina) estarían afectando su estructura causando una interacción electrostática directa entre el extremo N-terminal ácido de SPARC con los residuos de las histidinas del C-terminal. Es de destacar que a nivel experimental, hubo necesidad de purificar Whsi-His en presencia de 2 M NaCl para lograr que la proteína interactuara con la resina de níquel, lo cual sugería que las histidinas de la cola no estaban libres para interactuar con los átomos de metal. Más aún, como discutiremos más adelante, esta modificación en su estructura repercutió en la actividad biológica de la variante Whsi-His. De todas las proteínas evaluadas, Whsi-His fue la que presentó menor actividad biológica medida como inhibición de la proliferación de fibroblastos murinos. Este resultado tiene un fuerte sustento teórico en varios reportes previos donde se había demostrado que el dominio C-terminal de SPARC resulta crítico en la inhibición de la proliferación de células endoteliales (Sage *et al.*, 2003). En dichos trabajos es posible visualizar como el efecto antiproliferativo de la molécula completa fue totalmente reproducido mediante la utilización de péptidos sintéticos pertenecientes al extremo C-terminal (aminoácidos 254-273) (Motamed *et al.*, 2003; Motamed *et al.*, 2002; Sage *et al.*, 2003).

Dejando de lado el caso particular de la variante de SPARC recombinante Whsi-His, todas las proteínas evaluadas mostraron una estructura secundaria y terciaria similar indicando que el plegamiento de las mismas fue independiente de la fuente biológica a partir de la cual fue preparada.

## Validación funcional de las proteínas purificadas

Habiendo validado estructuralmente las proteínas recombinantes decidimos avanzar con la función biológica de las mismas. En la primer parte de la sección de resultados de esta tesis mostramos que tanto SPARC nativa obtenida de células de melanoma humano, como sus variantes recombinantes obtenidas mediante la utilización del sistema de células S3 de *Drosophila* inhibían la proliferación de los fibroblastos SW3T3. El hecho de que diferentes fuentes de SPARC (no solo las probadas en este trabajo sino también las publicadas por otros grupos) mostrasen esencialmente el mismo efecto biológico en un sistema ampliamente aceptado como la inhibición de la proliferación de fibroblastos sugiere que dicho efecto es independiente de las isoformas de SPARC producidas por las fuentes de origen.

A propósito de este resultado, en un trabajo de nuestro laboratorio recientemente aceptado (López Haber *et al.*, 2007), no solo confirmamos sino que además extendimos el alcance de dichos resultados demostrando que ambas fuentes de SPARC (nativa y

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

recombinante de insecto) tienen efectos inhibitorios similares sobre la proliferación de células de endotelio bovino (BAEC) y fibroblastos humanos (HFL1). Más aún, el efecto observado fue independiente de los niveles de expresión endógena de la proteína, es decir que las células fueron inhibidas independientemente de sus niveles basales de SPARC. Para este proyecto, decidimos cuantificar la proliferación mediante la incorporación de Timidina-<sup>3</sup>H en cultivos sincronizados por hambreado (entrada en quiescencia por ausencia de suero como fuente de factores de crecimiento). En este trabajo (López Haber *et al.*, 2007) también demostramos como las distintas formas de SPARC validadas en esta tesis se comportan de manera semejante inhibiendo la cinética de estiramiento o *spreading* de las células endoteliales e inclusive su migración en cámaras de Boyden. Estos resultados funcionales complementan lo anteriormente descrito permitiendo generalizar sobre la conservación de la actividad biológica de SPARC en todas sus fuentes de obtención.

Hasta aquí nos habíamos concentrado fundamentalmente en la validación estructural y funcional de SPARC purificada a partir de distintas fuentes. No obstante, en este punto de la investigación aparecería un descubrimiento llamativo: la ausencia de efecto inhibitorio en la proliferación de líneas tumorales. Apoyados en el hecho de que SPARC nativa no había sido probada de manera sistemática sobre la proliferación de células neoplásicas, decidimos seleccionar un grupo de seis líneas transformadas de diferente origen ontológico para llevar adelante dicho experimento. Las líneas HeLa, HT29, CaCo2, T84, IIB-Mel-J y HEK293 (no tumoral pero transformada con antígenos virales), con distintos niveles endógenos de SPARC, mostraron ser indiferentes al agregado de SPARC durante su crecimiento evaluado por el ensayo de MTT. Más aún, en el trabajo de López Haber *et al* nuestro laboratorio se confirmaron dichos resultados utilizando la técnica de incorporación de timidina tritiada. Además, pudo ser generalizado mediante el testeo de nuevas líneas tumorales con distintos niveles endógenos de SPARC. De esta manera, concluimos que el agregado de SPARC no afecta la entrada en ciclo de las células neoplásicas. Sin embargo, en el mismo trabajo también mostraríamos una excepción a dicha afirmación. Al analizar el efecto de la proteína en células de melanoma que poseían una disminución en la producción de SPARC, utilizando la tecnología de secuencias antisentido, observamos que dichas células estaban de alguna manera sensibilizadas al efecto antiproliferativo anteriormente descrito. Retomaremos este punto más adelante en la discusión.

El mecanismo molecular mediante el cual SPARC inhibe la proliferación ha sido explorado principalmente en células endoteliales. Al analizar los tipos de señalización que debería encender una molécula para afectar la proliferación resulta razonable

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

pensar en vías relacionadas con la regulación de factores de crecimiento, modulación del ciclo celular a través de las ciclinas y sus quinazas asociadas y, por último, la modulación de componentes de la MEC capaces de modificar la formación de contactos focales y su consiguiente señalización desde el exterior. Llamativamente, SPARC posee en su literatura asociada datos que sostienen de manera contundente las tres posibilidades. La alteración de la señalización de ciertos factores de crecimiento incluyendo el secuestro de VEGF (Kupprion *et al.*, 1998), la interacción molecular con los receptores de PDGF (Motamed *et al.*, 2002; Raines *et al.*, 1992), la cooperación con TGF- $\beta$  en la activación de la vía dependiente de Smad2/3 (Schiemann *et al.*, 2003), efectos indirectos sobre IGF (Francki *et al.*, 2003) y la señalización dependiente de FGF (Motamed *et al.*, 2003) han demostrado ser blancos factibles mediante los cuales SPARC puede desencadenar dicho efecto inhibitorio de la proliferación. Además de la interacción génica con los factores de crecimiento existen otras vías candidatas de participar en la inhibición de la proliferación. Se ha descrito que la inhibición de la MAPK, la inactivación de la ciclina E dependiente de kinasa (CDK2), la disminución en los niveles de ciclina A y la activación constante del retinoblastoma (Rb) estaban directamente asociados a la señalización dependiente de PDGF mediada por SPARC (Motamed *et al.*, 2002). Todos estos efectos deberían ser dependientes de un receptor aún no identificado (Bradshaw *et al.*, 1999). No obstante, también podría ser el producto de alguna interacción específica con ciertos componentes de la MEC que le permita gatillar una señalización ulterior (Ramirez and Rifkin, 2003).

Los resultados de esta tesis, aunque no permiten dilucidar los eventos moleculares involucrados en la inhibición de la proliferación mediada por SPARC, sugieren que existirían importantes diferencias a nivel molecular entre células de distinto linaje, abriendo la puerta a estudios ulteriores de caracterización más fina de dichas diferencias.

### El efecto bifásico de SPARC en la proliferación de fibroblastos

Tanto la proteína nativa de melanoma como las formas recombinantes eucariotas probadas en esta tesis mostraron un efecto bifásico en la proliferación de los fibroblastos, dependiente tanto de la concentración como del momento del agregado de la proteína. Las condiciones que gobiernan dicho efecto son el agregado de SPARC durante el plaqueo celular y la utilización de una baja concentración en el medio extracelular (5 ug/ml). El agregado de SPARC luego de que las células se adhirieron y estiraron ya no fue capaz de inducir el efecto estimulador de la proliferación utilizando concentraciones similares. De manera interesante, este mismo resultado fue confirmado

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

a posteriori por nuestro laboratorio utilizando células endoteliales y fibroblastos humanos (López Haber *et al.*, 2007). No tenemos claro como se regula este comportamiento, no obstante también ocurre al variar la concentración de SBF. Cuando el ensayo se realiza en 10 % de SBF todas las concentraciones de SPARC son inhibitorias de la proliferación de los fibroblastos. A medida que bajamos la concentración de suero observamos que lentamente la proteína comienza a dejar de inhibir hasta transformar su actividad en inductora de la proliferación. Esto lo podríamos explicar alegando la existencia de una conversación cruzada entre SPARC y uno o más factores de crecimiento presentes en el suero. De todos modos, al evaluar el efecto de SPARC en la proliferación, no podemos dejar de lado la posible contribución de la actividad antiadhesiva de nuestra molécula de estudio. El utilizar SPARC en altas concentraciones (20 a 80 ug/ml) durante el plaqueo sin duda afecta la adhesión celular de la línea al sustrato. De hecho, esta afirmación queda claramente demostrada en el trabajo de López Haber (López Haber *et al.*, 2007) donde se observa una importante inhibición de la adhesión de los fibroblastos utilizando las distintas formas de SPARC. Entonces, mientras buscar una hipótesis que explique el comportamiento bifásico de SPARC apoyándose en la interacción directa o indirecta de SPARC con uno o varios de factores de crecimiento sería muy difícil de probar (más que nada por la inherente complejidad del sistema), no sería tan desatinado evaluar la influencia del estado de adherencia en dicho comportamiento. La participación de SPARC en el estado de adherencia celular es uno de los puntos más estudiados en la biología de esta proteína (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998; Murphy-Ullrich *et al.*, 2006). El proceso celular de anti-adhesión o despegado es potencialmente importante para que una célula pueda participar en procesos morfogénicos normales como la respuesta a injuria o procesos patológicos como la progresión tumoral (Murphy-Ullrich, 2001). Utilizando como guía el modelo de estados de adhesión de Murphy-Ullrich (ver **Figura 1**), podemos ver como es posible generar estados bifásicos en función de la concentración de SPARC o cualquier otra proteína matricelular que se esté estudiando. La ausencia de SPARC genera un estado de adhesión fuerte generalmente relacionado con la diferenciación pero no la proliferación. Al aumentar los niveles de SPARC estaríamos en un primer momento favoreciendo un estado de adhesión intermedia capaz de mantener la viabilidad celular, dejando que el ambiente estimule la proliferación o la migración de la célula. A medida que la concentración de esta proteína matricelular aumenta, estaríamos induciendo un despegado celular masivo en donde la supervivencia y destino celular estaría en riesgo por el gatillado de la apoptosis relacionada al estado de adhesión (anoikis). Estamos convencidos que dichas observaciones están íntimamente relacionadas con las aparentes contradicciones o dicotomías relacionadas a SPARC y su pronóstico en los

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

distintos tipos de cáncer. Dicho en otras palabras, distintos tumores como melanoma y ovario generan microambientes distintos que podrían estar favoreciendo la activación o bien la inhibición de la proliferación de la mano de la misma proteína SPARC.

### Regulación de la proliferación: células normales vs tumorales

Varios autores mostraron que el agregado de SPARC es suficiente para modular la proliferación de distintos tipos de cultivos primarios de células incluyendo endoteliales (Funk and Sage, 1991; Kupprion *et al.*, 1998), mioblastos (Motamed *et al.*, 2002), mesangiales (Francki *et al.*, 2003), mesenquimales (Bradshaw *et al.*, 1999), mesoteliales (Yiu *et al.*, 2001) y epiteliales (Mv1Lu) (Schiemann *et al.*, 2003). No obstante, al analizar la bibliografía encontramos que los datos reportados respecto del efecto en la proliferación de células o líneas tumorales por parte de SPARC son mucho más complejos y controvertidos. Tanto la hiperexpresión como la disminución en los niveles de SPARC no tienen efectos reportados sobre la proliferación de líneas de melanoma humano, de neuroblastoma y de cáncer de mama (Chlenski *et al.*, 2002; Koblinski *et al.*, 2005; Ledda *et al.*, 1997a). Por otro lado, el aumento de SPARC en células de glioma humano producen una importante inhibición de la proliferación de la línea U-87 *in vivo e in vitro* (Rempel *et al.*, 2001). El agregado de SPARC exógeno sólo fue descrito como inhibidor de la proliferación en dos líneas de cáncer de ovario (Said and Motamed, 2005; Yiu *et al.*, 2001). En dichos casos la inhibición de la proliferación fue acompañada por un incremento en la apoptosis inducida por SPARC. Los datos presentados en esta tesis demostraron que el agregado exógeno de SPARC fue incapaz de afectar la inhibición de la proliferación de las líneas tumorales testeadas (melanoma, colon y una metástasis en pulmón proveniente de un tumor de colon). Asimismo, en uno de nuestros recientes trabajos aceptados (López Haber *et al.*, 2007) observamos que nuevas líneas testeadas (glioma, y nuevas líneas de melanoma) se comportan de igual manera independientemente de los niveles endógenos de producción de SPARC. Estos resultados sugieren que las líneas neoplásicas probadas poseen algún mecanismo endógeno que les confiere una resistencia al efecto antiproliferativo de SPARC exógeno. Contrariamente, la disminución de SPARC endógena (mediada por mensajeros antisentidos (Ledda *et al.*, 1997a) o por interferencias de ARN (López Haber *et al.*, 2007)) lleva a las células de melanoma humano hacia un estado de vulnerabilidad respecto del efecto antiproliferativo de la proteína exógena. En el trabajo de López Haber *et al* también mostramos que dicha “resistencia” a los efectos de SPARC exógena es observada cuando se cuantifica la migración celular. Por lo antedicho, solo aquellas

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

células con una disminución de los niveles endógenos de SPARC verían afectada su migración y quimioquinesis ante la presencia de SPARC exógena.

En este momento es importante mencionar que en otra serie de experimentos de esta tesis hemos demostrado que la modulación en los niveles endógenos de SPARC en las células de melanoma, pero no los niveles producidos por el estroma tumoral ni los cambios generados en el ambiente (aumento de microvasculatura, reclutamiento de fibroblastos y producción masiva de MEC) inducidos por la proteína, afectan el crecimiento del melanoma humano. Estos resultados están en concordancia con la hipótesis de que la hiperexpresión de SPARC por parte de las células y tejidos tumorales funcionaría como una estrategia para evadir el control que ejerce el huésped contra las células malignas. Más adelante profundizaremos la discusión sobre este tema.

¿Cómo lograrían las células tumorales evadir la acción de SPARC exógena? Podríamos especular que esta resistencia estaría mediada por la modulación de los niveles de un putativo receptor para SPARC, causada por los niveles de producción endógenos de SPARC. Aunque la existencia de dicho receptor no pudo ser probada ni por nosotros ni por otros grupos, hay evidencias de que SPARC se une a la superficie celular (Gradishar, 2006; Yost and Sage, 1993).

### El papel del estroma en la proliferación de células tumorales *in vivo*

En este trabajo de tesis he mostrado que la capacidad de crecimiento *in vitro* e *in vivo* de las células de melanoma humano depende esencialmente de los niveles de SPARC producidos por las propias células malignas, mientras que SPARC producida por las células del estroma no tiene un rol aparente en el crecimiento del melanoma.

A pesar de los resultados aparentemente contradictorios de la literatura sobre el crecimiento tumoral que hemos comentado en la introducción, se propuso que el rol principal de SPARC derivada del huésped en la progresión tumoral es la apropiada organización de la matriz extracelular (Brekken *et al.*, 2003). Se propuso que el estroma puede actuar como un escudo que **proteje a** los tumores del infiltrado del sistema inmune. Por ello, un estroma menos denso como el que se observa en los ratones nulos para el gen SPARC permite el reclutamiento del infiltrado inmune y consecuentemente el rechazo del tumor (Sangaletti *et al.*, 2003). Por otro lado, dado que el estroma menos denso en los ratones nulos para SPARC también mostró un número de vasos reducido es posible que la menor irrigación del área también pudiera afectar el crecimiento del tumor (Sangaletti *et al.*, 2003). El sistema angiostatina-endostatina ilustra como las

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

proteínas del estroma pueden ser reservorios de señales que se activan mediante la digestión de sus componentes (Folkman, 2002). Por ello, ciertas células tumorales podrían favorecer la proteólisis de las proteínas del estroma produciendo la inhibición de la angiogénesis mientras que en otros tipos celulares podría estimular la angiogénesis promoviendo el crecimiento tumoral (Chlenski *et al.*, 2006; Sangaletti *et al.*, 2003). En función de estas evidencias intentamos establecer el rol de la matriz extracelular en el crecimiento del melanoma humano mediante la modulación de los niveles de SPARC en las células de melanoma y en las del estroma y monitoreando el crecimiento del tumor y la organización de matriz. Con estos experimentos concluimos que el incremento en la angiogénesis, el depósito de colágeno y el reclutamiento de fibroblastos inducido por la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma no tiene efectos significativos sobre el crecimiento del melanoma en ratones *nude*. Esto nos indicó de manera clara que el crecimiento del melanoma no es esencialmente afectado por la composición y organización del estroma circundante al menos en el tipo de modelo analizado y en los tiempos estudiados considerando que la hiperexpresión mediada por un adenovirus es solo transiente. La reorganización del estroma antes mencionada fue observada en los estadios iniciales del establecimiento del tumor cuando la sobreproducción transiente de SPARC producida por los adenovectores se encontraba en su pico de expresión. Sin embargo, las autopsias a 40 días no revelaron diferencias en la organización de la MEC entre la hiperexpresión de SPARC y los controles con el vector Ad- $\beta$ gal. Por ello, aún queda por probar si la expresión estable de SPARC en células de melanoma podría promover *in vivo* la reorganización del estroma circundante a tiempos más largos y así afectar el crecimiento del tumor. Sin embargo, en estudios preliminares observamos que la hiperexpresión estable en células de melanoma no resultó en una inhibición del crecimiento del melanoma apoyando los resultados obtenidos en la presente tesis (Viale *et al.*, en preparación). Más aún, el hecho que el rechazo tumoral mediado por el tratamiento con Ad-SPas ocurre dentro de las 72 hs posteriores a la administración de las células con expresión disminuida de SPARC sugiere que 10 días de hiperexpresión de SPARC debería ser suficiente para observar un efecto, si existiera, en el crecimiento del melanoma.

El modelo de inyección de células de melanoma humano para generar un tumor en ratón posee ciertas desventajas. El problema de no saber si las células humanas generaban las interacciones apropiadas con el estroma ortólogo llevó a los estudios donde se co-inyectaron las células de melanoma conjuntamente con los fibroblastos humanos. Dado que nuestro objetivo apuntaba a modificar los niveles de SPARC en el entorno tumoral realizamos una transducción *ex vivo* de los fibroblastos humanos con el adenovirus Ad-SP de manera de aumentar la concentración de SPARC, sin modificar

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

directamente a la célula de melanoma. Con este experimento concluimos que la presencia o no de fibroblastos humanos circundantes expresando o no SPARC no tiene efecto en el crecimiento del melanoma consolidando la evidencia que cambios en el estroma circundante inducido por SPARC no tiene una profunda influencia en la progresión del melanoma. De ahora en más, la pregunta a responder sería si las características bioquímicas y la cantidad de SPARC producidas por los fibroblastos circundantes definiría diferencias en su efecto parácrino.

### Efecto de los niveles de SPARC en el crecimiento independiente de anclaje

Regresando a los experimentos *in vitro*, observamos que la hiperexpresión de SPARC anula por completo el crecimiento de las células de melanoma cuando estas se encuentran formando esferoides, mientras que la disminución de SPARC incrementa su crecimiento. El hecho que la hiperexpresión de SPARC, a diferencia de lo que pasa en los esferoides, tiene un bajo o nulo efecto cuando las células son crecidas *in vitro* como monocapa sugiere que SPARC podría afectar la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de células de melanoma humano. En relación a esta hipótesis, hemos observado una reducida capacidad clonogénica de las células de melanoma crecidas en agar semisólido cuando son tratadas con los adenovectores que producen la hiperexpresión de SPARC. Llamativamente, no existen evidencias previas sobre el rol potencial de SPARC en el crecimiento de células tumorales independiente de anclaje. Basu *et al* demostraron, utilizando células obtenidas de ratones nulos para el gen SPARC, que esta proteína puede regular el ciclo celular a través de la inducción de la expresión de p107 y la ciclina A (Basu *et al.*, 1999). Recientemente, la ciclina A ha sido descrita como un blanco directo de c-Jun además de ser necesaria para el crecimiento independiente de anclaje de ciertos tipos de células tumorales (Katabami *et al.*, 2005). Llamativamente, la expresión de SPARC ha sido vista tanto aumentada como disminuida en respuesta a la hiperexpresión de c-Jun (Briggs *et al.*, 2002; Kraemer *et al.*, 1999; Vial *et al.*, 2000). En resumen estos datos tomados en su conjunto, sugieren una relación potencial entre SPARC, ciclina A, Jun y el crecimiento independiente de anclaje favoreciendo la diseminación metastásica del tumor.

### SPARC y angiogénesis

El rol de SPARC en la angiogénesis es fuente importante de controversia. Varios estudios han mostrado que SPARC puede inhibir la angiogénesis a través de la inhibición del

## Discusión – SPARC y estroma tumoral

efecto mitogénico del VEGF sobre las células endoteliales (Chlenski *et al.*, 2006; Kupprion *et al.*, 1998; Nozaki *et al.*, 2006; Said and Motamed, 2005). Por su parte, otros grupos han mostrado que VEGF podría aumentar los niveles de SPARC producida por las células endoteliales (Kato *et al.*, 2001) y que SPARC por si misma podría promover angiogénesis (Brekken *et al.*, 2003). Los presentes resultados indican que la hiperexpresión de SPARC promueve la angiogénesis en los tumores de melanoma humano mediante la cuantificación de microvasos inmunoteñidos con un anticuerpo anti-CD31. Estudios recientes demostraron que el clivaje de SPARC mediado por MMPs libera fragmentos que estimulan o inhiben proliferación y migración de células endoteliales (Sage *et al.*, 2003). Más aún, se ha demostrado que SPARC modula la expresión de MMPs en células de melanoma (Ledda *et al.*, 1997b). Por ello, las evidencias indican que el rol de SPARC en la angiogénesis podría ser dependiente del tipo de célula tumoral y de la disponibilidad de factores presentes como ciertas MMPs que podrían tener algún tipo de influencia sobre dichos procesos.

## Los neutrófilos polimorfonucleares y su papel en el rechazo tumoral

En esta tesis mostramos que la depleción de los PMN del huésped mediante un anticuerpo neutralizante específico es suficiente para revertir completamente el rechazo del melanoma inducido por la disminución de SPARC. Este resultado evidenció definitivamente que los PMN cumplen un rol central en el mecanismo de rechazo inducido por la regulación de los niveles de SPARC, al menos en el modelo *in vivo* de ratón utilizado. Diferentes estudios han mostrado que los PMN son responsables del rechazo de células tumorales expresando ectópicamente citoquinas tales como G-CSF o IL-2 (Motomu Shimizu, 2005; Stoppacciaro *et al.*, 1994). Por otro lado, otros grupos han mostrado que los PMN son requeridos para la adquisición del fenotipo metastásico por parte de las células del fibrosarcoma benigno de ratón (Tazawa *et al.*, 2003). Además, la depleción de los PMN en ratones *nude* inmunodeficientes mediante la utilización del clon de hibridoma RB6-8C5 anti Gr-1 (anti-PMN) inhibe el crecimiento de los tumores inducidos por luz ultravioleta (Pekarek *et al.*, 1995). Por ello parece plausible que los PMN pudieran jugar un rol diferente dependiendo del tipo de tumor, o bien, los PMN deberían comportarse diferencialmente en función del estadio que esté cursando el crecimiento tumoral.

## Discusión: SPARC en el modelo de *Drosophila*

A lo largo de todos los phyla del reino animal, la membrana basal, como estructura definida, constituye uno de los reservorios más importantes de las moléculas de matriz más antiguas y conservadas (Hutter *et al.*, 2000). Sin embargo, al comparar los componentes de la matriz entre invertebrados (i.e *C. elegance*) y mamíferos sólo un 30 % de las moléculas tiene su ortólogo en los vertebrados. Proteínas como la elastina, el colágeno fibrilar<sup>20</sup>, la fibronectina, ciertos polímeros del intersticio y el propio tejido conectivo están ausentes (Hutter *et al.*, 2000; Sicot *et al.*, 1997). Sin embargo, nuestra molécula de estudio, la proteína SPARC, se encuentra conservada con un alto % de homología en el sistema biológico de *Drosophila melanogaster*. Esto indica que su función y sus moléculas interactuantes deberían estar conservadas en su mayoría, cosa que convierte a este insecto en un potencial nicho para la búsqueda de interacciones génicas relacionadas a SPARC y sus vías de señalización asociadas. Es decir, el paradigma de tener un sistema reducido en el número de componentes pero conservado funcionalmente fue la razón más importante para su elección como modelo de estudio.

De acuerdo a lo expuesto hasta el momento queda claro que SPARC cumple un rol en la regulación del comportamiento celular afectando la forma, adhesión, proliferación, migración y diferenciación. También se ha subrayado que varios de estos procesos celulares están alterados durante el desarrollo tumoral y que en ciertos casos, existe una correlación entre la expresión de SPARC y la agresividad de las células tumorales. Por otra parte, la conservación de SPARC en metazoos, con respecto a la secuencia, modularidad y asociación con la lámina basal durante el desarrollo, sugieren que ciertas funciones de esta glicoproteína también estarían conservadas. La inducción de la anti-adhesión de las células, con las implicancias que puede tener para la forma y movilidad celular, es una actividad de SPARC que podría considerarse ancestral y que puede explicar, hasta cierto punto, los fenotipos aberrantes en nematodos y en anfibios por niveles alterados de SPARC (Damjanovski *et al.*, 1997; Schwarzbauer and Spencer, 1993).

En resumen, con el fin de profundizar los conocimientos sobre la biología de SPARC, en relación a sus efectos tumorigénicos, e identificar nuevos blancos para el desarrollo de terapias antitumorales, decidimos utilizar el modelo de *Drosophila melanogaster* como herramienta complementaria a los estudios que nuestro grupo de investigación estaba realizando en células de mamíferos.

<sup>20</sup> Los genes del colágeno fibrilar aparecen en otros invertebrados, indicando que los gusanos podrían haber perdido o bien no adquirido ciertos componentes de la matriz respecto de otros linajes filogenéticos.

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

Nuestra hipótesis de trabajo fue que SPARC es requerida en eventos asociados a la adhesión y la migración celular durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*. Así, la desregulación de los niveles de expresión de SPARC durante el desarrollo produciría fenotipos aberrantes relacionados con dichas propiedades biológicas. Por ello, los estudios realizados se basaron en procesos morfogénicos que involucran movimientos tisulares a gran escala, como por ejemplo la gastrulación, la extensión y retracción de la banda germinal y el cierre dorsal durante la embriogénesis.

### Fenotipos de pérdida de función de dSPARC

Durante la realización de este trabajo llevamos a cabo estudios preliminares sobre los efectos de la ausencia de SPARC en embriones de *D. melanogaster*. Dado que hasta la fecha no hay mutantes de dSPARC descritas en la literatura o disponibles en los centros de stocks públicos, decidimos analizar las deleciones cromosómicas que incluyen el locus de dSPARC. Las deleciones Tl-I y ro80b presentan fenotipos relacionados con adhesión y migración que son similares entre sí como fallas en la retracción de la banda germinal, fallas en el cierre dorsal y defectos en el patrón de segmentación. La pregunta que surgió fue ¿Cuáles de los genes comunes a ambas deleciones podrían estar ocasionando los fenotipos que observamos?

Según los datos disponibles en el FlyBase (Consortium, 2003), la región delecionada en ro80b incluye unos 40 genes (**Tabla 6**). La ausencia de dSPARC podría explicar, sola o en conjunto con otro/s gen/es, la aparición de los fenotipos, aunque no puede descartarse que otro/s gen/es determinen la aparición de dichos fenotipos, siendo nula la influencia de dSPARC. Según la información disponible en la bibliografía (**Tabla 6**), puede inferirse que al menos algunos de los fenotipos podrían deberse a la ausencia de alguno de los otros genes, y no de dSPARC. Por ejemplo, es probable que los embriones con cutículas que carecen por completo de dentículos ventrales sean producto de la ausencia de Toll (Chasan *et al.*, 1992). Asimismo, los defectos en los dentículos, fusiones y/o ausencias de bandas, podrían estar reflejando la fusión y/o ausencia de segmentos abdominales, y explicarse por ausencia de Ets97D (Schulz *et al.*, 1993). Por el contrario, la información disponible hasta el momento no permite suponer que mutantes de pérdida de función de ninguno de los genes delecionados en ro80b ocasionen defectos en la retracción de la banda germinal o defectos en el cierre dorsal. Por lo tanto, parece razonable suponer que la ausencia de dSPARC en estos embriones podría estar ocasionando defectos en estos eventos morfogénicos. Que dSPARC cumpla una función en la embriogénesis resulta lógico si se tiene en cuenta que la expresión endógena más temprana de dSPARC coincide con el momento en el que comienza la retracción de la banda germinal

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

(Martinek *et al.*, 2002) y que dSPARC se acumula en la lámina basal que subyace a los epitelios.

Gen	Función conocida	Fenotipo mutante	Referencia
Toll (TI)	Receptor de membrana involucrado en respuesta humoral antimicrobiana. También interviene, junto con su ligando <i>spz</i> , en la determinación del eje dorso/ventral en el embrión.	El mesodermo está reducido y solo presente en la parte posterior del embrión. Se observa pérdida de estructuras ventrales y expansión de estructuras laterales y dorsales.	[Schneider, 1991 #3211; Chasan, 1992 #3175]
Amontillado (amon)	Se expresa en embriones y larvas. El producto está involucrado en proteólisis.	Las larvas se arrestan, y muestran duplicación de mandíbulas. Aquellas que sobreviven son más pequeñas y responden menos a los estímulos.	(Rayburn <i>et al.</i> , 2003)
His2Av	Variante de histona H2A	No hay reportes en embriones hasta el momento.	(Consortium, 2003)
Rough (ro)	Factor de transcripción de la ARN Polimerasa II, involucrado en la determinación de destino celular en el ojo del adulto.	Adultos con ojos "rugosos", en los que la superficie del ojo es irregular.	(Yasuda <i>et al.</i> , 1995)
Ets97D	Expresado en las células polares de embrión. El producto tiene actividad de unión a ADN y está involucrado en la localización de ARNm dentro del núcleo.	Embriones con defectos en la segmentación abdominal, desde defectos leves en A4-A7 hasta fusiones y/o deleciones de segmentos A2-A7.	(Schulz <i>et al.</i> , 1993)
Scribbled (scrib)	El producto se localiza en las uniones septadas. Respuesta a sustancias químicas.	Embriones con cutículas pobremente diferenciadas. Hay anomalías en los discos imaginales, el cerebro de larvas y olfato en el adulto.	(Bilder <i>et al.</i> , 2000; Tanentzapf and Tepass, 2003)

**Tabla 6. Información disponible sobre los genes delecionados en ro80b.** En la tabla se muestra la información disponible de los casi 40 genes (CG's) involucrados en la deficiencia cromosómica ro80b de *Drosophila melanogaster*.

Si bien resta establecer el patrón de expresión y función biológica de estos y otros genes incluidos en la deleción, la participación de dSPARC en la retracción de la banda germinal y en el cierre dorsal de los embriones continúa siendo una hipótesis. Para confirmarla intentamos en varias oportunidades recombinar los elementos inductores de la expresión de dSPARC en moscas portadoras de la deleción para analizar el rescate fenotípico. Lamentablemente, en ninguna de las oportunidades obtuvimos recombinantes. Por lo tanto, para seguir avanzando en la caracterización del fenotipo asociado a la pérdida de función de SPARC, hubiera sido importante lograr el silenciamiento específico del gen (Kennerdell and Carthew, 2000). Si bien no se ha reportado el silenciamiento por ARNi de otros componentes de la matriz extracelular de *Drosophila*, esta metodología ha sido aplicada con éxito al estudio de proteoglicanos. Empleando esta herramienta se evaluó el requerimiento de los dos glicanos de

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

*Drosophila*, *dally* y *dally-like*, para la señalización de las vías Wingless (Wg) y Hedgehog (Hh) en la epidermis de embriones (Desbordes and Sanson, 2003). En este sentido hemos intentado poner en práctica la técnica de silenciamiento del gen por ARNi, mediante microinyección de embriones preblastodérmicos con RNA doble cadena de dSPARC. Lamentablemente, un alto porcentaje de los embriones inyectados con buffer (los individuos control) evidenciaron efectos en el patrón de la cutícula. De esta manera la posibilidad de evaluar el fenotipo de pérdida de función quedó desechada hasta la reciente liberación de la biblioteca de interferencias del *Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences* (IMBA) (Dietzl *et al.*, 2007). Es nuestra intención continuar los estudios en este sentido, aunque los mismos exceden los tiempos de esta tesis.

### Fenotipos de ganancia de función de SPARC

Datos obtenidos a partir del proyecto de genómica funcional *WOUND* del 6<sup>to</sup> Programa Marco de la Unión Europea, y de la cual nuestro grupo forma parte, habían demostrado fehacientemente que luego de la inducción de un proceso de cicatrización en diferentes modelos de vertebrados e invertebrados demostraron una disminución en los niveles de expresión de SPARC que se mantenía a nivel evolutivo en *Drosophila*, ratón y humano. Por ello, resultaba de gran importancia establecer si la hiperexpresión de SPARC podía impedir el movimiento morfogénico “cierre dorsal”, como modelo de cicatrización de heridas en *Drosophila melanogaster*. En todos los casos se trabajó al menos con dos líneas transgénicas UAS-SP distintas, a fin de independizarse de un posible efecto de posición del transgén (Bunch *et al.*, 1998). En nuestros experimentos tomamos como controles las líneas inductoras, en las que el factor de transcripción Gal4 fue hiperexpresado en el mismo patrón en el que fue hiperexpresada dSPARC. En todos los casos observamos que los embriones provenientes de dichas líneas inductoras mostraron fenotipo salvaje.

Como hemos demostrado, la hiperexpresión ubicua con la línea HS-Gal4 produjo principalmente defectos en el cierre dorsal de los embriones. Al hiperexpresar dSPARC en los hemocitos, que son las principales células productoras de dSPARC y de otros componentes de la matriz extracelular de embriones (Martinek *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 1995), observamos los mismos defectos en la retracción de la banda germinal y el cierre dorsal así como también membranas vitelinas vacías y defectos en el patrón de segmentación. Aún más, los fenotipos obtenidos por hiperexpresión de dSPARC en hemocitos son idénticos a los obtenidos con los inductores tejido-específicos de ectodermo y amnioserosa, los tejidos involucrados activamente en la retracción de la

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

banda germinal y en el cierre dorsal del embrión (Kiehart *et al.*, 2000; Schock and Perrimon, 2002a). Debe notarse que la severidad de los fenotipos producidos por hiperexpresión tejido específica resultaron ser mayores a los observados por hiperexpresión ubicua, como se evidencia por la mayor amplitud de los agujeros dorsales, la ausencia completa de denticulos o la letalidad temprana. Esto pudo deberse a que, al menos con los *drivers* seleccionados para este experimento, los inductores tejido-específicos comenzaron a expresarse antes que el choque térmico necesario para inducir la expresión ubicua. De esta manera, al comenzar antes la hiperexpresión, el producto tiene más tiempo para acumularse y cuando llega el momento del movimiento morfogénico los fenotipos observados podrían ser más severos. Coincidentemente con esta hipótesis, en los resultados de genómica muestran que el inductor de ectodermo posee una lista de genes diferenciales mucho más grande que la generada por el inductor ubicuo, y ello podría explicar la diferencia en los fenotipos encontrados.

La alteración de la matriz extracelular por hiperexpresión de otros componentes de la matriz extracelular y sus receptores, como lamininas e integrinas, también produjo defectos en la retracción de la banda germinal y en el cierre dorsal del embrión (Brown *et al.*, 2000; Schock and Perrimon, 2003). Estos datos coinciden con la idea comúnmente aceptada de que la MEC es esencial en el desarrollo y la diferenciación (Adams and Watt, 1993). Es importante destacar que desconocemos la localización de la proteína en estos experimentos, dado que no contamos con anticuerpos que reconozcan dSPARC. Nuestro grupo de trabajo ha generado una variedad de anticuerpos que reconocen la proteína SPARC humana. Se probó la reactividad de 19 de ellos contra la proteína ortóloga de *Drosophila*, pero ninguno de ellos reconoció la proteína en inmunohistoquímica de embriones. Esto motivó que en el laboratorio se comenzara una estrategia de producción de anticuerpos contra dSPARC. Utilizando la proteína recombinante humana y péptidos sintéticos (diseñados por nuestro laboratorio) de la molécula de *Drosophila* se realizaron distintos esquemas de inmunización en ratón, rata y conejos sin éxitos hasta el momento. Sin embargo, el hecho de que tanto la hiperexpresión ubicua como tejido-específica de dSPARC ocasionen defectos similares en la embriogénesis sugiere que una vez secretada al fluido extracelular, dSPARC difunde libremente y se localiza en forma relativamente independiente de su sitio de síntesis, depositándose en la MEC por algún mecanismo desconocido. Esta hipótesis se ha demostrado para otras proteínas de la MEC en *Drosophila*. Este es el caso de Tiggrin, la cual se acumula en la matriz extracelular de los tendones, en los sitios de anclaje de los músculos (Fogerty *et al.*, 1994; Martin-Bermudo and Brown, 2000), independientemente del sitio de síntesis (Bunch *et al.*, 1998). La interacción de dSPARC con colágeno tipo IV, principal componente de la lámina basal, ha sido demostrada

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

tanto en vertebrados como en invertebrados (Brekken and Sage, 2000; Hynes and Zhao, 2000; Martinek *et al.*, 2002). En *Drosophila*, esta interacción de dSPARC con colágeno tipo IV podría explicar la concentración de dSPARC en la lámina basal de diversos tejidos embrionarios, como lo sugiere el hecho de que ambas glicoproteínas se coexpresan en hemocitos y en células del cuerpo graso (Martinek *et al.*, 2002).

Nuestros experimentos de hiperexpresión de dSPARC, tanto ubicua como dirigida, apoyan la idea de que los niveles aumentados de dSPARC causan defectos en la retracción de la banda germinal y en el cierre dorsal de los embriones. Asimismo, los defectos observados en el patrón de dentículos, sugieren la participación de dSPARC en el establecimiento del patrón de segmentación embrionario.

### Efecto bifásico de dSPARC

Como se mencionó anteriormente, los resultados de esta tesis indican que a nivel fenotípico tanto el aumento como la disminución de los niveles de dSPARC pueden ocasionar el mismo tipo de defectos en el desarrollo (defectos en la retracción de la banda germinal, defectos en el cierre dorsal y defectos en el patrón de dentículos ventrales). Esto permite postular que dSPARC sería requerida en ciertos eventos morfogénicos del embrión en un rango de concentraciones bastante limitado. De esta manera, la desregulación de los niveles por fuera de este rango en cualquiera de los sentidos ocasionaría defectos similares. De hecho nuestra hipótesis inicial planteaba que esperábamos encontrar defectos en ciertos eventos morfogénicos como resultado tanto de la ausencia como de la expresión aumentada de dSPARC. Lo que no esperábamos era que estos defectos fueran similares, es decir que observáramos la misma clase de fenotipos en ambos casos. También en las alas del adulto pudieron observarse defectos en la adhesión de la bicapa del ala tanto por reducción en la dosis génica (en heterocigotas para la delección) como por hiperexpresión basal (en las líneas UAS-SP) de dSPARC. Sin embargo, debemos tener en cuenta que los fenotipos observados en las delecciones que incluyen a dSPARC pueden provenir de una sinergia entre diferentes genes delecionados junto con SPARC.

### Función de SPARC a nivel celular

Parece estar claro que dSPARC está involucrada en al menos dos eventos morfogénicos del embrión: la retracción de la banda germinal y el cierre dorsal. Esta información de experimentos *in vivo* puede ser interpretada en base a las evidencias de los efectos de SPARC a nivel celular. En cierta manera la retracción de la banda germinal y el cierre

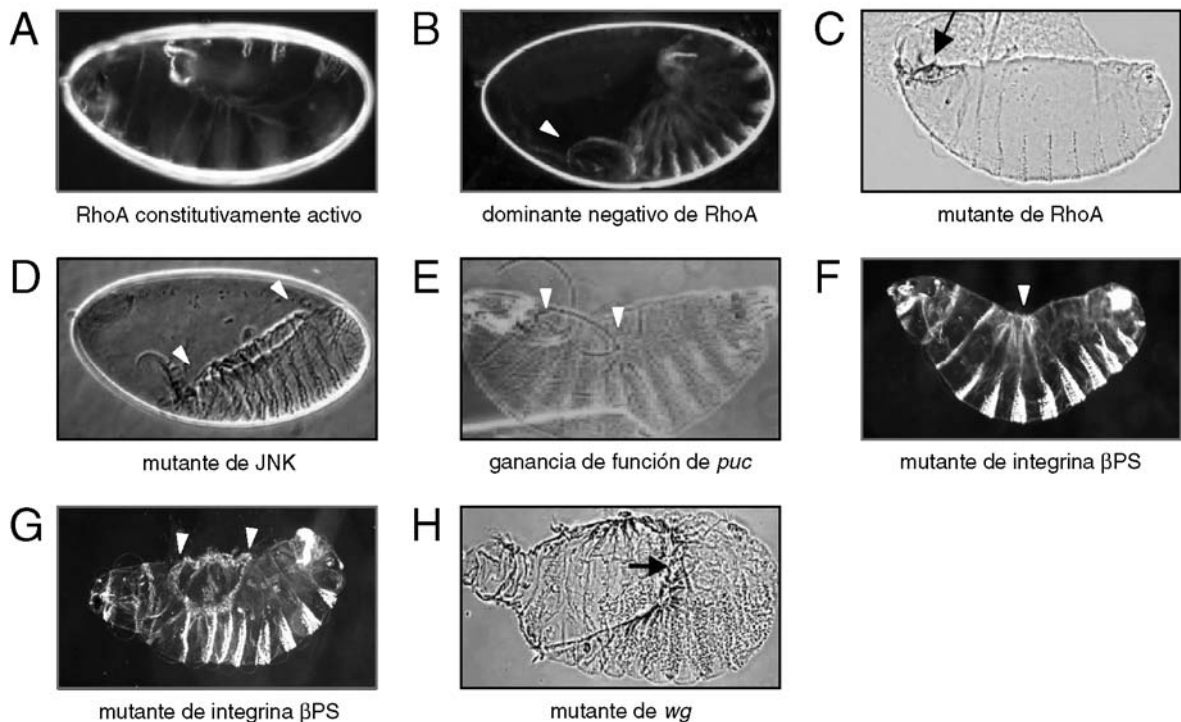
## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

dorsal del embrión, a pesar de ocurrir en distintos momentos, son eventos dependientes. En ambos eventos morfogénicos están involucrados la movilidad, la adhesión y el cambio de forma de dos epitelios distintos, la amnioserosa y el ectodermo. Los efectos de SPARC en células en cultivo han sido estudiados casi exclusivamente en vertebrados, conociéndose desde hace décadas el efecto de SPARC sobre la adhesión celular (Sage *et al.*, 1989b). Como se mencionó en la Introducción, SPARC promueve un estado de adherencia intermedio en el que la migración estaría facilitada. Este proceso fue bien descrito para las células endoteliales (Murphy-Ullrich, 2001). Las tasas más altas de migración celular se dan en tejidos que están sufriendo remodelación como ocurre en la embriogénesis, la cicatrización de heridas y en procesos inflamatorios. No obstante, este estado debe ser regulado negativamente para no transformarse en un proceso anormal o displásico. Si bien SPARC podría estar involucrada en la estimulación de la migración en estadios tempranos de la respuesta a injuria, por ejemplo, su posterior disminución a tiempos intermedios estaría relacionada con la promoción de un estado de regulación negativa de la migración, la angiogénesis y la secreción de matriz. En el estado en el que las células están completamente redondeadas, la migración celular no ocurre, posiblemente porque no se genera la fuerza contráctil necesaria para el movimiento celular dirigido. La migración celular puede entonces fallar por lo tanto en ambos extremos de adhesión. Según los resultados *in vitro* obtenidos en cultivos de células de S3 de *Drosophila*, inferimos que la función anti-adhesiva de SPARC estaría conservada. Más aún, la proteína de mamíferos sería capaz de inducir un estado de adherencia débil en un sistema de mosca. Entonces, resulta lógico pensar que tanto la ausencia como la hiperexpresión de dSPARC podrían afectar el estado migratorio de las células de la amnioserosa y/o el ectodermo, involucrados en la retracción de la banda germinal y en el cierre dorsal del embrión a través de cambios en el estado de adhesión de las células involucradas. Esta idea está reforzada por la evidencia de que se requieren interacciones de las células de la amnioserosa con la matriz extracelular durante el cierre dorsal (Schock and Perrimon, 2003). Estas interacciones estarían mediadas, en parte, por laminina  $\alpha 1,2$  e integrina  $\alpha PS3 \beta PS$  (Schock and Perrimon, 2003). Sería interesante establecer si el efecto de dSPARC sobre la adhesión celular está mediado por estas moléculas. Además de modular las interacciones de las células con otros componentes de la MEC, dSPARC podría modular las interacciones de las células entre sí. La integridad de los contactos establecidos entre las células de la amnioserosa y del ectodermo durante la retracción de la banda germinal y el cierre dorsal son imprescindibles para el desarrollo normal de los embriones (Schock and Perrimon, 2002a, , 2003). Si bien en *Xenopus* se ha demostrado que SPARC promueve la adhesión entre células epidérmicas *in vivo*, en *Drosophila* se desconoce el efecto de dSPARC sobre

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

la adhesión célula-célula. Estudios de genómica sugieren que las moléculas de adhesión celular, entre ellas las cadherinas, estarían conservadas en *Drosophila* (Hutter *et al.*, 2000; Hynes and Zhao, 2000). Durante el cierre dorsal la adhesión entre células del epitelio dorsal mediada por DE-cadherina es imprescindible para que el ectodermo se cierre adecuadamente (Bloor and Kiehart, 2002). En este sentido, es interesante agregar que en células de melanoma humano hemos comprobado que SPARC regula los niveles de N-cadherina de membrana (Sosa *et al.*, 2007). En el sistema de *Drosophila* quedaría por definir, mediante interacciones génicas podrá evaluarse el posible efecto modulador de dSPARC sobre este tipo de conexiones celulares.

Varios estudios han demostrado que se dan rearrreglos en el citoesqueleto durante la retracción de la banda germinal y el cierre dorsal en *Drosophila*. Coincidentemente, varias evidencias relacionan a dSPARC con la modulación del citoesqueleto, lo cual a su vez tiene efectos sobre la adhesión y la contractibilidad celular. En primer lugar, la hiperexpresión de mutantes de RhoA ocasiona defectos severos en la retracción de la banda germinal y en el cierre dorsal (Schock and Perrimon, 2002a; Young *et al.*, 1993). RhoA es una GTPasa de la familia Rho de la cual se ha demostrado función como regulador del citoesqueleto en mamíferos y en *Drosophila*. Los fenotipos de cutícula de embriones en los que se hiperexpresa una forma constitutivamente activa o una forma dominante negativa de RhoA son idénticos a los obtenidos en nuestros estudios por hiperexpresión de dSPARC (**Figura 50**). La forma constitutivamente activa de RhoA induce la contracción de complejos de actina y miosina, e inhibe fuertemente la migración celular en ensayos de cicatrización. La forma dominante negativa también inhibe la migración pero disrumpe la contracción de los complejos de actina y miosina. Se observó que la expresión de ambas variantes de RhoA en las células de la amnioserosa produce defectos en la retracción de la banda germinal (**Figura 50A**) y en el cierre dorsal (**Figura 50B**) (Schock and Perrimon, 2002a). Dado que estas dos construcciones deberían causar efectos contrapuestos, se puede inferir que también en el caso de RhoA existe un efecto bifásico, similar al que observamos para dSPARC. Preliminarmente, el hecho de que la hiperexpresión de dSPARC y de formas mutantes de RhoA ocasione anomalías fenotípicas similares sugiere que ambas proteínas podrían participar en la misma vía. Hay otras evidencias provenientes de estudios en células de mamífero que apoyan esta idea de interacción funcional SPARC-RhoA. Integrantes de nuestro laboratorio han demostrado que hSPARC modula la arquitectura del citoesqueleto de actina y la distribución de las adhesiones focales en células de melanoma humano (Salvatierra *et al.*, en preparación). En este trabajo los autores sugieren que SPARC actuaría río arriba de RhoA. En *Drosophila*, existen evidencias experimentales que sugieren que dSPARC podría estar actuando de manera similar.



**Figura 50. Fenotipos cuticulares relacionados a los encontrados mediante la ganancia de función de dSPARC.** En la figura se resumen algunos de los fenotipos de cierre dorsal generados por moléculas discutidas en esta tesis como posibles interactuantes de la vía de dSPARC. **(A)** Cutícula de un individuo con hiperexpresión de una forma constitutivamente activa de RhoA dirigida a la amnioserosa. Se observan defectos en la retracción de la banda germinal, evidenciados por la permanencia de los últimos segmentos abdominales sobre la región dorsal (Schock and Perrimon, 2002b). **(B)** La hiperexpresión de la forma dominante negativa de RhoA también genera defectos en la retracción de la banda germinal sumado a la aparición de fenotipos de cierre dorsal (Schock and Perrimon, 2002b). La cabeza de flecha blanca señala las mandíbulas del individuo fuera del cuerpo. **(C)** Fenotipos de cierre dorsal frontal se observan en presencia de la mutante nula de RhoA (Halsell *et al.*, 2000). La flecha negra señala la ubicación frontal del agujero dorsal. **(D y E)** Clásico fenotipo de cierre dorsal de las mutantes de la vía de *bsk/DJNK* (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996) y la ganancia de función de *puckered* (*puc*) como inhibidor de la vía (Martin-Blanco *et al.*, 1998). Las cabezas de flecha blancas indican los extremos de los agujeros dorsales en ambos individuos. **(F y G)** Cutícula de un embrión con una mutación de pérdida de función de integrina  $\beta$ PS. Observar la constricción dorsal (heterocigosis) y el agujero (homocigosis) respectivamente (Brown *et al.*, 2000). Las flechas blancas señalan la constricción dorsal en F y los límites del agujero en G. **(H)** Cutícula de un embrión mutante para *wg*. La flecha negra señala el límite caudal del agujero frontal del embrión (McEwen *et al.*, 2000).

Estudios posteriores demostraron que RhoA activa la contracción celular, ejerciendo la regulación por medio de la fosforilación de la cadena liviana de miosina (Bloor and Kiehart, 2002). Coincidentemente, existe interacción de dSPARC con Mlc-c, la cadena liviana de la miosina citoplasmática, la cual fue probada mediante un rastreo por doble híbrido del proteoma de *Drosophila* (Giot *et al.*, 2003). Parece razonable postular que la interacción dSPARC-Mlc-c controle la reorganización del citoesqueleto de actina, afectando de esta forma la morfología y la división celular (Young *et al.*, 1993). Sería interesante realizar estudios detallados por microscopía confocal de los movimientos y cambios de forma de las células de la amnioserosa y de la epidermis dorsal (Young *et al.*,

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

1993) de manera de caracterizar histológicamente el efecto de la ganancia de función de dSPARC en el cierre dorsal de *Drosophila*.

### SPARC y vías de señalización

Los fenotipos encontrados con la ganancia de función en *Drosophila* son concluyentes a la hora de concluir que la hiperexpresión de dSPARC es suficiente para generar un efecto en el cierre dorsal y la retracción de la banda germinal. No obstante, este resultado sugiere pero no determina inequívocamente que las vías de señalización involucradas en dichos procesos sean las mismas en las que dSPARC esta participando o activando. La literatura muestra que, principalmente hablando del cierre dorsal del embrión, las vías de señalización participantes en este movimiento son:

- (1) la vía de *bsk* o las quinasas de JUN (JNK) en mamíferos (Noselli and Agnes, 1999)
- (2) la vía canónica de *wg* (Morel and Arias, 2004)
- (3) la vía de decapentaplégico (*dpp*) o su homólogo TGF- $\beta$  en mamíferos (Dequier *et al.*, 2001)
- (4) las transducciones *outside-in* mediadas por las integrinas (Brown *et al.*, 2000)

¿Qué evidencias existen respecto de la interacción de dSPARC con alguno de estos grupos de genes que participan en el cierre dorsal? Principalmente las evidencias provienen de estudios llevados a cabo en células de mamíferos. Como se mencionó en la Introducción, desde hace tiempo se conoce la existencia de regulación recíproca de componentes de la vía TGF- $\beta$  (homólogo de *dpp*) y SPARC, en la que ambas moléculas estimulan la producción de la otra. Por otra parte, se vio recientemente que en células mesangiales SPARC regula los niveles y la actividad de JNK en forma indirecta vía TGF- $\beta$ , y directamente por aumento de los niveles y actividad del factor de transcripción c-jun (Francki *et al.*, 2004). En *Drosophila* también se sabe que la señalización por JNK es indispensable para activar la expresión de *dpp* en las células del borde del ectodermo durante el cierre dorsal (Kiehart *et al.*, 2000), pero se desconoce si existe relación entre *dpp* y dSPARC. Las integrinas, integrantes del tercer grupo de genes involucrados en el cierre dorsal, se discutirán en la próxima sección.

### Relación de SPARC e integrinas en *Drosophila*

Como advertimos al poco tiempo de comenzar con nuestro trabajo, algunos de los fenotipos de hiperexpresión de dSPARC fueron similares a los de algunos mutantes de integrinas (Brown *et al.*, 2000) (ver Figura 50). En *Drosophila*, fallas en el cierre dorsal han sido descritas para mutantes de pérdida de función de las integrinas  $\alpha$ PS3 y  $\beta$ PS,

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

pero no para las integrinas  $\alpha$ PS1 ni  $\alpha$ PS2 (Brown *et al.*, 2000). Por otra parte, la pérdida de función de  $\beta$ PS también ocasiona defectos en la retracción de la banda germinal (Roote and Zusman, 1995), y esto también se observa luego de la hiperexpresión de dSPARC.

Los fenotipos observados en alas también sugieren la interacción de dSPARC con integrinas. En nuestras líneas UAS-SP observamos, con una baja penetrancia pero alta reproducibilidad, la separación de las dos capas del ala del adulto. Coincidentemente, la pérdida de función de las integrinas PS también ocasiona la pérdida de adhesión entre dichas superficies, evidenciada por la formación de ampollas llenas de fluido (Brown *et al.*, 2000) (ver **Figura 50**). Durante el desarrollo de las alas de *Drosophila* (ver “Morfogénesis de las alas” en el Apéndice), los epitelios ventral y dorsal se fusionan por medio de adhesiones célula-célula altamente especializadas, y defectos en este proceso se evidencian por la separación de las capas del ala madura. Las integrinas son conocidas como las principales moléculas mediadoras de esta adhesión (Brown *et al.*, 2000) y se ha sugerido que se adhieren a la membrana basal que rodea la superficie basal de las células epiteliales, donde es probable que dSPARC se localice (Martinek *et al.*, 2002). El fenotipo de ampollas observado en las alas de nuestras líneas UAS SP sugiere que la alteración de los niveles endógenos de dSPARC, por expresión basal del transgén, alteraría el proceso de adhesión mediada por integrinas en estos epitelios. De la misma manera, la hiperexpresión de subunidades  $\beta$ PS en el ala causa fenotipos idénticos a los de pérdida de función de las mismas (Brown *et al.*, 2000). Por lo tanto, también en este caso se describe un efecto dual en moléculas candidatas a interaccionar con dSPARC, lo que podría explicar el efecto bifásico de dSPARC. Como ya hemos mencionado anteriormente, SPARC modula la adhesión de las células a la MEC, probablemente a través de su capacidad de inducir el desensamble de los contactos focales y las fibras de estrés (Lane and Sage, 1994). Coincidentemente con el hecho de que la adhesión a la MEC está mediada principalmente por las integrinas (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998; van der Flier and Sonnenberg, 2001), en células de melanoma humano hemos observado que la redistribución de las adhesiones focales y el remodelamiento del citoesqueleto mediado por SPARC depende de la modulación de los niveles de subunidades específicas de integrinas (Salvatierra *et al.*, en preparación).

Por otra parte, resultados de Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2003) sugieren que la vía de integrinas interaccionaría genéticamente con JNK. Por medio de estudios genéticos y de inmunohistoquímica en alas, estos autores demostraron que tensina, una proteína adaptadora que conecta las integrinas con el citoesqueleto de actina, interactúa funcionalmente con integrinas y con la vía JNK (Lee *et al.*, 2003). Los autores sugieren

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

que tensina podría actuar mediando señales de la vía de integrinas o de la quinasa de adhesiones focales (FAK) hacia la vía JNK. Sería interesante determinar si tensina es necesaria para el cierre dorsal y si esta interacción con la vía JNK se mantiene en las células del borde del ectodermo de embriones. Tanto la mutaciones de ganancia como de pérdida de función de las vías de JNK (**Figura 50D y E**), integrinas (**Figura 50F y G**) y se SPARC, ocasionan defectos en el cierre dorsal, lo que apoyaría la interrelación de las mismas (Brown *et al.*, 2000; Noselli and Agnes, 1999) y nuevamente permitiría explicar el efecto bifásico de dSPARC.

### SPARC en el proceso de segmentación

Entre los defectos observados tanto en la hiperexpresión como en la pérdida de función de dSPARC, se cuentan anomalías en el patrón de dentículos ventrales de la cutícula que podrían reflejar alteraciones en el patrón de segmentación del embrión. Se sabe ya desde hace tiempo que la vía de señalización Wnt / Wingless (Wg) es esencial para la correcta generación de este patrón (Angers-Loustau *et al.*, 1999). Dentro de esta vía, las glicoproteínas de la familia Wg actúan como ligandos y una proteína denominada  $\beta$ -catenina/Armadillo (*arm*) es un elemento clave en la vía de transducción de la señal (Klingensmith and Nusse, 1994). Mutantes de pérdida de función de *wg* o *arm* carecen de cutícula lisa y producen en cambio cutículas con un césped de dentículos ventrales continuo (Cox *et al.*, 2000), indicando que la activación de la vía Wg es necesaria para la diferenciación del ectodermo en la porción más anterior del segmento donde se secreta cutícula libre de dentículos. Sugestivamente, los mutantes *arm* muestran además agujeros dorsales anteriores (Cox *et al.*, 2000; McEwen *et al.*, 2000) (**Figura 50H**), similares a los que se observan en mutantes JNK. En efecto, McEwen y colaboradores reportaron que las cascadas de JNK y Wingless cooperan no solo en el establecimiento del patrón de la epidermis dorsal sino también en el de la epidermis ventral (McEwen *et al.*, 2000). Como se discutió más arriba, dSPARC y JNK podrían interactuar durante el proceso de cierre dorsal embrionario y por lo tanto es posible también que dSPARC interactue además con la vía Wg durante la determinación del patrón de segmentación. Experimentos de interacciones génicas permitirán contrastar esta atractiva hipótesis.

### Cierre dorsal y cicatrización de heridas en *Drosophila*

Desde hace varios años se ha propuesto que ciertos eventos morfogenéticos del embrión son análogos a la reparación de tejidos que ocurre en las heridas (Grose and Martin, 1999). Recientemente se ha propuesto al cierre dorsal de *Drosophila* como modelo para

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

la cicatrización de heridas (Kiehart, 1999; Kiehart *et al.*, 2000). Dado que nuestros resultados sugieren la participación de dSPARC en este proceso, el modelo de *Drosophila* es válido para llevar a cabo estudios de cicatrización de heridas. ¿Cuáles son las semejanzas y cuáles las diferencias entre ambos procesos? En un proceso normal de cicatrización de mamíferos, cuando se produce una herida que interrumpe la integridad de la epidermis, el defecto es temporariamente cubierto por un coágulo de fibrina, que provee una matriz extracelular provisional y a la vez actúa como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento. Así comienza el proceso de cicatrización, el cual involucra el reclutamiento de células inflamatorias, fibroblastos y una red densa de capilares, lo cual genera un tejido de granulación. Los fibroblastos comienzan la deposición de matriz extracelular rica en colágeno, y una parte se diferenciarán en miofibroblastos, capaces de generar fuerza contráctil y acercar los bordes de la herida. Los queratinocitos de los bordes de la herida disuelven el coágulo de fibrina a medida que migran, y van cubriendo la región dañada, hasta formar una monocapa. Finalmente, células provenientes de los márgenes de la herida reconstituyen el epitelio estratificado y la lámina basal subyacente (Martin, 1997). En *Drosophila*, hacia el final de la embriogénesis, ocurre el cierre dorsal del embrión, en el que los márgenes laterales del ectodermo cubren una membrana dorsal extraembriónica, la amnioserosa, y se sellan en la línea media dorsal en una lámina epitelial continua (Grose and Martin, 1999). Este movimiento parece estar conducido en parte por la contracción de las células de la amnioserosa (Kiehart *et al.*, 2000), la cual es análoga a la contracción del tejido granular en la herida (Grose and Martin, 1999). El movimiento activo del ectodermo por contracción del cinturón supracelular de actina y miosina en las células del borde es otro de los componentes que intervienen en el cierre dorsal (Kiehart *et al.*, 2000). Este movimiento está precedido por la formación de un cinturón citoplasmático de actina y miosina en los ápices de las células del borde del ectodermo, conectado al de las células vecinas por medio de contactos adherentes. La contracción de este cinturón continuo de actina y miosina en cierta forma paraleliza la contracción de los bordes de una herida durante la cicatrización. La principal diferencia entre ambos procesos radica en el hecho de que el borde de una herida disminuye progresivamente su extensión, mientras que el borde lateral del ectodermo durante el cierre dorsal mantiene su longitud original (Grose and Martin, 1999). Respecto de las cascadas de señalización que controlan ambos procesos, se ha determinado la participación de JNK, TGF- $\beta$ /*dpp* y de las GTPasas pequeñas de la familia Rho en el cierre dorsal de *Drosophila*, siendo las últimas dos vías comunes a la cicatrización en mamíferos (Martin, 1997; Noselli and Agnes, 1999). Otra semejanza radica en el hecho de que la división celular se reprime en las primeras etapas del cierre dorsal y de la cicatrización (Grose and Martin, 1999).

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

La sumatoria de semejanzas entre la cicatrización de tejidos de mamíferos y el modelo de cierre dorsal sugieren que SPARC, definitivamente involucrada en el modelo simplificado de mosca, estaría jugando un importante papel en el complejo proceso de cicatrización que se da en los epitelios de animales superiores.

### Genómica de la ganancia de función de SPARC en *Drosophila*

A modo de resumen presentamos una tabla con los genes diferencialmente expresados en los experimentos de genómica de ganancia de función en *Drosophila melanogaster* (Tabla 7).

Gen	Función conocida	Función en mamíferos	Referencia
Rab35 (33014)	<b>Familia de proteínas pequeñas que unen GTP</b> Tráfico de membranas Fusión lisosomal Señalización PIP2 División celular	En ratón ( <b>Rab35</b> ), participa en la regulación del tráfico de membranas durante el proceso de resorción del hueso por parte de los osteoclastos	(Zhao <i>et al.</i> , 2002)
rdgB (32340)	<b>Proteína integral de membrana</b> División celular - Citocinesis Tráfico de lípidos Remodelación del citoesqueleto Afecta señalización PIP2-DAG	En mamíferos <b>Nir2</b> es un regulador de la citocinesis, inhibe RhoA a través de un dominio Rid y controla morfogénesis celular	(Lev <i>et al.</i> , 1999; Litvak <i>et al.</i> , 2002; Tian <i>et al.</i> , 2002)
misato (33119)	<b>Gama-tubulina y GTPasa</b> División celular – Reparto organelas Fusión de membranas Transporte de lípidos - homeostasis Transporte mediado por microtúbulos	El gen <b>MSTO</b> en mamíferos fue relacionado al transporte de mitocondrias, proliferación y apoptosis	(Kimura and Okano, 2007; Miklos <i>et al.</i> , 1997)
Lsd2 (32437)	<b>Proteína citoplasmática polar</b> Transporte de lípidos - homeostasis Transporte mediado por microtúbulos Participación en desarrollo Señalización PI3k	La <b>perilipin</b> , homóloga de vertebrados de Lsd2, participa en la homeostasis de los triglicéridos y el almacenamiento de lípidos	[Cohen, 2005 #3231; Vereshchagina, 2006 #3230; Teixeira, 2003 #3233]
Hsp26	<b>Chaperona</b> - Resistencia al estrés Condensación de cromosomas Longevidad	ND	(Zhao <i>et al.</i> , 2007)
NPFR1	<b>Receptor de neuropéptidos</b> Señalización vía proteína G	<b>PPYR1</b> ( <i>pancreatic polypeptide receptor 1</i> ) relacionado con la respuesta al alcohol	(Garczynski <i>et al.</i> , 2002; Wen <i>et al.</i> , 2005)
drosomycin	<b>Péptido antimicrobiano y antifúngico</b> Inmunidad innata	Inmunidad innata	(Jenssen <i>et al.</i> , 2006; Jiggins and Kim, 2005)
HDAC4	<b>Acetilasa Clase II</b> Acetilación de histonas Señalización PI3k	<b>HDAC4</b> participa en la regulación de la transcripción. Control del ciclo, senescencia y diferenciación	(Wade, 2001)

**Tabla 7. Biología de los genes diferencialmente expresados en *Drosophila* con los inductores ubicuos (HS) y de ectodermo (69B).** La tabla muestra el detalle funcional de los siete genes nombrados (los cinco genes restantes corresponden a CG's sin función descrita).ND: no existen datos disponibles.

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

A continuación mencionaré brevemente algunas características biológicas relevantes de los genes relacionados a la ganancia de función de SPARC.

El tráfico de membranas está involucrado en una gran variedad de funciones biológicas y la resorción de hueso por parte de los osteoclastos es una de ellas (Zhao *et al.*, 2002). **Rab35** junto a otros miembros de la familia de proteínas pequeñas que unen GTP (*small GTP-binding proteins of rab family*) han sido implicadas en la resorción de hueso en células de mamífero. Utilizando cultivos de osteoclastos murinos el grupo de Zhao *et al* reportó la asociación de estas moléculas con el reciclado de membrana en vesículas y la motilidad celular. Además, especulan sobre una posible participación en la secreción de enzimas lisosomales, como la catepsina, durante el proceso de degradación del hueso (Zhao *et al.*, 2002). Si bien en invertebrados esta función puede no estar presente, el homólogo de este gen en mamíferos (también llamado Rab35), podría estar relacionado con la funcionalidad de SPARC. Efectivamente, SPARC fue descrita como una proteína de matriz asociada al hueso (Termine *et al.*, 1981) con un importante papel en el desarrollo y crecimiento del tejido óseo (Nomura *et al.*, 1989b).

El estadio final de la división celular, la citocinesis, es un complejo mecanismo que requiere una delicada coordinación entre la membrana plasmática y el citoesqueleto celular. La familia de las pequeñas GTPasas de Rho y sus efectores son en parte encargados de dicha regulación. En un trabajo de reciente publicación se determinó que la proteína **Nir2** (el homólogo en mamíferos de **rdgB**) (Lev *et al.*, 1999), localizada en el aparato de Golgi durante la interfase y en el surco de división durante la citocinesis, es capaz de regular la división de citoplasmas (Litvak *et al.*, 2002). Es interesante destacar que, Nir2 colocaliza con la pequeña GTPasa RhoA en la mitosis. La región N-terminal de esta molécula contiene un dominio de transferencia de fosfatidilinositol y un dominio inhibitorio de Rho (Rid) (Tian *et al.*, 2002). La hiperexpresión del dominio Rid truncado bloquea por completo la citocinesis hecho que mostró a Nir2 como un nuevo regulador del último paso de la división celular (Litvak *et al.*, 2002). Más aún, estos autores mostraron como el dominio Rid era capaz de inhibir la formación de fibras de estrés mediadas por Rho y la activación de RhoA mediada por ácido lisofosfatídico (LPA). La inyección de anticuerpos contra Nir2 dentro de neuronas disminuye notoriamente la formación de neuritas mientras que la hiperexpresión disminuye la retracción de las mismas (Tian *et al.*, 2002). Por lo dicho, además de su función en la citocinesis, Nir2 se muestra como un potente regulador de la reorganización del citoesqueleto y la morfogénesis celular a través de su interacción con la pequeña GTPasa Rho (Tian *et al.*, 2002). Resta por verse si Nir2 podría mediar algunos de los efectos de SPARC sobre la reorganización del citoesqueleto (Salvatierra *et al.*, en preparación)

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

**Misato** (*mst*) es un gen conservado filogenéticamente desde levaduras hasta mamíferos. Posee una región homóloga a la familia de las GTPasas y otra con homología a la gama tubulina. La proteína se localiza principalmente en la membrana exterior de la mitocondria (Kimura and Okano, 2007). El silenciamiento del gen mediante RNAi produce, en células tumorales (HeLa), una importante disminución en el crecimiento y un aumento de la apoptosis. De esta manera, el aumento de *mst* inducido por SPARC es concordante con la función protumoral adjudicada a esta proteína.

Las vacuolas de lípidos son las más importantes organelas de almacenamiento de lípidos neutrales (Fauny *et al.*, 2005). La proteína **Lsd2** (*Lipid Storage Droplet 2*) de *Drosophila* tiene sus homólogos en mamíferos representados por una familia funcional que posee de manera conservada el dominio PAT (Robenek *et al.*, 2005). La **perilipina**, una de los miembros más estudiados de dicha familia, se encuentra involucrada en la regulación del almacenamiento de lípidos en el metabolismo de mamíferos. El ratón nulo para *perilipina* posee una reducción del 30 % del tejido adiposo (consumiendo igual cantidad de alimento) y una producción de leptinas aumentada (Tansey *et al.*, 2001). La actividad lipolítica inducida naturalmente por *perilipina* está dramáticamente atenuada en los ratones nulos para la *perilipina*. En su conjunto estos datos señalan a la *perilipina* como un potencial blanco de terapia en los problemas asociados a la obesidad (Tansey *et al.*, 2001). En este punto es fundamental hacer referencia a que SPARC también ha demostrado regular el metabolismo lipídico. En un estudio de hibridización sustractiva sobre tejido adiposo de ratones obesos GTG (ratones obesos inducidos con “*gold thioglucose*”), SPARC se encontró dramáticamente sobreexpresada (Tartare-Deckert *et al.*, 2001). Este aumento en la expresión de SPARC en tejido adiposo en fenotipos de obesidad fue confirmado recientemente (Chavey *et al.*, 2006). Más aún, estudios en pacientes obesos y con enfermedad coronaria demostraron un aumento de SPARC en plasma respecto a sus controles normales (Takahashi *et al.*, 2001). Por otro lado, la ausencia de SPARC en ratones null para esta proteína provoca un aumento en la cantidad de grasa subcutánea pero sin modificaciones en el peso. Esto se ve reflejado en el fenotipo de los adipocitos, que cambia dramáticamente en los ratones null respecto a los normales (Bradshaw *et al.*, 2003). En resumen SPARC está involucrada en la homeostasis del tejido adiposo, al igual que la *perilipina*. Podríamos especular que al menos algunas de las acciones de SPARC sobre tejido adiposo podrían estar mediadas por *perilipina* en mamíferos.

La **Hsp26** de *Drosophila* no tiene un claro homólogo en mamíferos. En la mosca, se reportó que su expresión está relacionada con eventos de acetilación de histonas (Zhao *et al.*, 2007). Otra de las funciones biológicas asociadas a la Hsp26 es la regulación de la

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

longeidad. Para muchos autores la resistencia al estrés está relacionada con la vida media de los individuos (Wang *et al.*, 2004). No obstante la chaperona Hsp26 no es el único gen diferencial relacionado con la acetilación de histonas. HDAC4 es una acetilasa de Clase II que se encuentra disminuida en presencia de la hiperexpresión de dSPARC. La correcta deacetilación está vinculada al control del ciclo celular, la senescencia y la inhibición de crecimiento por contacto. Además, existen numerosos trabajos que asocian una inapropiada deacetilación de histonas (por pérdida de función) con el proceso de transformación maligna y progresión tumoral (Wade, 2001).

Al hacer un resumen de las funciones biológicas presentes en el grupo de genes comunes (diferenciales de 69B  $\cap$  HS), encontramos que existe un núcleo o *core* ontológico interrelacionado y que además se repite en varios genes de la tabla 7:

- (a) Tráfico de membranas
- (b) Señalización de PI3K
- (c) Remodelación de citoesqueleto
- (d) Homeostasis de lípidos
- (e) División celular - Citocinesis

Futuros trabajos estarán orientados a evaluar el rol de SPARC en las vías de señalización mencionadas y los eventos celulares relacionados.

### El cáncer y las heridas que no curan: SPARC en el proceso de cicatrización

Como hemos discutido ampliamente, nuestros resultados muestran de manera concluyente que la hiperexpresión de dSPARC es capaz de generar fenotipos en el movimiento morfogénico de *Drosophila melanogaster* llamado cierre dorsal. Más aún, existe un consenso generalizado que señala a dichos fenotipos como resultado de un proceso de cicatrización impedida. ¿Pero cómo se relacionan estos nuevos datos con la bibliografía de SPARC y la cicatrización de heridas en vertebrados?, o tratando de llegar más profundamente al problema, ¿Cómo podemos relacionar los fenotipos de *Drosophila* con nuestra problemática de base que es el desarrollo y la progresión del cáncer?

Se ha demostrado que las proteínas matricelulares participan en procesos relacionados con la reparación tisular (Kyriakides and Bornstein, 2003). La cicatrización de heridas dérmicas involucra varios procesos que pueden ser afectados por la ausencia de SPARC: (a) regulación de la síntesis de distintos componentes de la MEC, (b) migración celular,

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

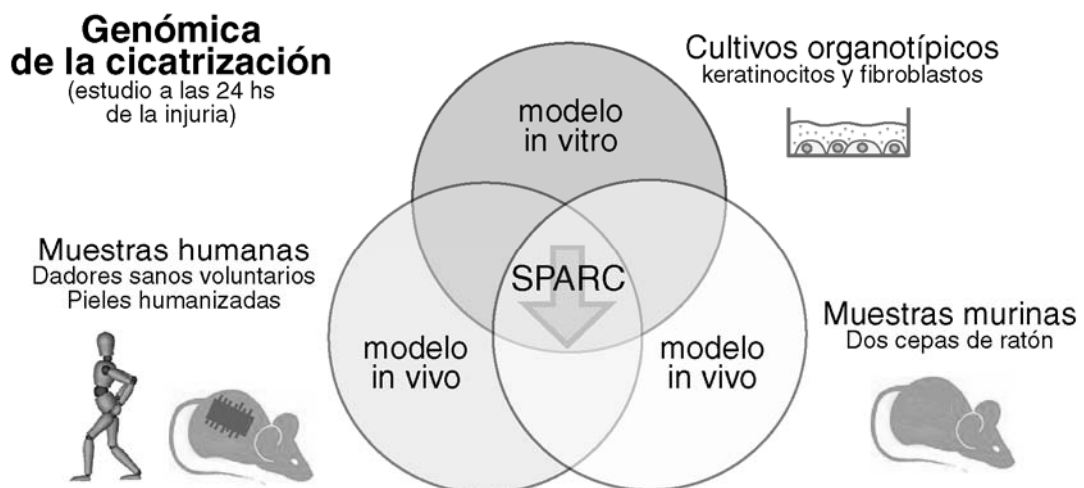
(c) proliferación y (d) reclutamiento y diferenciación de componentes celulares provenientes del tejido conectivo. Los ratones nulos para uno o más genes de la familia de proteínas matricelulares exhiben fenotipos en la cicatrización y SPARC no es la excepción. Los ratones nulos para SPARC muestran un fenotipo complejo que incluye formación temprana de cataratas, osteopenia y piel con contenido de colágeno reducido y alteraciones en la cicatrización (Bradshaw and Sage, 2001). Distintos grupos han mostrado evidencias contradictorias respecto del efecto de SPARC en la cicatrización. Basu y colaboradores (Basu *et al.*, 2001) encontraron en ratones nulos para mSPARC una disminución en la cicatrización utilizando el modelo de heridas extensas (25 mm). Por su parte, el grupo de Bradshaw observó que la pérdida de función de SPARC provoca una cicatrización acelerada en heridas pequeñas (5 mm), asociada a un contenido menor de colágeno I en el el tejido conectivo asociado a la herida (Bradshaw *et al.*, 2002). En este trabajo los autores proponen que el contenido reducido de colágeno facilitaría la contracción de la herida (Bradshaw *et al.*, 2002). En un trabajo reciente se demostró que el doble mutante SPARC-trombospondina posee el mismo fenotipo de cicatrización acelerada encontrado en el raton nulo de SPARC (Puolakkainen *et al.*, 2005). Mas aún, en un trabajo publicado este año se muestra como la expresión de SPARC en úlceras gástricas esta aumentada concordantement con nuestro modelo de cicatrización impedida generada por la ganancia de función de SPARC (Phan *et al.*, 2007).

A pesar de los resultados aparentemente contradictorios encontrados por el grupo de Basu, el resto de las investigaciones coincide en que la falta de SPARC aceleraría el proceso de cicatrización. Pero, analicemos más profundamente cuáles serían los mecanismos moleculares asociados a SPARC y cicatrización. En primer lugar surge la hipótesis de la influencia de SPARC sobre la regulación positiva de la actividad de TGF- $\beta$  (Bassuk *et al.*, 2000; Francki *et al.*, 2004). Se ha reportado que los ratones deficientes en Smad-3 (un componente de la via de señalización de TGF- $\beta$ ) también presentan una cicatrización acelerada comparada con los ratones salvajes (Ashcroft *et al.*, 1999). Por otro lado, la inhibición de PDGF, bFGF y VEGF por parte de SPARC debe ser tomada en cuenta dentro de este análisis. Los tres factores mencionados han sido implicados como estimuladores de la cicatrización en numerosas publicaciones (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), hecho que apoya la línea de pensamiento que señala a SPARC como un inhibidor o modulador del proceso. La estructura de la dermis, en particular las fibras de colágeno, también deberían estar jugando un papel funcional en la cicatrización modulada por SPARC. Los ratones nulos para SPARC presentan un tejido conectivo muy laxo y compuesto por fibras cortas de colágeno. Este fenotipo podría permitir un infiltrado celular masivo relacionado con una más fácil degradación de la MEC. Más aún, la

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

contracción de un tejido de esas características podría ser favorecida al no tener una matriz tan estructurada como en los ratones salvajes. Por último, la composición adiposa de la piel está aumentada en los individuos nulos para SPARC (Bradshaw *et al.*, 2003). Muchas de las células que invaden la zona de injuria son originadas de la capa grasa y muscular subdérmica (Kurman and Argyris, 1975). Esto podría tener como consecuencia un aumento de la disponibilidad de las células participantes del evento. Más aún, ciertas moléculas producidas en la hipodermis, como las leptinas, se las ha relacionado con la aceleración de la cicatrización haciendo especular a los autores sobre su participación en el proceso acelerado de cicatrización que poseen los ratones nulos para SPARC.

Ha quedado demostrado que la hiperexpresión de dSPARC es un buen modelo de cicatrización impedida en *Drosophila*; no solo apoyado por los fenotipos encontrados sino que además es sustentado por las evidencias de la literatura que señalan a SPARC como un gen modulador o inhibidor de la cicatrización de heridas en mamíferos (Bradshaw *et al.*, 2002; Phan *et al.*, 2007). No debemos dejar de lado en este análisis la evidencia experimental propia que, en parte, nos estimuló a trabajar en este modelo. En la transcriptómica de una cicatrización normal (pieles humanas, pieles humanizadas en crecidas en ratones, pieles murinas de dos cepas distintas y cultivos organotípicos humanos) encontramos que SPARC es uno de los 70 genes regulados negativamente luego de las 24 hs de realizada la injuria en la piel (Figura 51).



**Figura 51. Genómica de la cicatrización.** En el esquema se muestra como los distintos modelos biológicos, utilizados en el proyecto del 6<sup>o</sup> Programa Marco de la Unión Europea, señala a SPARC como uno de los genes diferenciales altamente conservados. Específicamente SPARC se encontró disminuído en todos los sistemas biológicos testeados.

## Discusión – Biología de SPARC en *Drosophila melanogaster*

Pero lo más interesante de estos resultados es que a cicatrización de heridas y la generación del estroma en un tumor a su vez comparten ciertos aspectos (Dvorak, 1986). Ambos comienzan con la liberación de proteínas plasmáticas. En ambos casos el fibrinógeno se une a otras moléculas de fibrinógeno y de fibronectina, conformando un estroma previsorio sobre el que migrarán macrófagos, fibroblastos y nuevos capilares. Este gel de fibrina-fibronectina es posteriormente degradado y reemplazado por tejido granular. La principal diferencia existente entre la generación del estroma en tumores y la cicatrización de heridas es que la matriz de fibrina-fibronectina que evoca una respuesta de cicatrización de heridas no es auto-limitante en los tumores. Por el contrario, se da una extravasación continua de fibrinógeno y fibronectina alrededor del tumor, con la consecuente deposición de nueva matriz (Dvorak, 1986).

El análisis de estos procesos sugiere un mecanismo común de acción y la comprensión detallada del proceso podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas. Esta idea ha despertado nuestro interés por esclarecer el efecto de SPARC sobre el proceso de cicatrización de heridas. Para ello, el modelo de cicatrización de heridas en ratones puede ser complementado con ensayos de reconstitución de epidermis *in vitro*, y en forma paralela, con los estudios del cierre dorsal en *Drosophila*. Esperamos que los avances en el conocimiento del proceso de cicatrización proveniente de estos modelos, puedan contribuir al desarrollo de nuevas estrategias que regulen la generación del estroma como medio para limitar el crecimiento tumoral.

# Consideraciones generales de los logros obtenidos

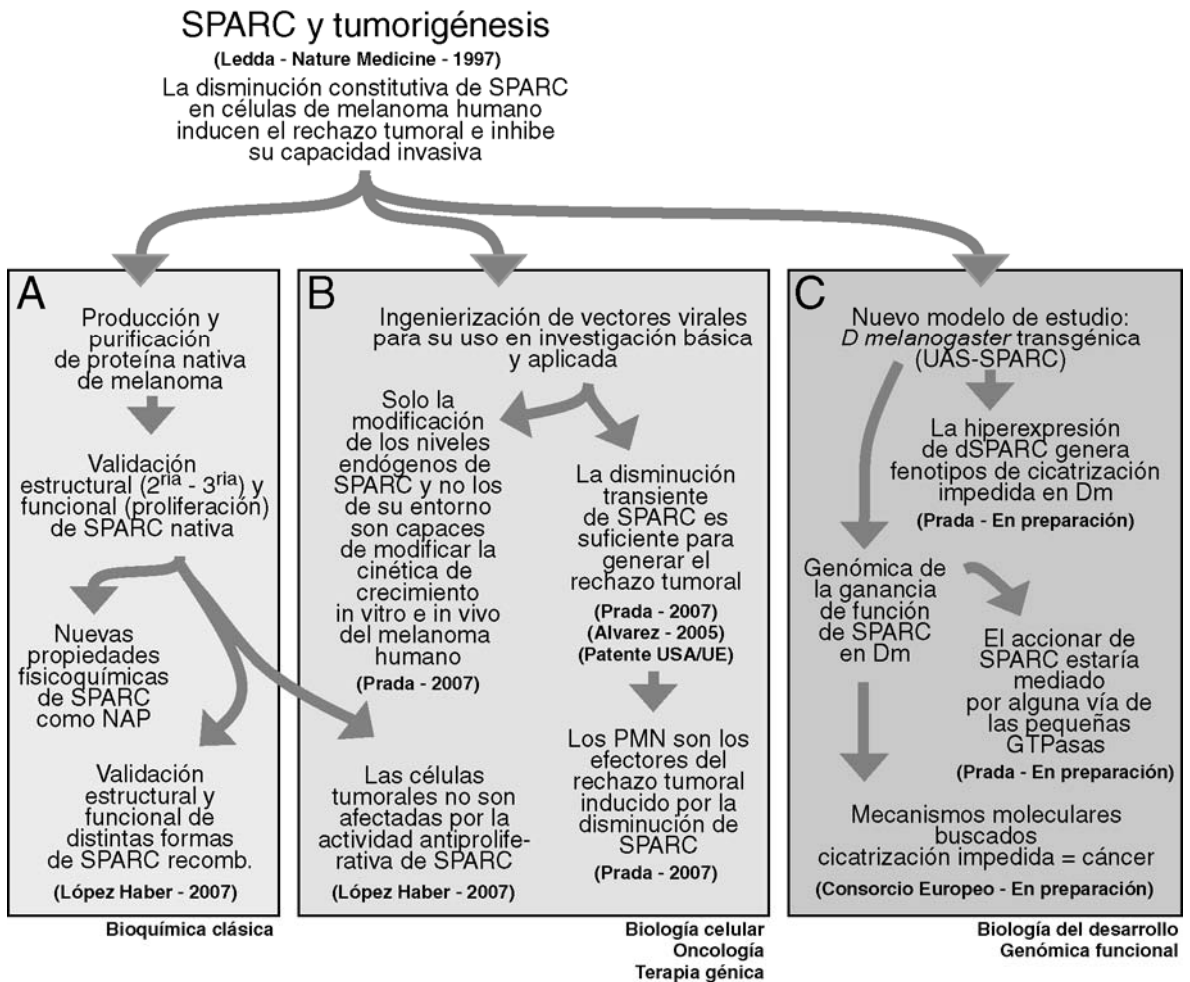
## El camino recorrido con este trabajo de tesis

Las estrategias experimentales llevadas a cabo durante este periodo de tesis son, a nuestros ojos, aristas de un mismo problema: **la comprensión del rol de la proteína SPARC, en el establecimiento y desarrollo del proceso neoplásico**. Este objetivo surgió a partir de los promisorios resultados presentados en un un reporte de nuestro laboratorio hacia fines de la década pasada (Ledda *et al.*, 1997a). A partir de ese momento varias líneas de investigación se generaron y, unos años mas tarde, comenzamos a diseñar las estrategias multidiciplinarias (Bioquímica de proteínas, desarrollo y diferenciación, genómica funcional, terapia génica, oncología y biología celular) que hoy componen esta tesis.

En la figura 45 se encuentran representados los logros más sobresalientes del proyecto global propuesto. En primer lugar, ubicamos los estudios de **bioquímica de proteínas** acoplados a los ensayos de **biología celular** donde nos planteamos estudiar como SPARC afectaba el comportamiento de células tumorales *in vitro* (**Figura 52A**). Los hitos más importantes de esta línea fueron sin duda la purificación de la proteína nativa de melanoma humano y su validación fisicoquímica frente a otras formas recombinantes de SPARC ingenierizadas en nuestro laboratorio. Con estas herramientas demostramos que el agregado exógeno de SPARC no poseía ningún efecto inhibitorio de la proliferación sobre las líneas tumorales testeadas. Paralelamente, comenzamos con los estudios de la **biología tumoral** (oncología) del melanoma humano utilizando el sistema de xenotransplantes en ratones *nude* (**Figura 52B**). Utilizando como herramienta molecular de expresión los primeros vectores adenovirales costruidos en el país, encontramos que solo la modificación de los niveles de expresión de SPARC en las células neoplásica, y no en su estroma circundante, era capaz de alterar la cinética de crecimiento tumoral. Además, con estas mismas herramientas demostramos que la disminución transiente de SPARC era capaz de inducir el rechazo tumoral, abriendo la puerta hacia una posible terapia génica antitumoral. En ese mismo contexto determinamos que los PMN son los efectores del rechazo de las células de melanoma, demostrando que el sistema inmune innato también es capaz de ese tipo de respuesta. Por último, y tal vez el desafío más importante en el contexto del conocimiento teórico y experiencia de nuestro laboratorio, fue el uso de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico (**biología del desarrollo**). Mediante la construcción de una mosca transgénica

## Discusión - Consideraciones generales y logros obtenidos

encontramos que la hiperexpresión de SPARC generaba fenotipos de cicatrización impedida, corroborando nuestra hipótesis de que SPARC se encuentra regulada negativa en los procesos de cicatrización. Y con el mismo modelo, pero utilizando la **genómica funcional** como herramienta encontramos una serie de candidatos para las vías de señalización involucradas en el accionar de SPARC.



**Figura 52. Esquema de los aportes y logros presentados en el trabajo de tesis.** A modo de diagrama de flujo se muestran las estrategias llevadas a cabo para la búsqueda de objetivos planteados en esta tesis. El esquema está dividido de acuerdo a la disciplina biológica encarada dentro de cada estrategia. Los trabajos publicados o en escritura derivados de cada línea de investigación fueron incluidos en el diagrama junto al hito más relacionado. NAP: familia de proteínas naturalmente desplegadas.

# Conclusión general

Como corolario del primer capítulo del presente trabajo de tesis podemos concluir que sólo los niveles endógenos de SPARC, producidos directamente por las células de melanoma, afectan el crecimiento tumoral mientras que las mismas células se muestran inalteradas por la influencia de SPARC externa como hemos visto tanto en los experimentos *in vivo* como *in vitro*. Si bien el rol preciso del estroma en el crecimiento del melanoma permanece sin resolverse, especulamos que sólo sería crucial en ciertos estadios del desarrollo del melanoma. No obstante, también concluimos que cambios en los niveles de SPARC *in vivo* son suficientes para generar importantes modificaciones en el microambiente estromal asociado al tumor. Vimos que el aumento de la proteína en las células de melanoma es capaz de inducir reclutamiento de fibroblastos, neovascularización y cambios en la secreción de matriz extracelular; por otro lado la disminución de SPARC es suficiente para inducir un potente reclutamiento de PMN que lidera el rechazo tumoral, al menos en el modelo de ratones *nude*.

Por su parte, el segundo capítulo de esta tesis valida la hipótesis que sugería que la glicoproteína dSPARC podría ser parte molecular de ciertos eventos morfogénicos del embrión y el adulto de *Drosophila*. Concretamente hemos observado que la alteración de los niveles endógenos de esta proteína (principalmente la hiperexpresión) produce fenotipos de penetrancia variable en diversos movimientos del desarrollo relacionados con la migración, el cambio de forma y la adhesión celular. El análisis ulterior del transcriptoma de la ganancia de función de dSPARC mostró que dicha proteína no comparte ciertas vías clásicas de señalización como la vía de JNK y, además, identificó a Rab35 (un miembro de la familia de las pequeñas GTPasas de membrana) como un fuerte candidato para transducir la señal de SPARC dentro de la célula.

Considero que este trabajo de tesis ha dilucidado varios aspectos de la biología molecular de SPARC, especialmente en relación a su papel en tumorigénesis. Asimismo, ha abierto nuevos interrogantes sobre la complejidad de la función de esta proteína, de singular importancia en la biología tumoral.

# Materiales y métodos

## Materiales y reactivos

### Descripción general de los materiales utilizados

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

## Técnicas de cultivo celular eucariota y ensayos funcionales

### Líneas celulares de mamífero y sus medios de cultivo

Las líneas celulares derivadas de melanomas humanos, A375N (gentilmente cedidas por el laboratorio de la Doctora Estela Medrano) e IIB-Mel-J (generadas con anterioridad en el Instituto Leloir), fueron crecidas en Medio Melanoma (Mel) y medio Mel-J respectivamente. Cada litro de Mel está compuesto por: DMEM/F12, 3.6 g de HEPES, 1.2 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mg insulina, 17.6 g ácido ascórbico y 0.3 g de galactosa. Un litro de Mel-J se compone de Mel suplementado con 5 ug de EGF, 500 ug de transferrina y 0.92 g adicionales de  $\text{NaHCO}_3$ . Tanto las células HeLa (carcinoma de cuello de útero humano

## Materiales y Métodos

obtenidas de ATCC) como los fibroblastos humanos (WI-38 y WI-38 VA ambos obtenidos de ATCC) fueron crecidas en DMEM sin suplementos especiales. En el caso de las células HEK293 (células embrionarias de epitelio de riñón humano) se utilizó DMEM alta glucosa. Todos los medios completos se suplementaron con 10 % v/v de suero bovino fetal (SBF) (Natocor, Córdoba, Argentina) y antibióticos (penicilina: 2.5 unidades/ml y estreptomycin: 2.5 mg/ml). Todos los cultivos fueron mantenidos a 37 °C, en atmósfera saturada de agua y 5 % CO<sub>2</sub>.

### Medios condicionados

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

### Ensayo de proliferación *in vitro*

La proliferación de células *in vitro* crecidas sobre plástico se realizó mediante el método colorimétrico del MTT. Brevemente, 3.10<sup>3</sup> células por pocillo fueron sembradas en policubetas de 96 pocillos en un volumen final de 100 ul del medio de cultivo adecuado. Al momento del análisis 10 ul de 5 mg/ml de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol 1-3-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, MO, USA) fueron agregados a cada pocillo de la placa. Luego de dos horas de incubación, el colorante precipitado dentro de la célula viva, producto de las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria, fue solubilizado con isopropanol ácido siguiendo el protocolo de Denizot (Denizot and Lang, 1986). La DO de la solución de cada pocillo fue leída a 570 nm. Cada experimento fue acompañado de una curva de calibración confeccionada con las mismas células del ensayo pero en concentración final conocida.

### Formación de esferoides en tres dimensiones

Brevemente, policubetas de 96 pocillos fueron cubiertas con 75 ul de agarosa 1 % en PBS. Las líneas tumorales y/o los fibroblastos normales utilizados fueron obtenidos a

## Materiales y Métodos

partir de una monocapa subconfluente mediante tratamiento con tripsina. Dichas células fueron sembradas en forma homotípica o heterotípica sobre la agarosa; a razón de  $1.10^4$  células/pocillo en un volumen final de 150 ul del medio completo correspondiente a la línea utilizada. Para el caso de los esferoides heterotípicos se co-plaquearon  $5.10^3$  células de melanoma con igual cantidad de fibroblastos en DMEM 10 % de SBF. El número de células plaqueadas y las condiciones de crecimiento se pusieron a punto de manera tal de evitar la formación de un núcleo necrótico a tiempos cortos. Cada tres días el 50 % del medio de los esferoides fue cuidadosamente removido y reemplazado con medio fresco de manera de no interrumpir su crecimiento por ausencia de factores esenciales. El tamaño de los esferoides fue medido cada dos o tres días utilizando un microscopio invertido con un ocular 10x graduado a 0.01 mm. Finalmente, el volumen de los esferoides fue determinado mediante la ecuación

$$V=(L \times W^2) \times 0.5 \quad L: \text{largo del esferoide} \quad W: \text{ancho del esferoide}$$

### Ensayo de migración de esferoides

Se generaron esferoides siguiendo el protocolo de formación anteriormente descrito. Las células de melanoma humano utilizadas fueron transfectadas establemente con un plásmido de expresión constitutiva de eGFP (pcDNA3-eGFP). A los 5 días las esferas celulares ya constituidas se recogieron delicadamente del pocillo en el que fueron formadas y se re-plaquearon sobre plástico en una policubeta de 96 pocillos en presencia de SBF. El frente de migración o de vanguardia fue reportado fotográficamente a las 72 y 120 hs post-plaqueo de los esferoides. Las distancias de migración recorrida por las células A375N (con sus distintos tratamientos) fueron calculadas utilizando las áreas y perímetros digitales generados mediante el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). El algoritmo utilizado fue el siguiente:

$$\Delta R = (A1/\pi)^{1/2} - (A2/\pi)^{1/2} \quad A1: \text{radio de migración} \quad A2: \text{radio del esferoide}$$

### Ensayo clonogénico bajo agar

Para la realización del ensayo clonogénico se utilizó la técnica por Hamburger y Salmon (Hamburger and Salmon, 1977). Dicha técnica se evalúa la capacidad de las células de crecer en forma independiente de anclaje mediante la utilización de una doble capa de agar (la inferior al 0.5 % y la superior al 0.3 % conteniendo las células). Brevemente, se agregó un volumen de 1 ml mezclando partes iguales de medio de cultivo Mel 2X y

## Materiales y Métodos

agarosa al 1 % en PBS dentro de los pocillos (se utilizaron policubetas de 6 pocillos). Una vez solidificada la capa inferior se agregó la capa superior, mezclando un tercio de agarosa 1 % en PBS (a 45 °C) un tercio de medio Mel 2X y un tercio de medio de cultivo conteniendo  $10^5$  células (volumen final 2 ml). Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y durante 2 semanas. Se contaron las colonias conteniendo más de 40 células en un microscopio invertido de contraste de fase (Carl Zeiss, Axiovert 40).

## Purificación de SPARC nativa de melanoma humano

### Condicionamiento de medio a gran escala y purificación de SPARC

Como fuente de SPARC nativa de melanoma humano se condicionó medio libre de suero de las células A375N crecidas a un 80 % de confluencia durante 48 hs. Luego de centrifugar el medio para retirar las células muertas y los detritos le agregó 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, y 0.01 % de azida sódica antes de continuar con el procesamiento. Para la purificación de proteína a partir de un litro de medio condicionado, se concentró 20 veces mediante un sistema comercial (Amicon Ultrafiltration Cell Model N202) que utiliza una membrana de 10 000 kD como límite inferior de retención (YM10; Millipore, Billerica, MA). El concentrado fue dializado en 20 mM Tris-HCl (pH: 7.8). Posteriormente la muestra fue corrida en una columna HiTrap Q de intercambio iónico (GE Healthcare, NJ, USA). La proteína retenida fue eluida mediante un gradiente continuo de 100 mM a 500 mM de NaCl (la elución de SPARC se produce a los 325 mM). La fracciones colectadas con un grado de pureza cercano al 80 % fueron pooleadas y dializadas. Seguidamente, las muestras se corrieron en un tamiz molecular (Superdex 200, GE Healthcare, NJ, USA) para terminar obteniendo un grado de pureza cercano al 95 % verificado mediante SDS-PAGE (ver **Figura 1**). El rendimiento final alcanzado fue cercano al miligramo de proteína nativa por litro de medio condicionado. La concentración de proteína fue determinada por absorbancia a 280 nm, asignando una absorptividad molar a 280 nm de  $0.875 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Por último la proteína purificada fue dializada contra PBS y concentrada en sistemas Centricon 10 (Millipore, Billerica, MA, USA) hasta obtener una concentración de aproximadamente 1 mg/ml de SPARC humana. La solución final se filtró por 0.22  $\mu\text{m}$ , se alicuotó en volúmenes pequeños y se congeló a -80 °C hasta su utilización. Las preparaciones de SPARC nativa fueron rutinariamente testeadas para la presencia de

## Materiales y Métodos

endotoxina bacteriana utilizando el ensayo del lisado de *Limulus* amebocyte (Sigma Co, St. Louis, MO, USA). En ninguna de las preparaciones se detectaron niveles de endotoxina.

### Microsecuenciación del extremo N-terminal de la proteína nativa

La secuenciación del extremo N-terminal de SPARC nativa se llevó a cabo por el método de Edman (Edman, 1960) en la Protein Structure Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA.

### Identificación de SPARC nativa por huella peptídica utilizando espectrometría de masa MALDI-TOF

La huella peptídica de SPARC fue obtenida a partir de la proteína aislada en un SDS-PAGE, y realizada gentilmente por el Dr. Carlos Cerveñansky del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, utilizando un MALDI-TOF Voyager DE PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La identificación de la huella peptídica se llevó a cabo utilizando el programa ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>)

## Técnicas de bioquímica y biología molecular

### Dicroísmo circular

Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (CD) de la región UV lejana (260 nm a 190 nm), utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810. Se promediaron 10 escaneos para cada punto de medición, tomados a  $25.0 \pm 0.1$  °C. La proteína SPARC en concentración 5 uM fue dializada contra 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), en presencia de 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Para estudios de desnaturalización por secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$ , se incubó a la proteína con 2 mM EDTA en lugar de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para las curvas de desnaturalización térmica, se monitorearon los cambios de elipticidad a 220 nm en un intervalo de 20 a 80 °C.

### Espectroscopia de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se tomaron a 25 °C en un espectrofluorímetro Aminco-Bowman Series 2 con control externo de temperatura, utilizando una cubeta de longitud de paso de 1 cm. SPARC se diluyó a 1 uM en 10 mM Tris-HCl (pH 7.8). La excitación se

## Materiales y Métodos

llevó a cabo a 280 nm (ancho de banda 8 nm) y la emisión de fluorescencia fue monitoreada entre 300 y 400 nm (ancho de banda 8 nm).

### Cuantificación de proteínas totales en medios condicionados

Para estandarizar la carga proteica de Western blots se cuantificaron proteínas totales de medios condicionados mediante el kit fluorimétrico de alta sensibilidad NanoOrange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó el reactivo NanoOrange en una dilución apropiada junto con una alícuota de 100  $\mu$ l del medio condicionado puro y otra de medio diluido a la mitad con agua destilada, por 10 min a 96 °C. Luego de 20 min del enfriamiento, se midió la fluorescencia en un fluorímetro de placa GENius (Tecan Instruments, Salzburg, Austria), utilizando como longitud de onda de excitación 485 nm y de emisión 590 nm. La concentración se determinó por comparación con una curva estándar construida con BSA entre 10 ng/ml y 10  $\mu$ g/ml.

### Producción del anticuerpo monoclonal anti-SPARC

Los anticuerpos monoclonales que reconocen a SPARC humana fueron obtenidos por el Dr. Mariano Alvarez de nuestro laboratorio mediante inmunización intraesplénica en ratones BALB/c con 200  $\mu$ g de SPARC recombinante de E coli en 50  $\mu$ l de PBS (Prada *et al.*, 2007; Wayne M. Yokoyama, 2006). Los clones positivos fueron en su totalidad isotipos IgM $\kappa$  e IgM $\lambda$ , determinados mediante IsoStrip (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA).

El clon 7A5 (productor de la IgM $\kappa$  anti-SPARC) fue el seleccionado para la purificación de los anticuepos necesarios para los Western blot de esta tesis. La purificación se realizó a partir de fluido ascítico utilizando una columna Sephacryl S-400 (GE Healthhcare, Uppsala, Sweden).

### Geles de poliacrilamida y Western blotting

La presencia de SPARC en geles de poliacrilamida fue analizada en:

- (a) medios condicionados de las líneas transducidas con los vectores adenovirales,
- (b) fracciones provenientes de las distintas columnas utilizadas para la purificación de SPARC nativa o recombinante y
- (c) extractos de embriones de *Drosophila melanogaster* para detectar la presencia de dSPARC endógena.

## Materiales y Métodos

Tanto las proteínas totales pertenecientes a los medios condicionados, como las fracciones provenientes de las columnas de purificación de SPARC nativa se mezclaron directamente (sin precipitación o dilución previa) con buffer muestra 6x (10 % v/v glicerol, 62.5 mM TrisHCL (pH 6.8), 2 % w/v SDS, 0.01 mg/mL ABF) conteniendo 400 mM de DTT como agente reductor (Sambrook *et al.*, 1989).

De cada muestra se sembraron 25 ul en geles de SDS-PAGE al 10-12 % según el caso, y se corrió la electroforesis a 120 V hasta la caída del frente de ABF. Los geles resultantes se tiñieron con coloración de Azul Coomasie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Londres, UK) para su posterior procesamiento por Western blot (Sambrook *et al.*, 1989).

Luego de trasferir los geles, se bloquearon las membranas con 3 % w/v de leche descremada en PBS por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente, las membranas bloqueadas se incubaron durante 16 hs a 4 °C en agitador con el anticuerpo monoclonal 7A5 (dilución 1/5 del medio condicionado de hibridoma en PBS, 0.05 % Tween-20) o el antisuero de conejo (dilución 1/2000 en PBS, 0.05 % Tween-20). Luego de lavar las membranas en PBS, Tween 0.05 % se realizó por 2 hs a temperatura ambiente la incubación del anticuerpo secundario de cabra anti-Igs de ratón acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) o un anticuerpo secundario de cabra anti Igs de conejo (Jackson immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA), ambos en las diluciones recomendadas por el laboratorio comercial. Las bandas reactivas se detectaron mediante la utilización de un sustrato quimioluminiscente de la HRP siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

## Northern Blot

El ARN total de las líneas celulares analizadas y de los embriones de *Drosophila* fueron extraídos utilizando el Tri Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) siguiendo un protocolo estándar (Chomczynski and Sacchi, 1987). Alícuotas de 15 ug de ARN total se sometieron a electroforesis en geles de 1 % (w/v) agarosa, 18 % (v/v) formaldehído, 1X MOPS y se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Hybond-N+, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), por incubación durante toda la noche en condiciones de capilaridad ascendente, utilizando como buffer de transferencia el 20X SSC (175.3 g NaCl y 88.22 g de Citrato de Sodio por litro de preparación (pH 7)). Seguidamente se prehibridizó la membrana por 2 hs a 65 °C en 1 % (w/v) BSA, 0.5M buffer fosfato (pH 7.4), 1mM EDTA, 7 % (w/v) SDS, y luego se realizó la hibridización a 65 °C con una sonda para el ADNc de SPARC (humano o de *Drosophila* dependiendo del experimento) marcado

## Materiales y Métodos

con ( $^{32}\text{P}$ ) $\alpha$ -dCTP por extensión de primers al azar (Sambrook *et al.*, 1989). En los casos necesarios, la membrana fue rehibridizada con una sonda para el gen *housekeeping* 36B4 marcada de similar manera. Los niveles de expresión de SPARC fueron cuantificados por densitometría de las bandas y normalizado contra la intensidad de bandas correspondiente al 36B4.

### Ensayo de protección de ARNasa (RPA)

Monocapas de células subconfluentes fueron transducidas con los distintos vectores adenovirales. Luego de 24 hs el ARN total fue extraído siguiendo el protocolo del Tri Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido de una extracción con cloroformo–isoamílico y posterior precipitación con isopropanol. Para la marcación de la sonda se utilizó como molde el plásmido pBlueScript donde se encontraba clonado el ADNc de SPARC. Luego de linealizar el plásmido en la región 3' del ADNc se sintetizó la sonda sentido con la ARN polimerasa T7, la cual se utilizó para el reconocimiento de la molécula de ARN antisentido producida por el vector. La marcación se realizó utilizando ( $^{32}\text{P}$ ) $\alpha$ -dUTP (3000 Ci/mmol; 10 uCi/ul; Pharmigen). Veinte microgramos de ARN total (de las células tratadas con los distintos vectores) se hibridizaron con la sonda fue durante 18 hs. Luego de la digestión específica del ARN de simple cadena, las muestras se trataron con proteinasa K–SDS, se realizó una extracción con fenol-cloroformo, y se precipitaron en presencia de acetato de amonio. Los fragmentos de ARN protegidos por la sonda se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida 4.75 % w/v. Los geles secos se expusieron durante 2 hs en las placas intensificadoras del Storm 820 PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Se cuantificó la señal mediante el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

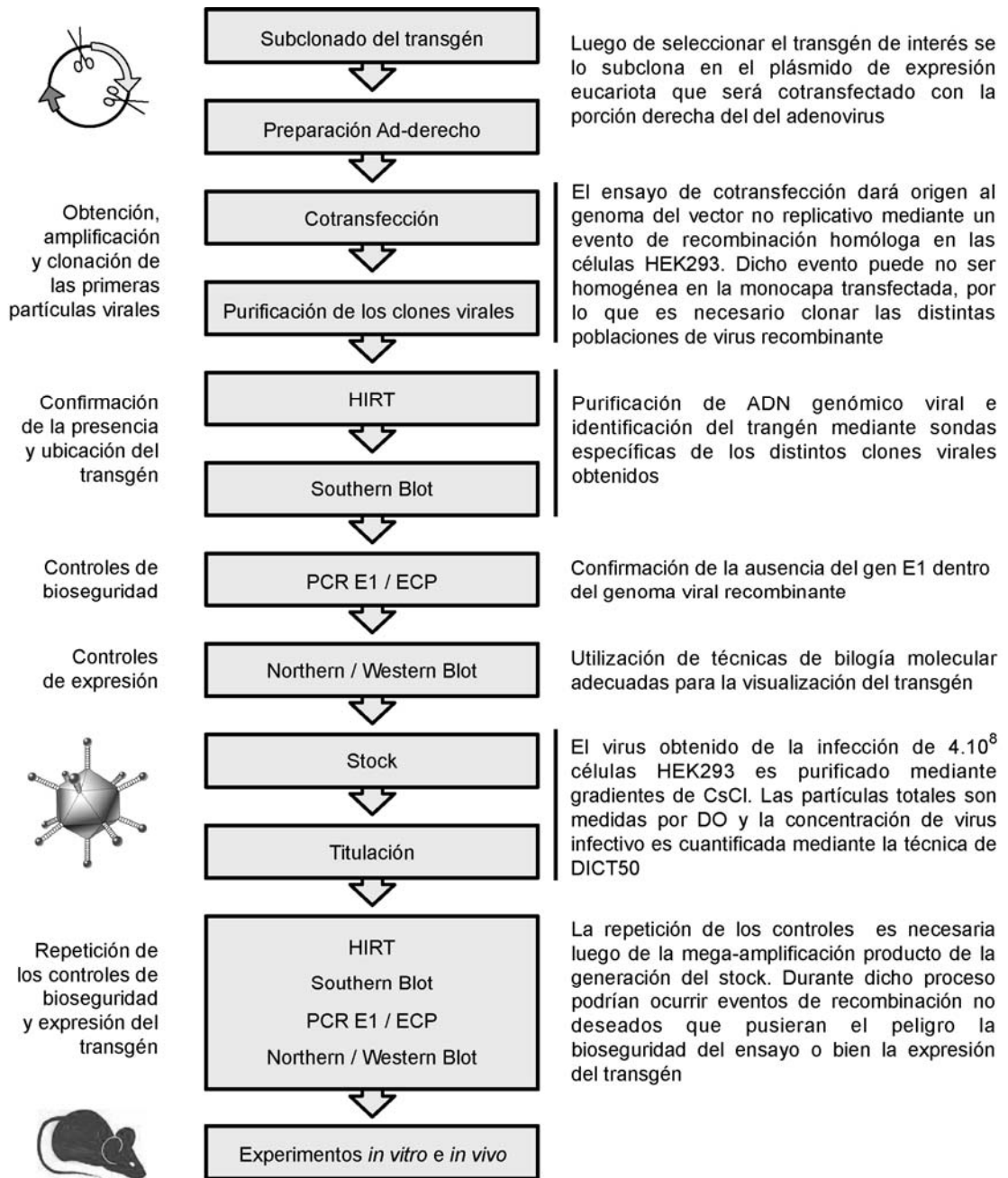
## Ingeniería genética para la generación de vectores

### Desarrollo de adenovectores: Consideraciones generales

El desarrollo de los vectores adenovirales comprende una larga serie de pasos metodológicos descritos en la figura 46. Esta secuencia de ensayos y controles es considerada crucial para alcanzar los niveles de calidad y seguridad biológica requeridos al momento de fabricar un stock adenoviral en un laboratorio de investigación (Figura 53). El protocolo utilizado fue desarrollado y puesto a punto dentro de nuestro

## Materiales y Métodos

laboratorio, no obstante sigue los lineamientos generales propuestos por Revah y colaboradores (Revah *et al.*, 1996).



**Figura 53. Pasos para la construcción de los adenovectores.** En el esquema se muestran tanto los pasos de ingeniería como los controles de calidad y bioseguridad necesarios. ECP: ensayo de efecto citopático; HIRT: purificación de ADN viral.

## Subclonado de SPARC en su orientación sentido y antisentido

Aproximadamente 30 ug del plásmido pADPSY se linealizaron con 50 U de la enzima Sall durante 2.5 h a 37 °C y, posteriormente, fue purificado con columnas Qiaquick (QIAGEN,

## Materiales y Métodos

Valencia, CA, USA). Los extremos cohesivos fueron rellenados con el fragmento mayor de la polimerasa Klenow (para los casos de los ADNc sentido y antisentido de SPARC no fue necesario). Dicha reacción se llevó a cabo durante 15 min a 30 °C y fue detenida con 5 ul de EDTA 0.5 M a 75 °C durante 10 min. Luego se realizó una extracción con fenol-cloroformo y se lo precipitó con 2.5 volúmenes de etanol 100 %. El pellet se resuspendió en 25 ul de buffer de la fosfatasa alcalina (CIAP).

La fosfatasa fue agregada y la mezcla fue incubada a 50 °C durante 1 h. Al finalizar la reacción se purificó el plásmido con fenol-cloroformo-isoamílico (50:24:1), se realizó una nueva precipitación con etanol y se resuspendió con 10 ul de buffer Tris-Cl 10 mM (pH 7.4) (Sambrook *et al.*, 1989).

### Restricción con Sal I

30 ug de pADPSY  
12 ul Sal I (50 U)  
24 ul buffer 10x  
Agua dd, csp 240 ul

### Rellenado con Klenow

20 ug pADPSY-Sal I  
10 mM dNTP  
25 ul buffer 10x  
25 ul Klenow  
Agua dd, csp 250  
(sólo para el caso de bgal)

### Desfosforilación con CIAP

20ug pADPSY-Sal I-Klenow  
20 ul buffer 5x  
2.5 ul CIAP (22 U/ul)  
Agua dd, csp 100 ul

Este plásmido modificado se convirtió en el vector aceptor de los insertos de interés para esta tesis: la secuencia del ADNc de SPARC humana en su orientación sentido y antisentido (Podhajcer *et al.*, 1996). Ambas construcciones fueron preparadas a partir del ADNc de largo completo clonado originalmente en el plásmido pBlueScript (pBS-SK+).

El fragmento de 1.7 kb fue liberado con la enzima de restricción Sal I y clonado en el vector de transporte anteriormente descrito (pADPSY). Mediante un mapeo de restricción se determinó que clones poseían la orientación sentido y antisentido del ADNc. Las construcciones terminadas fueron finalmente linealizadas con la enzima de restricción FspI, purificadas en geles de agarosa y almacenadas a -20 °C hasta el ensayo de cotransfección.

## Purificación del brazo derecho del adenovector

Como veremos más adelante el ADN viral puede ser purificado de manera eficiente mediante la técnica de HIRT. El genoma del virus, en nuestro caso del adenovector portador del transgén bacteriano  $\beta$ -galactosidasa, fue utilizado como fuente para la obtención de la porción derecha o “brazo derecho” del futuro vector. Esta región corresponde al fragmento 2.6-100 u.m. (unidades Morgan) del adenovirus tipo 5 que posee la región del gen E3 deletcionada (Lieber *et al.*, 1996). Aproximadamente 120 ug de ADN viral fueron cortados con 150 U de la enzima de restricción ClaI durante 3 hs a 37

## Materiales y Métodos

°C. En ese punto se agregó 1 U/ug más de enzima. Al cabo de 1 h, se controló la digestión corriendo una alícuota en un gel de agarosa 0.7 %, en buffer TBE. Corriendo el gel a bajo voltaje se logró una buena resolución de los fragmentos grandes de ADN, aproximadamente entre 23 y 25 kpb, correspondientes al brazo derecho del genoma. Dependiendo de las condiciones de corrida es posible visualizar algunas bandas pequeñas (1-5 kpb) que pertenecen a la porción izquierda del genoma. En el momento que se determinó detener la restricción, la enzima se inactivó 10 min a 75 °C y se procedió a purificar el fragmento de mayor peso.

Con el volumen total de la restricción se sembraron varios pocillos en un gel de agarosa 0.7 %. La electroforesis fue realizada durante toda la noche a 0.5 V/cm de gel en buffer TAE con bromuro de etidio. Al día siguiente se visualizaron las bandas de 25 kpb con el trasiluminador en su mínima potencia, evitando un posible daño ácido nucleico. La purificación del ADN del gel se realizó mediante el kit Qiaex II (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación de la concentración final se realizó midiendo absorbancia (260-280 nm) en el espectrofotómetro y, paralelamente, se sembró una alícuota en un gel de agarosa para confirmar la calidad del fragmento purificado. Finalmente, el brazo derecho purificado del adenovector fue guardado a -20 °C hasta su utilización en el ensayo de cotransfección.

## Ensayo de co-transfección en HEK 293

Para la co-transfección del plásmido portador del transgén y la porción derecha del adenovector se utilizaron las células 293. Dichas células fueron crecidas en placas de 60 mm (p60) hasta alcanzar una confluencia del 70 %. De 3 a 5 hs previo a la transfección se realizó un cambio de medio utilizando sólo el volumen necesario para cubrir la monocapa. Posteriormente se prepararon las siguientes soluciones de transfección:

Tubo 1	Tubo 2
2 ug de fragmento viral	10 ul CaCl <sub>2</sub> 2 M
3 ug de plásmido linealizado	100 ul BBS 2x
agua dd, csp 90 ul	

El BBS se retiró de la heladera 2 hs antes del ensayo y se lo mantuvo a temperatura ambiente. El CaCl<sub>2</sub> y el BBS 2x se agregaron gota a gota por las paredes del tubo 1 al mismo tiempo que se lo agitaba con un vortex a velocidad media. Esta preparación fue agregada a las células, para luego incubarlas durante toda la noche en estufa. Como control se realizaron transfecciones sólo con la porción derecha del vector con el fin de verificar la ausencia de genomas sin digerir. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y

## Materiales y Métodos

se agregaron 3 ml de medio fresco con 5 % de SBF. El cambio de medio se realizó cada tres días, controlando diariamente la aparición de efecto citopático. Como promedio, entre 8 y 10 días después de la cotransfección se observaron las placas o zonas donde las células estaban redondeadas, producto de la replicación viral. En ese momento se cosechó la monocapa y se procedió a la primera amplificación. Luego de tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido, los restos celulares fueron centrifugados por 5 min a 4000 rpm. El sobrenadante, aproximadamente 3 ml, se alicuotó en tres tubos. Dos de ellos se destinaron a stock de reserva -70 °C y el restante se utilizó para amplificar el vector obtenido. El primer paso de amplificación se realizó infectando una monocapa de células 293 en policubetas de 24 pocillos. Al observar efecto citopático, se repitió el procedimiento en una p60 y luego en una p100. De esta manera cada vector obtenido de la cotransfección contaba con una amplificación cruda destinada, en principio, a la purificación de clones.

### Purificación de clones virales bajo agar

Dado que la cotransfección de una monocapa de células 293 permite la generación de más de un evento de recombinación, lo que generalmente termina obteniendo el operador es un conjunto de clones que posiblemente conformen una población heterogénea de virus. Por lo tanto es necesario aislar dichas poblaciones para continuar con los controles de calidad del futuro stock. El método más utilizado para aislar clones virales es el ensayo de purificación bajo agar. Para dicho ensayo se sembraron células 293 en policubetas de 6 y se las dejó crecer hasta llegar a confluencia. Luego se realizaron transducciones con diluciones seriadas al 1/10 del sobrenadante (hasta llegar a  $1.10^{-10}$ ) obtenido de la última p100. Las diluciones se realizaron en un volumen final de 750  $\mu$ l por pocillo. Luego de 2 hs se retiró el medio de infección y se agregaron lentamente 2 ml del medio con agar (0.2 % final). Cada tres o cuatro días se le incorporó a cada pocillo una nueva capa de 1 ml de medio con agarosa. Entre los 8 y 12 días se comenzó a observar la aparición de pequeñas placas de lisis producto del efecto citopático. Los clones colectados con pipeta pasteur fueron sometidos a un ciclo de congelación y descongelación y, posteriormente, se utilizaron para infectar nuevas monocapas de células 293 en pocillos de policubetas de 96. Los siguientes pasos de amplificación se realizaron de la misma forma utilizada para amplificar los vectores producto de la cotransfección.

## Materiales y Métodos

### Obtención de ADN viral (HIRT)

Para evaluar la presencia del transgén y su correcta ubicación dentro del genoma del vector deseado es necesario, en una primer instancia, purificar el ADN viral siguiendo el protocolo de HIRT (Hirt, 1967). Para tal fin se infectó una monocapa de células 293, crecidas en una p60, y se cosechan al momento de la aparición del efecto citopático. Se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 2 ml de PBS. A 0.4 ml de esta suspensión se le agregó 1.5 % (w/v) SDS, 25 mM EDTA y 0.25 mg/ml de proteinasa K. Se invirtió suavemente el tubo varias veces con el fin de lograr una lisis efectiva sin romper el ADN genómico de la célula. Y se incubó durante 2 horas a 55 °C para inactivar completamente el virus. Posteriormente se agregó 5 M NaCl, para precipitar diferencialmente el ADN celular. La muestra se incubó a -20 °C durante 30 minutos y se centrifugó a 4 °C y 13000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó una solución de fenol/cloroformo para extraer proteínas. Es recomendable evitar el uso de vortex para no fragmentar ADN viral. Luego de centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm, se rescató la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio, y se agregó 1 ml de etanol al 100 %, para precipitar el ADN viral. Luego de incubar 1 h a -20 °C se centrifugó por 30 minutos a máxima velocidad en frío. Se lavó el pellet con etanol al 70 % y se dejó secar al aire para finalmente resuspenderlo en 50 ul de agua MilliQ.

### Digestión del ADN viral

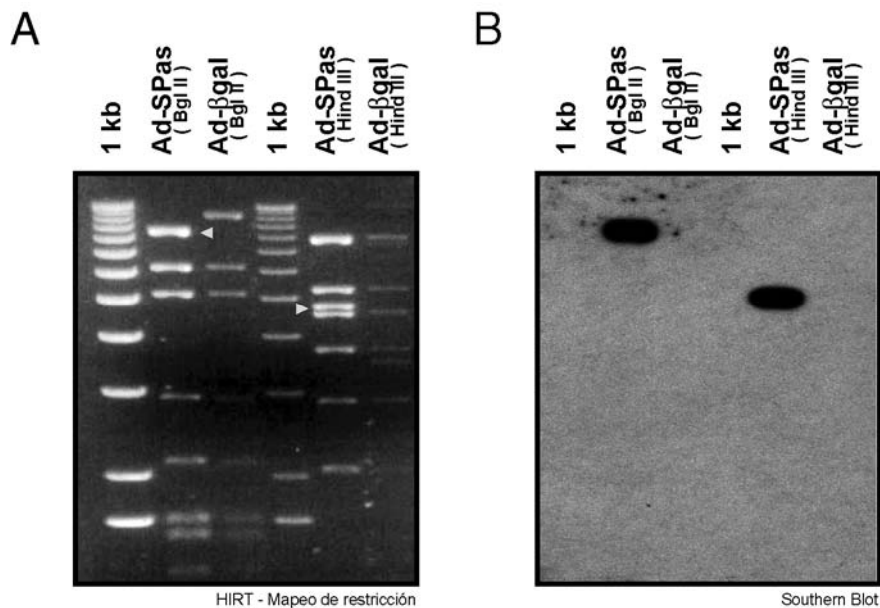
Habitualmente la digestión se realiza con 1/10 del volumen obtenido de la preparación del HIRT. Las enzimas utilizadas, Bgl II y Hind III, generan un patrón de bandas de buena resolución y fácil reconocimiento. La restricción se realizó durante no más de 15 minutos a 37 °C y se corrió en un gel al 1 % de agarosa (buffer TAE 1X con bromuro de etidio) durante toda la noche a 30 V (aproximadamente 0.5 volts/cm de gel) en cámara fría a 4 °C (**Figura 54A**). Posteriormente, luego de obtener una imagen digital del patrón de restricción, el gel se transfirió a una membrana de nylon con el fin de confirmar la presencia del transgén en las bandas diferenciales mediante un Southern blot (**Figura 54B**).

### Southern Blot para el transgén

Previo a la transferencia, el gel se colocó en 0.25 M HCl durante 30 min en agitación para hidrolizar la muestra en fragmentos pequeños. Luego se lavó con agua Milli Q y se equilibró durante 20 min en 0.4 M NaOH. La transferencia se realizó durante dos horas. Se marcaron los pocillos y se hizo un corte para identificar la orientación de la

## Materiales y Métodos

membrana. Luego de lavar con SSC 2X por 5 min la membrana se colocó sobre un Whatman 3MM y se la sometió a 125 mJ de luz ultra violeta para unir el ADN al nylon de la membrana (programa C-L, BioRad Crosslinker, USA).



**Figura 54. Southern blot para la detección del transgén en el genoma viral. (A)** El producto de la digestión enzimática (Bgl II o Hind III) se corre en un gel para su visualización. Se muestra como ejemplo la purificación y restricción del genoma del vector Ad-SPas y su control Ad-βGal. Las flechas blancas muestran las bandas diferenciales respecto del control. **(B)** Luego de la transferencia, la ubicación del transgén es detectada mediante una sonda específica. Las bandas diferenciales producto del mapeo de restricción son las que dan positivas en la hibridación. En este caso se utilizó el ADNc completo de SPARC.

Para la marcación de las sondas con fluoresceína (Gene Images Random Prime Labelling Module, Amersham, Piscataway, NJ, USA) se utilizaron 50 ng del ADNc de SPARC escindido del plásmido pBluescript, los cuales fueron incubados a 90 °C por 5 min y colocados en hielo rápidamente para evitar la renaturalización. Siguiendo el protocolo del kit no radiactivo (Gene Images CDP-Star Detection Module, Amersham, NY, USA) se mezclaron 10 ul de Mix (buffer Klenow y dNTPs marcados); 5 ul de primers al azar; 1 ul de Klenow y agua destilada csp 50 ul. La mezcla se incubó a 37 °C por 1 h para obtener finalmente unos 5 ug/ul de sonda marcada. Utilizando la solución de prehibridización provista por el kit (se utilizaron aproximadamente 100 ul/cm<sup>2</sup> de Nylon) la membrana fue incubada a 60 °C durante 30 min en agitación continua. La sonda se desnaturalizó a 90 °C durante 5 min en un volumen final de 20 ul, diluyendo con agua. La sonda se agregó a la solución de hibridación (concentración final de sonda: 10 ng/ml) y se incubó en agitación circular durante toda la noche a 60 °C. Los primeros lavados se realizaron en SSC 1x y 1 % w/v SDS durante 15 min a temperatura ambiente.

## Materiales y Métodos

Aumentando las condiciones de astringencia los lavados subsiguientes se realizaron en SSC 0.1x y 0.1 % SDS durante 1 h a 60 °C manteniendo continuamente la agitación.

Para el revelado, se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente con 10 ml de una dilución al 1/10 de liquid block en buffer A (provisto por el kit) Inmediatamente antes de usar se diluyó el conjugado antiluoresceína–fosfatasa alcalina 1/5000 en buffer A preparado con 0.5 % BSA. Luego de incubar la membrana en 3 ml de dicha solución, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación, se hicieron 3 lavados de 10 min con un volumen de 100 ml de buffer A 0.3 % Tween 20 a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se la colocó sobre film plástico transparente. En forma aséptica se tomó una alícuota de reactivo de detección (30 a 40 ul por cm<sup>2</sup> de membrana) y se la colocó sobre la membrana por un tiempo aproximado de 5 min. Se escurrió el líquido remanente y se procedió a exponerla utilizando una película Biomax (Kodak, Sigma, St. Louis, MO, USA) en un chasis adecuado. El tiempo de exposición varió de 5 min a 1 h dependiendo del ensayo. El revelado se realizó con el protocolo clásico de nitrato de plata (Sambrook *et al.*, 1989) (Figura 54B).

## Presencia de la región E1 en el genoma viral

Varios grupos han demostrado que por recombinación homóloga entre el genoma de las células 293 y el ADN viral pueden producirse virus replicativos. Es decir que, tanto el crudo/semilla como el stock, podrían estar contaminados con partículas capaces de infectar y lisar células no transcomplementadoras de E1, produciendo nuevas partículas infectivas. Esto trae aparejado importantes implicancias experimentales tanto en el laboratorio como en el plano de posibles ensayos clínicos (Lochmuller *et al.*, 1994). Si bien se han publicado protocolos en los que la sensibilidad llega a una unidad formadora de placa (ufp) de adenovirus replicativo por cada 10<sup>9</sup> ufp de adenovirus producido (Zhang *et al.*, 1995b), en este trabajo hemos puesto a punto una PCR altamente sensible (y con las condiciones de procesividad adecuadas) para determinar la presencia del locus E1 dentro del stock, se utilizó el siguiente programa:

(1) Desnaturalización inicial	95°C	5 min
(2) Desnaturalización	95°C	30 seg
(3) Hibridización/Elongación	68°C	4 min (al paso 2 x30 ciclos)
(4) Elongación final	68°C	15 minutos

Como control positivo se utilizó el ADN comercial del Adenovirus Tipo 2 en distintas concentraciones (Gibco BRL, Buffalo, NY, USA).

## Materiales y Métodos

Reactivos	Neg	Ad-2 (a)	Ad-2 (b)	Ad-2 (c)	Ad-βgal
DNTPs 10 mM (ul)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Buffer B (ul)	5	5	5	5	5
Primer A (ul)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer B (ul)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Muestra (ul)	-	1	1	1	1/5 HIRT
Elongasa (ul)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua (ul)	17.5	16.5	16.5	16.5	7.5

Primer A: 5' GACGCCCGACATCACCTGTG 3'

Primer B: 5' CGGCGAGCGCCTTCTGGCGG 3'

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1 % en TBE con bromuro de etidio y se comprobó la ausencia de una banda de aproximadamente 4 Kb, correspondiente al locus E1 del adenovirus. La sensibilidad de este ensayo permitió la detección de un mínimo de  $2.6 \times 10^5$  partículas infectivas en el volumen de reacción, por medio de la cual se podría identificar un virus replicativo en  $10^8$  partículas totales.

### Ensayo de efecto citopático (ECP)

Con el objeto de confirmar la ausencia de partículas no replicativas se realizó un ensayo de efecto citopático en células no transcomplementadoras. Para dicho ensayo se utilizan habitualmente células HeLa ya que son transducidas eficientemente por los adenovirus y no transcomplementan la proteína E1. Brevemente, se las plaquearon las células en varias p60 a 80 % de confluencia y se las transdujo con distintas dosis virales utilizando alícuotas del stock. Como control positivo se realizó la misma infección en células 293. Luego de 5 días se analizó si la monocapa de células no transcomplementadoras del gen E1 poseía efecto citopático. Ninguno de los stocks preparados hasta la fecha presentó efecto citopático en dichas condiciones.

### Preparación del stock adenoviral

Para la preparación del stock crudo, comenzamos infectando una monocapa de células 293 crecidas en p100 con una multiplicidad de infección aproximada de 100 partículas infectivas por célula. El proceso de infección se realizó durante 2 horas moviendo la placa suavemente cada 20 minutos para favorecer la distribución del virus en la monocapa. La MOI fue elegida de forma tal que el efecto citopático buscado se sitúe temporalmente entre las 24 y 48 hs post-infección. Luego de la incubación se cambió el

## Materiales y Métodos

sobrenadante de la placa infectada por medio fresco con 10 % de SFB. Entre las 24 y 48 horas las células de la monocapa se redondearon, perdiendo adhesión célula-célula y célula-MEC haciendo evidente el efecto citopático. Cuidadosamente se levantaron y centrifugaron las células a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de medio fresco con 2 % de SBF. Se realizaron tres ciclos de congelamiento-descongelamiento utilizando nitrógeno líquido y baño de agua a temperatura ambiente. Acto seguido, el lisado se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos para eliminar los detritos celulares. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 120 ml y se realizó la infección de 30 placas p150 (4 ml por placa) en la forma anteriormente descrita. Nuevamente, al observar el efecto citopático sobre esta monocapa celular, se levantaron las células, se centrifugaron, se resuspendieron en 24 ml de PBS y se lisaron con tres ciclos de nitrógeno líquido-temperatura ambiente. Por último se recuperó el sobrenadante producto de la centrifugación a 4000 rpm.

Además de los vectores portadores de la secuencia sentido y antisentido de SPARC, se amplificó un tercer vector conteniendo la secuencia codificante completa (527 pb) de la  $\beta$ -galactosidasa de *E coli* (Ad- $\beta$ gal). Dicho gen, clonado por otros investigadores del laboratorio en el sitio SalI del plásmido pADPSY. Este vector fue utilizado como reportero y control en todos los ensayos donde intervinieron los adenovirus.

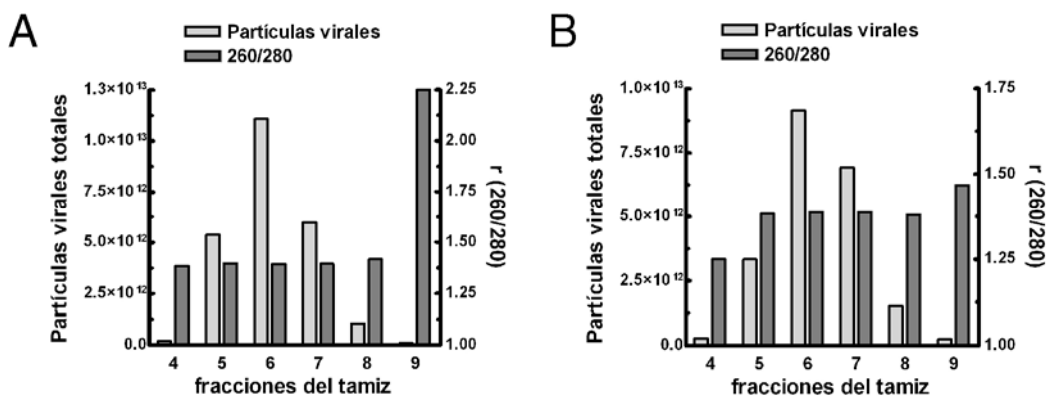
### Purificación del vector mediante gradientes de CICs

El sobrenadante conteniendo el vector no purificado se sometió a una centrifugación de 35000 g por 90 minutos a 20 °C en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio de densidades 1.6 g/ml y 1.3 g/ml en proporciones iguales, 2.5 ml de cada densidad (rotor SW40 y tubos de polialómero Beckman). Al terminar este primer ciclo de ultracentrifugación se observaron dos bandas blanquecinas separadas por al menos 1 cm de gradiente. La banda superior correspondió a la fracción enriquecida en partículas vacías (sin material genómico). La banda inferior se extrajo con una aguja 21 x 1 y se trasladó a un tubo con una solución de cloruro de cesio de densidad 1.34 g/ml. Luego de centrifugar a 20 °C por 18 hs a 35 000 g, se extrajo la banda del adenovirus y se la sembró en una columna de Sephadex G25 (GE Healthcare, Princeton, NJ, USA) con el buffer de corrida (10 mM Tris-Cl, 1mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.8)). La primeras 10 fracciones colectadas (0.5 ml cada una) fueron adicionadas con 10 % de glicerol estéril y se mantuvieron en hielo hasta su titulación por densidad óptica (ver “Titulación del stock”) (**Figura 55A y B**). Las fracciones con alto título se guardaron a -80 °C en alícuotas de 5 ul por tubo hasta su utilización en los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

## Materiales y Métodos

### Titulación del stock

La determinación del título por densidad óptica (DO) se basa en la absorbancia a 260 nm del ADN viral. Por lo tanto, al no utilizar un ensayo funcional este método no es capaz de discriminar las partículas no infectivas. No obstante, este título proporciona un dato numérico necesario para obtener una relación entre las partículas totales e infectivas. Brevemente, se tomaron 20 ul del stock y se inactivó en 180 ul finales de SDS 0.5 %, 0.02 M Tris-HCl (pH 7.5). Se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Una unidad de DO a 260 nm equivale a  $1.1 \times 10^{12}$  partículas totales/ml (Revah *et al.*, 1996). La relación 260/280 es utilizada para tener un primer valor de calidad del stock (Figura 55A y B). Una relación 260/280 óptima oscila entre 1.4 y 1.5. En los ejemplos mostrados, nótese como varía dicha relación al alejarse del pico máximo de partículas. Las fracciones con la relación de  $DO_{260/280}$  alterada fueron descartadas.



**Figura 55. Tamiz molecular en el último paso de purificación viral. (A)** Densidad óptica de las fracciones colectadas en la columna G25 para el stock2007 del virus Ad-SPas. **(B)** Idem para el stock2006 del virus Ad-SP. Las barras representan el número de partículas totales por fracción medidas por DO a 260 nm.

Para determinar el nivel de infectividad del stock se utilizó el protocolo de la dosis infectiva de cultivo de tejido 50 (DICT50) (Maizel *et al.*, 1968; Reed and Muench, 1938). Este método utiliza como parámetro para la cuantificación el efecto citopático que produce el adenovirus en un cultivo de células transcomplementadoras del gen E1. Brevemente, se cultivaron células 293 en una policubeta de 96 hasta una confluencia del 60 % en medio DMEM alta glucosa con 10 % de SFB. Se realizaron diluciones seriadas al décimo del stock en medio DMEM alta glucosa con 4 % de SFB y 20 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), hasta una dilución de  $1/10^{14}$ . Luego de descartar el medio de cultivo se agregó 0.1 ml por línea de pocillos de cada dilución, dejando al menos seis pocillos sin virus como control de viabilidad celular.

## Materiales y Métodos

Este cultivo infectado se mantuvo durante 10 días en estufa a 37 °C, y luego se determinó la cantidad de pocillos que muestran efecto citopático al microscopio. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS y se tiñeron con solución violeta de cresilo. Se determinó el título utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título DICT}_{50}/\text{ml} = 10E(x_0 + d/2 + d (\sum xi / n))$$

Siendo ( $x_0$ ) logaritmo en base 10 de la mayor dilución con todos los pocillos con efecto citopático; ( $d$ ) logaritmo en base 10 del factor de dilución utilizado en el ensayo; ( $n$ ) número de réplicas por dilución y ( $\sum xi$ )  $n$  mas número de pocillos con efecto citopático que que le siguen a la máxima dilución con el 100 % de efecto citopático.

## Análisis de endotoxina presente en el stock

Teniendo en cuenta que el stock sería utilizado en ensayos funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro*, la medición de los niveles de LPS (lipopolisacáridos bacterianos) se convirtió en otro importante control de calidad al que el stock fue sometido. Para saber si la cantidad de endotoxina presente en el stock, se encontraba dentro de los niveles aceptados se utilizó el kit E-Toxate (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) que comúnmente detecta hasta 0.05 EU/ml (aproximadamente 1 ng/ml) de endotoxina en solución. El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

## Protocolo estandar de transducción

Para la transducción de células en cultivo se utilizó el siguiente protocolo estandarizado. Las células fueron crecidas homogéneamente hasta un 80 % de confluencia en el medio correpondiente a la línea celular utilizada. Se retiró el medio y se agregó, dependiendo de la superficie a transducir, un volumen de medio sin SBF con el virus necesario para el experimento. Salvo que se indique lo contrario, la dosis utilizada para la transducción fue de  $5 \times 10^8$  DICT<sub>50</sub>/ml y el tiempo de duración 6 hs con movimiento de placas cada 20 min. Al término de la transducción se realizó un cambio de medio y se incubaron las células por otras 20 hs hasta el momento de la tripsinización, recuento y plaqueo para el experimento subsiguiente.

## Eficiencia de transducción con el Ad-βgal

La eficiencia de transducción fue medida en todos los casos mediante la utilización del Ad-βgal. Para dicho propósito, se realizó una transducción con concentración de virus

## Materiales y Métodos

conocida. Se incubaron las células por 36 hs adicionales y luego se fijaron en paraformaldehído 4 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS y se cubrió la monocapa con la solución de x-gal durante 18 hs (Alam and Cook, 1990). Se documentaron digitalmente las monocapas transducidas y posteriormente se realizó el recuento de al menos 1000 células provenientes de distintos campos para obtener el valor de eficiencia.

## Experimentos *in vivo*: xenotransplantes de células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes

### Cinética de crecimiento tumoral

Ratones atímicos N:NIH(S)-nu de 6-8 semanas de edad fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos *in vivo* (en el texto se indican con el nombre genérico de *nude*, por su característica de no poseer pelos). Los ratones *nude* fueron inyectados (0.1 ml final en PBS) en forma subcutánea en el flanco derecho con células parentales (no tratadas) o transducidas *ex vivo* con los vectores correspondientes al experimento. El crecimiento tumoral fue medido cada 2 o 3 días. Al momento de la medición se tomó el diámetro mayor y menor de cada tumor con un calibre digital. El volumen se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \left[ \frac{d^2 \times D}{2} \right] \quad \text{d: diámetro menor y D: diámetro mayor}$$

Los animales fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Ciudad de la Plata, Provincia de Buenos Aires. Todos los experimentos *in vivo* siguieron las normas institucionales aprobadas internacionalmente por NIH.

### Depleción de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en ratones atímicos

Para la depleción de la población de PMN en ratones *nude* fue necesario la preparación a gran escala de anticuerpo neutralizante. Medio condicionado del hibridoma RB6-8C5 productor del anticuerpo anti-Gr-1 (Dr Coffman, DNAX Research Institute) fue preparado, alicuotado y congelado a -80 °C hasta su utilización. Como anticuerpo control se utilizó un hibridoma productor de anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5, TIB 207™, ATCC), que fue procesado de igual manera.

## Materiales y Métodos

Para lograr una depleción de PMN mantenida en el tiempo se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 500  $\mu$ l del MC del hibridoma RB6-8C5 cada dos días. El efecto del anticuerpo neutralizante y su control (anti-CD4) se pusieron a prueba mediante el recuento de PMN producto de la inducción de su migración desde la circulación hacia a la cavidad abdominal por efecto de la inyección de una suspensión de caseína (Luo 2006). Brevemente, los animales a testear fueron inyectados i.p. dos veces (18 h y 3 h antes del sacrificio) con 1 ml de una suspensión 4 % de caseína en PBS. Luego del sacrificio, la suspensión celular del exudado intaperitoneal fue recuperada y centrifugada a 1000 rpm por 10 min. La cantidad relativa de PMN fue cuantificada por recuento diferencial de un frotis teñido con May Grunwald-Giemsa.

## Análisis histológico del tumor y su estroma

### Preparación de las muestras incluidas en parafina

Los tumores o sitios de inyección fueron disectados post-eutanasia mediante dislocación cervical. Dependiendo del tamaño, la muestra fue seccionada para su mejor fijación en formol 4 % diluido en PBS. En el caso de necesitar muestras criopreservadas el 50 % del tumor fue separado para dicho protocolo (ver luego “Inmunohistoquímica de muestras incluidas en OCT”). El tiempo de fijación fue estandarizado en 6 hs y el volumen de fijador utilizado fue similar a 40 volúmenes de muestra. Los tumores o sitios de inyección fueron embebidos en parafina, siguiendo los protocolos clásicos, para almacenarlos hasta su ulterior utilización. Secciones de 8  $\mu$ m de espesor fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas gradualmente. Para el desenmascarado de antígenos, las secciones fueron inmersas en buffer citrato (pH 6) y hervidas en dos ciclos de 15 min en olla a presión para microondas. Las secciones fueron lavadas en PBS por 10 min y la actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada por inmersión de los cortes en 3 % de peróxido de hidrógeno en metanol durante 5 min.

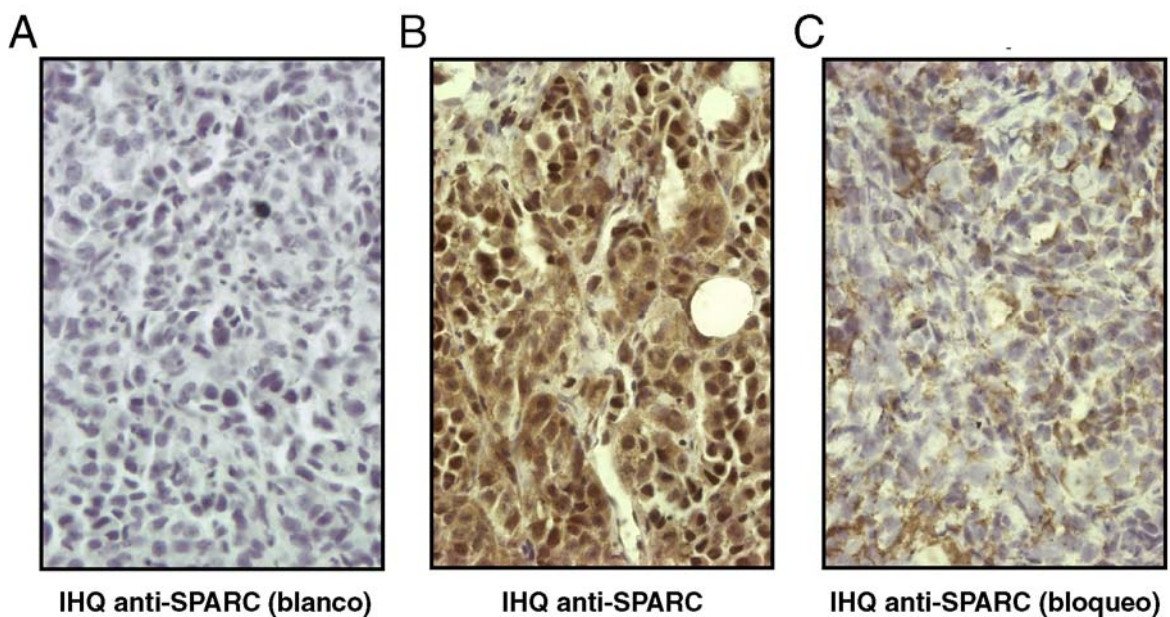
### Inmunohistoquímica de las secciones tumorales

El pegado de anticuerpo inespecífico fue bloqueado mediante la incubación de las secciones de tejido en 10 % de suero de cabra normal diluido en PBS. Luego de 1 h el exceso de suero fue removido y las secciones fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-SPARC realizado en conejo (Ledda *et al.*, 1997b) a una dilución de 1/200. La especificidad del anticuerpo fue demostrada mediante un bloqueo

## Materiales y Métodos

con la proteína nativa purificada de melanoma humano (**Figura 56**). Brevemente, se incubó el antisuero anti-SPARC (supusimos una concentración de anticuerpo específico de 1 mg/ml) con la proteína purificada, durante 2 hs a temperatura ambiente, en una relación molar de 1/65 respectivamente. Luego de la incubación se centrifugó 20 min 10.000 rpm. El sobrenadante fue utilizado en la concentración adecuada para realizar la inmunohistoquímica anti-SPARC (**Figura 56A**). El control se procesó de igual manera pero sin agregar la proteína purificada durante la incubación (**Figura 56B**).

Para el caso de la inmunohistoquímica anti Ki-67 (Abcam, Cambridge, MA, USA) se utilizó una dilución de 1/20 y el anti SMA (Dako, Carpintería, CA, USA) se utiliza sin diluir.



**Figura 56. Especificidad del anticuerpo policlonal anti-SPARC.** (A) Blanco de la IHQ anti-SPARC sin el antisuero primario en tumores de melanoma humano (A375N) crecidos en ratones inmunosuprimidos. (B) Inmunohistoquímica anti-SPARC con anti-suero. (C) IHQ anti-SPARC realizando un bloqueo del antisuero mediante la utilización de proteína nativa purificada de melanoma humano.

Luego de dos lavados en PBS por 10 min, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 45 min. En el caso del anti SMA, el kit comercial proveía de un anticuerpo secundario listo para usar (Dako, Carpintería, CA, USA). Luego de los lavados las secciones fueron incubadas con el reactivo ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 45 min siguiendo las recomendaciones del fabricante. El color de la reacción fue desarrollado incubando las secciones del tejido con la diamino benzidina líquida (Substrate Chromogen System, DakoCytomation, Carpintería, CA,

## Materiales y Métodos

USA). Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas gradualmente y montadas.

### Tinción Tricrómica de Masson, cuantificación de colágeno y recuento de fibroblastos

Para la detección de colágeno total en los sitios de inyección las secciones fueron desparafinadas y teñidas con la coloración tricrómica de Masson siguiendo el protocolo estandar. El contenido de colágeno de las muestras fue cuantitativamente determinado mediante el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). Brevemente, cinco campos de la periferia de tumores provenientes de secciones seriadas, de al menos cuatro animales diferentes por tratamiento, fueron digitalmente seleccionados. El área rica en colágeno de cada campo seleccionado fue cuantificada utilizando la función *count tool - area measurement* del software Image-Pro Plus. De la misma manera, el número de fibroblastos inmerso en el área rica en colágeno dentro de los campos seleccionados al azar fueron contados manualmente.

### Inmunohistoquímica de las muestras incluídas en OCT

Como se mencionó anteriormente, un 50 % de cada tumor o sitio de inyección fue separado para aquellos anticuerpos que no funcionaron en las secciones de parafina.

Para el caso de la detección de CD31, los tumores fueron fijados en PFA 4 % en PBS por tres horas. Las muestras se criopreservaron durante toda la noche en 30 % de sacarosa a 4 °C y se incluyeron en OCT para almacenarlas a -20 °C hasta su utilización. Mediante la utilización de criostato, se cortaron secciones de 9  $\mu$ m de espesor y se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina. La rehidratación de las muestras se realizó en diluciones seriadas de etanol. Para la recuperación antigénica se realizó una digestión de 3 min con pepsina (0.1 mg/ml final). Luego de retirar la pepsina y hacer dos lavados con PBS se procedió a bloquear las secciones de tejido con 10 % de suero de cabra durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados toda la noche con el anticuerpo anti-CD31 (PharMingen, San Diego, CA, USA) a una dilución de 1/600. Luego de los lavados las secciones fueron incubadas con una dilucion 1/400 del anticuerpo secundario biotinilado anti-rata hecho en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA). La amplificación de la señal y el revelado de la reacción se realizaron siguiendo las indicaciones anteriormente descriptas (ver sección “Inmunohistoquímica”). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá. El control del primer anticuerpo de

## Materiales y Métodos

todas las inmunohistoquímicas realizadas en esta sección fue realizado mediante una incubación en PBS.

### Cuantificación de microvasculatura en las secciones tumorales

Las secciones inmunoteñidas para la molécula CD31 fueron visualizadas a bajo aumento (4x-10x) con el objeto de identificar las áreas ricas en neovascularización. Seguidamente, se realizó un recuento de las células endoteliales y/o capilares pequeños (menores de 3 eritrocitos de diámetro) utilizando una magnificación de 40x. El recuento lo realizó la patóloga Alicia Inés Bravo (colaboradora de este y otros proyectos del laboratorio) en cinco campos, dentro de un área definida como *hot spot* o altamente neovascularizada, en varias secciones de al menos cuatro animales por grupo de tratamiento. El dato final se expresó como el promedio de vasos por unidad de área por tratamiento.

### Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral

El recuento del infiltrado inflamatorio se realizó con cortes seriados teñidos con H&E de sitios de inyección tomados a las 24, 72 y 120 hs. La patóloga Alicia Inés Bravo realizó un recuento de 10 campos por sección a (100x). Se evaluaron al menos 5 animales por tratamiento (Ad-SPas y Ad-βgal) y en dos experimentos independientes.

### Análisis de metástasis en ratones *nude*

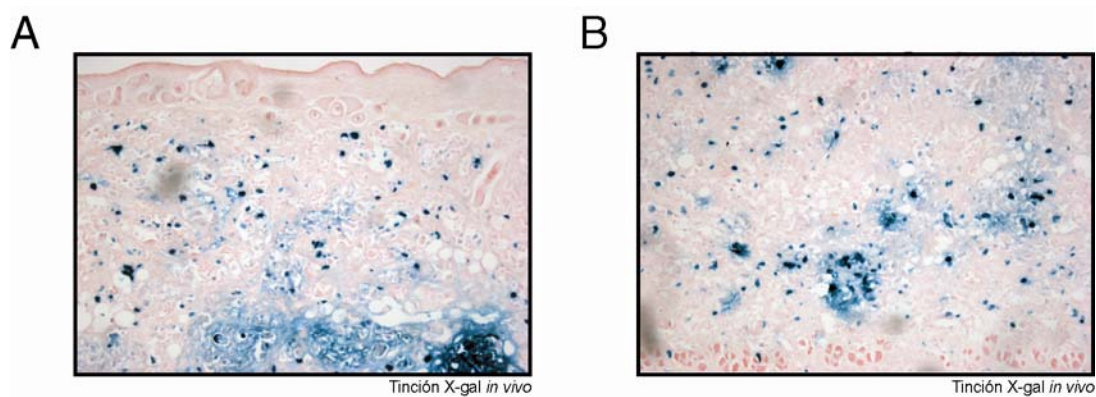
El análisis de metástasis a partir de tumores primarios se realizó extirpando los tumores a los 50 días de desarrollo, mediante una cirugía con anestesia. En ese momento se colectaron muestras de cerebro, hígado, pulmón, intestino y peritoneo. El procesamiento de los tejidos fue similar al descrito para los tumores. Tanto el animal entero como las muestras de los distintos órganos fueron analizados histológicamente por la patóloga Alicia Inés Bravo. En el animal entero se buscaron focos de metástasis macroscópicos mientras que en las secciones de los órganos se puso especial énfasis en la aparición de micrometástasis.

### Biodistribución de las células transducidas en la masa tumoral

La la biodistribución de las células transducidas en la masa tumoral fue realizada mediante la realización de cortes en crióstato seguidos del protocolo clásico de tinción con X-gal, detallado anteriormente. Este tipo de análisis permitió (utilizando el Ad-βGal

## Materiales y Métodos

como marcador) corroborar que las células transducidas *ex vivo* y posteriormente inyectadas se distribuyen homogéneamente en la masa tumoral. En la figura 50 se observan en azul las células X-gal positivas (portadoras del transgén) a los 5 y 7 días post-inyección del melanoma (Figura 57A y B).



**Figura 57. Las células tumorales transducidas con el vector reportero se distribuyen homogéneamente en la masa tumoral. (A)** Sección tumoral cortada por crióstato a los 5 días post-inyección de las células A375N- $\beta$ Gal. **(B)** Misma situación pero sacrificando el animal a los 7 días post-inyección. En ambos caso se realizó una contratinción con Rojo neutro para su mejor visualización.

## Construcción de la quimera hSPARC-FcIgG

### Descripción general

A partir de un plásmido conteniendo el dominio extracelular del receptor de TNF unido a la porción Fc de una IgG1 de ratón con su péptido señal (Peppel *et al.*, 1991) (cedido gentilmente por el Dr. Yuti Chernajovsky), reemplazamos la secuencia del receptor por el ADNc de SPARC humana obtenida del plásmido pBS-SPARC (Podhajcer *et al.*, 1996) con el siguiente par de primers:

5' GCATCGATCAGCACCATGAGGGCCTGGA3' (con un sitio *Cla* I)

5' CGGGATCCGATCACAAGATCCTTGTCGAT3' (con un codón stop más un sitio *Bam*HI)

La construcción hSPARC-FcIgG, residente en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), fue utilizada para la producción de la quimera. La línea CHO (células de ovario de hamster chino) se transfectó con el plásmido que contenía la construcción quimera SPARC-FcIgG. Luego de seleccionar con G-418, se aislaron clones altamente productores de la proteína quimera. Medios condicionados de dichas células crecidas en suspensión se utilizaron para purificar a homogeneidad la proteína mediante una columna de afinidad de proteína G-Sepharosa (Sigma, St. Luis, MO, USA). El

## Materiales y Métodos

rendimiento de la preparación alcanzó los 5 mg de proteína quimera por litro de medio condicionado.

Utilizando extractos de proteína total y de membrana de células HeLa y HEK293 marcados con Metionina-<sup>35</sup>S (PerkinElmer Life Sciences, Downers Grove, IL, USA) y la proteína quimera SPARC-FcIgG se realizaron inmunoprecipitaciones magnéticas con microesferas de hierro acopladas a anticuerpos anti-IgG1 de ratón (DynaL, Oslo, Norway) tal como se describe en el manual técnico de la compañía (Technical Handbook, Second Edition, Cell Separation and Protein Purification).

## Sistema de los dos híbridos en levaduras

### Descripción general

Los plásmidos, las cepas de levaduras y los medios de cultivo se obtuvieron de Clontech (Mountain View, CA, USA). Para la construcción del sistema de doble híbrido se utilizó el kit comercial Matchmaker™ Two-Hybrid System 2 (Clontech). Brevemente, el ADNc codificante para SPARC humana se clonó en el vector pAS2-1 en el mismo marco de lectura que el sitio de unión al ADN (*binding domain* o BD) de la proteína Gal4. A efectos de identificar las proteínas interactuantes de SPARC, un banco de ADNc de la línea de melanoma IIB-MEL-J se clonó en el plásmido de levadura pACT2 manteniendo el marco de lectura del dominio de activación (*activation domain* o AD) de la proteína nuclear Gal4. Ambos híbridos fueron cotransfectados en una cepa de levadura (PJ-X) que contiene dos construcciones de genes reporteros integrados (el gen de levadura HIS3 y el gen bacteriano  $\beta$ gal ambos liderados por una región promotora que posee sitios para el dominio de unión de la proteína Gal4). En aquellos casos donde la actividad reportera transcripcional fue detectada, se amplificaron los clones, se rescataron los plásmidos para su confirmación funcional y se secuenciaron posteriormente para la identificación de los candidatos. Otros detalles de los protocolos de levaduras utilizados pueden consultarse en el sitio provisto por la compañía (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3024-1.pdf>).

# Métodos utilizados en el modelo biológico de *Drosophila melanogaster*

## Origen de las líneas de mosca utilizadas en el trabajo

Para el trabajo con las deleciones cromosómicas **TI-I** y **ro80b**, que incluyen al locus dSPARC se utilizaron líneas heterocigotas balanceadas del Centro de Stocks de la Universidad de Indiana (*Bloomington Drosophila Stock Center*). Con el objeto de determinar molecularmente la ausencia del locus de dSPARC se efectuó un cambio de cromosoma balanceador de dichas deficiencias cromosómicas (ver PCR de embriones únicos en la sección de “Materiales y Métodos”) generando las siguientes nuevas líneas: **TI-I/TM3-GFP** (Df (3R) TI-I / TM3-p-ActGFP) y **ro80b/TM3-GFP** (Df (3R) ro80b / TM3-p-ActGFP).

Las líneas transgénicas utilizadas para la hiperexpresión de dSPARC fueron generadas en nuestro laboratorio: **UAS-SP**, **UAS-SP5 / TM3**, **UAS-SP6** y **UAS-SP7 / TM3**. Como control de hiperexpresión ectópica se utilizó la línea **UAS-*tau*GFP** (B. Shilo). A continuación se detalla el origen de las líneas inductoras utilizadas en este trabajo: ***en-Gal4 / CyO*** (A. Macias), ***HS-Gal4*** (E. Hafen), ***btl-Gal4*** (S. Hayashi), ***69B-Gal4***, ***prd-Gal4 / TM3***, ***hml-Gal4***, ***c381-Gal4*** (Bloomington). Las líneas empleadas para movilizar el elemento P fueron: ***Xa / CyOb***, ***Xa / TM3***, ***BcElp / CyO $\delta$ 2-3***(*Bloomington Drosophila Stock Center*). También se utilizaron otros cromosomas balanceadores de uso corriente (Greenspan, 1997). La cepa ***yw*** fue utilizada como control, y la cepa ***Canton S*** (*Bloomington Drosophila Stock Center*) como salvaje.

## Mantenimiento de los stocks

Para cultivos de líneas y cruzamientos se utilizaron viales de vidrio de 2-3 cm de diámetro y 8 cm de alto, conteniendo suficiente cantidad de alimento (harina de maíz, sacarosa, levadura, ácido propiónico y Nipagín) y tapados con algodón (Sullivan *et al.*, 2000). Para cultivos a mayor escala se utilizaron botellas de plástico de 170 ml (Applied Scientific, South San Francisco, CA, USA) con tapas de cartón. Mediante la utilización de incubadoras de temperatura controlada fue posible crecer las moscas a diferentes temperaturas dependiendo del experimento. Por lo general, para el mantenimiento de las líneas se utilizó una temperatura de 18 °C mientras que la amplificación de los stocks se realizó a 25 °C (Greenspan, 1997).

## Materiales y Métodos

Típicamente, los stocks fueron repicados cada 20 días, En cada repique, los adultos se transfieren a un nuevo vial, manteniéndolos a 25 °C durante tres días para luego ser descartados. Para llevar a cabo los cruzamientos son utilizadas hembras vírgenes (con menos de 6 horas de desarrollo a 25 °C). Los cruzamientos y el manejo de adultos se realizaron bajo la lupa sobre una plataforma gaseada con CO<sub>2</sub> que mantiene a los individuos anestesiados. Típicamente, cada cruzamiento se realizó con unas 50 hembras vírgenes y unos 20-40 machos, que fueron mantenidos durante dos o tres días en viales a 25 °C y luego mudados a vasos para la ovipuesta.

### Clonado de SPARC de *Drosophila melanogaster*

A partir de un EST de *Drosophila melanogaster*, obtenido del *Drosophila* Genomics Resource Center (Indiana, USA) se amplificó la región codificante completa del gen SPARC. Los primers utilizados fueron los siguientes:

Primer UAS-DMSP5: 5' CGG AAT TCA TGC GTT CCC TTT 3' (con sitio EcoRI)

Primer UAS-DMSP3: 5' GCT CTA GAC TAA CCC AGG AGA TG 3' (con sitio XbaI)

El amplicón de 564pb fue digerido con las enzimas EcoRI y XbaI, purificado por gel (Qiaex II Gel Extraction Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA) y subclonado en su correcta orientación en el plásmido CaSpeR-UAS o pUAS (Brand and Perrimon, 1993). Se verificó la ausencia de mutaciones mediante secuenciación y, por último, se amplificó y purificó el plásmido mediante un kit comercial (Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA).

### Construcción del individuo transgénico

Las moscas transgénicas se generaron con la construcción de ADN antes mencionada, que lleva un marcador (el gen mini-white) que confiere coloración de ojos a moscas mutantes *white* (*w*). Brevemente, las construcciones de ADN se inyectaron junto a un plásmido helper, que codifica la enzima transposasa, en embriones *w* decorionados y con no más de 30 minutos luego de la ovipuesta. Los embriones son inmovilizados sobre una cinta doble faz pegada a un portaobjetos. Utilizamos capilares Narishige de 1 mm x 90 mm que fueron estirados en un estirador vertical Narishige PC-10 (en dos etapas a 63 °C y 68.9 °C, respectivamente). Con una solución conteniendo de 0.4-0.6 ug/ul del ADN pUAS-SP y 0.2 ug/ul de plásmido T-helper en 10 ul de buffer de inyección [5 mM KCl, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8], la cual fue previamente centrifugada por 10 min a 10 000 g y transferida a un nuevo tubo. Los embriones fueron inyectados con el microinyector Tranjector 5246 (Eppendorf) y un microscopio Olympus BH bajo aceite halocarbonado

## Materiales y Métodos

700 (Sigma, St. Louis, MO, USA) para evitar la deshidratación. Durante las siguientes 48 hs los embriones se mantuvieron 18 °C hasta que las larvas comenzaron a emerger. Los adultos obtenidos fueron cruzados en forma individual con moscas *y w*. Seguidamente se seleccionaron de la progenie moscas con coloración de ojos amarilla, naranja o roja (marcador de transgénesis). Las moscas transgénicas obtenidas fueron mapeadas y establecidas como líneas estables.

### Mapeo de las líneas transgénicas

Una vez obtenida las moscas transgénicas se determinó en qué cromosoma fue insertado el elemento P conteniendo el ADNc de dSPARC mediante un mapeo por análisis de segregación según Ashburner (Ashburner *et al.*, 2005). Este análisis se basa en la segregación del transgen mini-*white* (*w*) codificado por el elemento P. En nuestro caso, el elemento P del único individuo transgénico obtenido mapeó en el cromosoma III. Por dicha razón y para descartar el efecto de fenotipos dependientes de la posición del transgén se generaron nuevas líneas a partir de la mosca transgénica original.

### Generación de líneas transgénicas a partir de una preexistente

Se generaron nuevas líneas a partir de la mosca transgénica original (UAS-SP) por transposición del elemento P (Robertson *et al.*, 1988). La técnica utilizada se basa en la utilización de la transposasa  $\Delta 2-3$  de *Drosophila* para promover el salto del elemento P que fue incorporado durante la transgénesis. Brevemente, la línea transgénica original se cruzó con una línea productora de transposasa (*y w*; BcElp/CyO $\Delta 2-3$ ) de manera de obtener individuos UAS-SP/CyO $\Delta 2-3$  (individuos donde en sus gametas ocurre la transposición). Las nuevas inserciones fueron mapeadas siguiendo el procedimiento de la sección anterior. Como resultado de la técnica obtuvimos siete nuevas transposiciones, todas localizadas en el cromosoma III. Por dicha razón, sólo se conservaron aquellas en las que sus colores de ojos (dependientes de la posición del elemento P) fueron disímiles respecto de la transgénica original (UAS-SP) (Greenspan, 1997). La viabilidad de las líneas en homocigosis se determinó cruzando machos y hembras heterocigotas UAS-SP / balanceador y observando si aparecen homocigotas del transgén en la progenie (negativos para el marcador del balanceador). Las inserciones que resultaron letales en homocigosis se mantuvieron en heterocigosis con el balanceador TM3.

Por lo tanto, con el fin de independizarnos de los efectos de posición del transgén, en todos los experimentos donde se utilizaron tanto fenotipos de ganancia de función de

## Materiales y Métodos

dSPARC como las deleciones descritas, se utilizaron paralelamente al menos dos líneas transgénicas: la línea original (UAS-SP) y la línea n° 7 (UAS-SP7/TM3). En la sección de resultados se indicó con que líneas transgénicas fue realizado cada experimento de manera independiente.

### Recolección de embriones

Los embriones se colectaron en placas de agar, sacarosa y levadura (Greenspan, 1997). Los tiempos y temperaturas de las ovipuestas y desarrollo de los embriones se indicaron de manera independiente para cada experimento en la sección de resultados. Para el estudio de los fenotipos asociados a la ausencia de dSPARC fue necesario realizar una separación a mano de los individuos homocigotas para las deleciones (Tl-I y ro80b). Para ello, se colectaron embriones de ovipuestas de 16 hs y se los dejó desarrollar otras 16 hs a 25 °C (de manera de disminuir el aporte materno del gen reportero GFP). Se seleccionaron embriones GFP negativos para las dos líneas portadoras de las deleciones cromosómicas. A partir de dichos individuos se prepararon las cutículas para su posterior análisis.

### Preparación de cutículas

Los embriones colectados durante ovipuestas largas (al menos 18 hs) se dejaron desarrollar/envejecer a 25 °C durante 48-72 hs para enriquecer la población de fenotipos abortivos. Dos veces por día se realizó un cambio de levadura de la placa para ir descartando las larvas sin fenotipo que van eclosionando. Los embriones presentes luego de 72 hs se decorionaron durante 3-5 min con lavandina diluida al medio, se lavaron con 0.1 % Tritón X-100 en PBS (PT) y se montaron en ácido láctico/solución de Hoyer 1:1 (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). En algunos experimentos se utilizó la variante del tratamiento con metanol para retirar las membranas vitelinas que recubren los embriones (Sullivan *et al.*, 2000). Para cualquiera de las dos situaciones, los preparados se secaron en estufa de calor seco a 65 °C durante al menos 36 hs. Las cutículas embrionarias fueron examinadas por microscopía de campo oscuro. Las fotografías fueron obtenidas usando una cámara digital Cool Snap-Pro color conectada al microscopio y el software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics Inc.). Las imágenes fueron procesadas en Adobe Photoshop CS.

## Materiales y Métodos

### Caracterización molecular de las deficiencias: PCR de embriones únicos

Las deleciones o deficiencias cromosómicas seleccionadas (TI-I y ro80b) para el estudio de la pérdida de función de dSPARC no contaban con límites (*end points*) moleculares bien definidos en las bases de datos (Drysdale and Crosby, 2005; Greenspan, 1997). Para definir si el gen dSPARC se encontraba incluido en las deleciones cromosómicas seleccionadas, se realizó una PCR a partir de embriones únicos (Hutton and K., 1999). Se colectaron individuos heterocigotas y homocigas para la deleción a partir de ovipuestas de 16 hs más otras 16 hs de desarrollo a 25 °C. Los embriones colectados fueron colocados individualmente en solución de extracción de ADN (Garozzo and Christensen, 1994). La preparación de ADN genómico según Sullivan (Sullivan *et al.*, 2000). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 ul con 1 ul de ADN templado (extracto de embriones únicos), 0.5 ul de cada uno de los primers (ver a continuación), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, buffer de PCR 1x y 0.2 ul Taq Polimerasa (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Se iniciaron reacciones en paralelo con primers para amplificar dSPARC y el CG 15133 como control de ADN del cromosoma II.

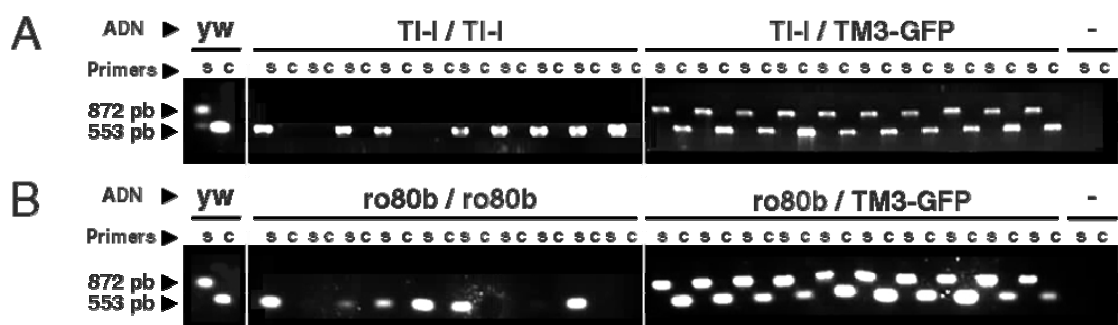
Primer SPARC\_F: 5' ATG CGC TCC CTT TGG CTG 3'

Primer SPARC\_R: 5' CTA ACC CAG AAG ATG GGG CTG AGC 3' (872 pb – hybrid. 68 °C)

Primer CG 15133\_F: 5' GTC TGG AAC CAT CGC TGC TT 3'

Primer CG 15133\_R: 5' AGG CTC CAC AAC ATC ACC GT 3' (523 pb – hybrid. 62 °C)

Los productos de la reacción se corrieron en un gel al 1% de agarosa en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) con bromuro de etidio y se visualizaron en un documentador de geles (Figura 58A y B).



**Figura 58. Las deleciones TI-I y ro80b incluyen el locus de dSPARC.** (A) PCR sobre ADN genómico de 10 embriones únicos para la deleción TI-I. (B) PCR sobre ADN genómico de 10 embriones únicos para las deleción ro80b. Los primers de cada reacción se indican sobre las fotografías (dSPARC: S y CG15133: C). El amplicón de 872 pb corresponde al gen de dSPARC mientras que el amplicón de 553 pb corresponde al gen CG15133. Como control positivo de ambas reacciones se utilizó ADN genómico de la línea y w El control negativo (indicado con un signo menos) fue realizado sin templado. Sobre las líneas se indica el genotipo de los embriones individuales.

## Materiales y Métodos

### El sistema Gal4/UAS en *Drosophila melanogaster*

Para dirigir la expresión ectópica de dSPARC utilizamos el sistema Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) (ver **Figura 36**). Dicho sistema se basa en la interacción del factor de transcripción Gal4 con la secuencia nucleotídica o elemento respondedor UAS (*upstream activating sequence*). Utilizando una mosca transgénica portadora del gen de interés río abajo del elemento respondedor UAS, es posible direccionar su expresión mediante un cruzamiento con un individuo trasgénico que exprese la proteína Gal4 en un tejido o momento del desarrollo específico. Estas moscas que poseen la capacidad de direccionar la expresión del trasgen de interés se las llama “líneas inductoras” o *drivers*. Para este trabajo de tesis las líneas inductoras fueron obtenidas de la Universidad de Indiana (*Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana University*). Todos los experimentos de ganancia de función se llevaron a cabo a 25 °C, a menos que se indique lo contrario en el cuerpo principal de la tesis.

### Ganancia de función de dSPARC en embriones y adultos

Para los experimentos de ganancia de función se utilizaron las líneas inductoras detalladas en la tabla 7.

Nombre	Genotipo	Expresión (cromosoma)
Engrailed	en Gal4 / CyO	Ectodérmica en 14 bandas (II)
Heat shock “fuerte”	Hs Gal4 / Hs Gal4	Ubicua (III)
Heat shock “débil”	Hs Gal4 / CyO	Ubicua (II)
Breathless	btl Gal4 / btl Gal4	Tráqueas y línea media ventral (II)
69B	PgawB69B Gal 4 TM3 flotante	Ectodermo, discos imaginales (III)
Paired	prd Gal4 / TM3	Ectodérmica en 7 bandas (III)
Hemolactin	hml Gal4 / hml Gal4	Hemocitos (II)
3734 (enhancer trap)	PGawBc381 / PGawBc381	Amnioserosa (IV)

**Tabla 7. Inductores Gal4 utilizados para dirigir la expresión de SPARC en embriones.**

Para la hiperexpresión ubicua de dSPARC, la progenie del cruzamiento UAS-SP x HS-Gal 4, o UAS SP7 / TM3 x HS-Gal 4 fue sincronizada mediante ovipuestas de 3 hs a 25 °C y posteriormente se dejaron desarrollar los embriones durante 5 hs a 25 °C, de forma que en promedio alcanzaron unas 5.5 hs de desarrollo (correspondiente al estadio n°10/11 según Hartenstein (Hartenstein, 1993)). Las placas conteniendo estos embriones fueron sometidas a un shock térmico (30 min a 37 °C). Luego se los dejó durante la noche a 28

## Materiales y Métodos

°C y se prepararon cutículas según el procedimiento detallado anteriormente. La actividad de Gal4 es mínima a 16 °C, y aumenta con la temperatura, siendo 29 °C la temperatura en la que se logra la mayor actividad del factor de transcripción con menores efectos sobre la fertilidad y la viabilidad (Duffy, 2002).

Para la hiperexpresión tejido-específica de dSPARC, las líneas UAS-SP o UAS-SP7 / TM3 se cruzaron por las distintas líneas inductoras de Gal4 y se colectaron los embriones de ovipuestas nocturnas. Luego se dejaron desarrollar los embriones durante al menos 24 hs a 25 °C, y las larvas fueron retiradas del medio a medida que iban eclosionando. Los embriones restantes, no eclosionados, fueron utilizados para preparar cutículas.

Para comprobar si las membranas vitelinas vacías eran producto de huevos no fecundados o de letalidad embriónica temprana asociada a la hiperexpresión, embriones de idénticos genotipo y tiempo de desarrollo se decorionaron con lavandina diluida al medio y se fijaron con 0.5 % glutaraldehído en PBS. Se montó en 80 % glicerol en PT (0.1 % Triton X-100 en PBS) y se observaron por microscopía de campo claro en un microscopio OLYMPUS BX60F5.

Alas de adultos de la línea UAS SP6 o salvajes fueron preparadas para microscopía transversal. Las alas fueron disectadas y tratadas con una solución salina modificada (0.8 % NaCl, 0.8 % sacarosa, 0.4 % glucosa), luego se fijaron en 2 % glutaraldehído, 2 % paraformaldehído en 0.1M buffer cacodilato (pH 7.2) a 4 °C durante toda la noche y se almacenaron en buffer con 0.2M de sacarosa. Luego de lavar en buffer, fueron post-fijadas en tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) por 1 hora, lavadas en buffer PT y deshidratadas en series etanólicas, clareadas en acetona y embebidas en araldita. Se cortaron secciones semifinas y ultrafinas en un ultramicrotomo Sorvall-Porter-Blum, las cuales fueron teñidas con azul de toluidina y con acetato de uranilo (semifinas) o citrato de plomo (ultrafinas). Las secciones semifinas fueron examinadas en un microscopio OLYMPUS BX60F5. Las secciones ultrafinas fueron examinadas en un microscopio JEOL 1200EX2. Las fotomicrografías se obtuvieron por medio de procedimientos estándar.

### Hibridización *in situ*

Se sintetizaron sondas de ARN marcadas con digoxigenina (DIG) (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó como templado un ADN linealizado, conteniendo el promotor de la polimerasa de los fagos T7 o T3. Por transcripción *in vitro* a partir de dichos promotores y mediante la utilización de la polimerasa respectiva (Pol T7 para detectar el ARNm y Pol T3 como control antisentido) se obtuvieron sondas marcadas con DIG, de un largo

## Materiales y Métodos

aproximado de 900 pb. La eficiencia de marcación de la sonda se verificó mediante la técnica de Dot blot.

Para la hibridización *in situ* se trabajó con embriones no sincronizados, colectados de ovipuestas nocturnas. Los embriones fueron decorionados, fijados y tratados con las sondas antisentido y sentido diluídas 1/1000 como se describe en:

<http://www.biology.ucsd.edu/~davek>. La concentración óptima de sonda fue seleccionada a partir de una prueba previa con distintas diluciones de sonda. La sonda se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina 1/5 000 (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). El revelado de la reacción se llevó a cabo con los sustratos NBT + BCIP (4.5 ul + 3.5 ul en 1 ml de solución). La reacción se observó a intervalos regulares hasta detectar la tinción específica, y se detuvo lavando con 0.1 % de Tween-20 en PBS (PTW). Los embriones se montaron en 70 % de glicerol en PTW y se examinaron por microscopía de campo claro en un microscopio OLYMPUS BX60F5. Se tomaron fotografías con una cámara digital Cool Snap-Pro color conectada al microscopio y el software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics Inc.). Las imágenes fueron procesadas en Adobe Photoshop.

## Inmunohistoquímica del sistema traqueal

Embriones UAS-SP / *btl*-Gal4 y UAS SP-7 / *btl*-Gal4 colectados en ovipuestas nocturnas se decorionaron con lavandina diluida al medio y se fijaron durante 20 minutos con 3.7 % de formaldehído en PBS. Los embriones fijados se bloquearon con 10 % de BSA en PT (0.1 % Tritón X-100 en PBS). Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón 2A12 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) 1/10 en PT para teñir el lumen del sistema traqueal de embriones (estadios 13/14 en adelante); y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón biotinilado 1/100 en 10 % de suero normal en PT. Para amplificar la señal se utilizó el kit ABC (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) compuesto por una solución de estreptavidina y una solución de biotina conjugada a peroxidasa de rabanito (HRP), según las especificaciones del fabricante. La técnica de revelado con DAB (diaminobenzidina) se llevó a cabo como se describe en la hoja de datos del comerciante (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), observando la reacción colorimétrica a intervalos. Una vez detenida la reacción con abundantes lavados en PT, los embriones se montaron en metil salicilato y se observaron por microscopía de campo claro en un microscopio OLYMPUS BX60F5. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Cool Snap-Pro color conectada al microscopio y el software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics Inc.). Las imágenes fueron procesadas en Adobe Photoshop CS.

# Genómica de la ganancia de función de dSPARC en *Drosophila melanogaster*

## Preparación de RNA de embriones

Los embriones provenientes de ovipuestas de 2 hs a 25 °C y desarrollados mediante el esquema presentado en la sección de resultado (Capítulo II), fueron decorionados con lavandina diluída al medio, filtrados y lavados con buffer PT. La metodología utilizada para la extracción y purificación de ARN total a partir de embriones, fue la misma que se utilizó mediante el reactivo Tri Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) en la sección de cultivos celulares (ver “Northern blot”) (Chomczynski and Sacchi, 1987). Para el paso inicial de homogenización utilizamos un mililitro de Trizol por cada 300 embriones disgregados. Luego de realizar el tratamiento con el émbolo u homogenizador de vidrio pirex se recupero la solución de Tri y se continuó con el protocolo clásico.

Con vasos compuestos por 50 hembras y 50 machos (siguiendo el diseño de ovipuestas presentado en la sección de resultados) se obtuvieron aproximadamente 250 embriones por vaso/día. Teniendo en cuenta un rendimiento aproximado de 100 ng de RNA total por embrión (Sullivan *et al.*, 2000) se obtuvieron unos 20 ug de RNA por genotipo/día. Dado que nuestro cálculo de la cantidad mínima necesaria de RNA por genotipo rondaba los 100 ug, decidimos juntar las preparaciones de 4 días. Cada muestra biológica fue complementada con otros dos vasos de moscas con el mismo genotipo.

## Control de calidad del RNA: Northern Blot y Bioanalyzer

El Northern blot con las muestras de ARN total de embriones de *Drosophila* fue realizado siguiendo el protocolo descrito en la primer sección de Materiales y Métodos. Si bien el estado de las muestras había sido analizado mediante la tinción con azul de metileno, la integridad de los ARN totales de todas las réplicas fue verificada mediante la utilización del Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Un microlitro de cada una de las muestras de ARN fueron sembrados en los chips (RNA Lab-on-a-Chip, Agilent) permitiendo evaluar la concentración, el porcentaje de degradación, la relación entre los ARN ribosomales mayoritarios y la presencia de impurezas de las muestras. Este análisis fue realizado en una de las estadias realizada en el Laboratorio del Dr. Enrique Martín Blanco del Instituto de Biología Molecular de Barcelona, España. Sólo una de todas las muestras analizadas (más de 80 en total, teniendo en cuenta las réplicas técnicas) evidenció, una relación de los ARN ribosomales alterada. Dicha muestra fue descartada antes de ser utilizada para la síntesis del ADNc.

## Materiales y Métodos

### Tecnología Affymetrix: GeneChip® *Drosophila* 2

Para el análisis del transcriptoma del embrión de *Drosophila* se utilizó el el GeneChip® *Drosophila* Genome 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Esta tecnología permitió estudiar la expresión de más de 18 500 transcritos curados seleccionados a partir de una reciente anotación (FlyBase *Drosophila melanogaster* Genome, release 3.1, BDGP). Esta tecnología de oligochips (25-mer) de alta densidad contiene un conjunto de 14 sondas (*probe sets*) por cada transcritos a testear, lo que permite realizar medidas múltiples independientes dentro del mismo arreglo.

Los 16 oligochips utilizados para el experimento de transcriptómica fueron hibridizados en la Unidad de Genómica del IDIBAPS (*L'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer*), Universidad de Barcelona, España. Los datos crudos o *celfiles* arrojados por el software de Affymetrix (NetAffx™ Analysis Center) fueron finalmente procesados en el Instituto Leloir.

## Análisis estadístico

### Consideraciones generales

Si bien para el presente trabajo no fue necesario poner en práctica un complejo análisis estadístico, podemos decir que tanto el cuidadoso diseño experimental como el estudio teórico de las pruebas estadísticas utilizadas conforman, en su conjunto, un importante pilar sobre el que se sustentan nuestras conclusiones. Para las pruebas paramétricas utilizadas se pusieron en práctica ensayos de normalidad y homogeneidad de la varianza u homocedacia con el fin de confirmar los supuestos requeridos. Para el supuesto de independencia de las muestras solo fue necesario el criterio del operador al momento de diseñar y poner en práctica la toma de muestras.

Las curvas de sobrevivencia en los experimentos *in vivo* fueron calculadas con el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante el test de ranking de log. Las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis de datos fue realizado con el software Prism 4 GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

En cada sección del presente trabajo, donde fue necesario realizar un análisis estadístico específico fue aclarado en el cuerpo de resultados. A menos que se indique lo contrario

## Materiales y Métodos

en el texto, los gráficos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* corresponden a resultados representativos de ensayos independientes (el número de réplicas se indica en la leyenda de cada gráfico).

### Control de calidad de los datos de genómica

Tanto el control de calidad de los datos obtenidos como el análisis ulterior de los mismos fueron realizados en estrecha colaboración con los Drs. Ariel Chernomoretz y Mariano Alvarez (Gentron Inc., Buenos Aires, Argentina).

Los datos crudos obtenidos a partir del escaneado de los microarreglos de ADN fue sometido a un procedimiento de control de calidad utilizando como soporte los paquetes informaticos del repositorio Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) desarrollada para la plataforma de analisis estadístico R (R Development Core Team, 2005). En particular los siguientes paquetes fueron utilizados: “affyQCReport”, “affy” y “simpleaffy” (Wilson and Miller, 2005). El procedimiento empleado incluyó:

- (1) El análisis de curvas de intensidad de sondas para detectar niveles inusuales de ruido de fondo y que las distribuciones de los distintos microchips fueran cualitativamente similares
- (2) Determinación del nivel medio de ruido, factores de “escaleo”, proporción de genes detectados como “presentes”, cociente entre intensidad de sondas 3' respecto a 5' para sondas control incluidas en el chip (GAPDH y  $\beta$ -actina)
- (3) Calidad de RNA medida a partir de la relación entre la señal de sondas localizadas hacia el extremo 3' respecto de las sondas 5'
- (4) Análisis de pseudoimágenes generadas a partir de modelos de regresión lineal de la señal de las sondas, tendiente a identificar regiones de la microchips con alto número de valores atípicos o *outliers* (la correlación espacial de regiones *outliers* delata, por ejemplo, la presencia de problemas en el baño de hibridización)
- (5) Análisis de gráficos de señal diferencial vs señal media para estimaciones intra-grupos, tendiente a detectar muestras individuales que se aparten global y significativamente del comportamiento medio del grupo al que pertenece.

### Generación de las listas de genes diferenciales

La estimación de los perfiles de expresión a partir de las microchips de ADN fue llevada a cabo utilizando, una vez más, la biblioteca de paquetes informaticos disponible en el repositorio Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) desarrollada para la plataforma de analisis estadístico R (R Development Core Team, 2005). En particular, el algoritmo utilizado para transformar las intensidades registradas en el arreglo en niveles de

## Materiales y Métodos

expresión génica fue el conocido como *Robust Multiarray Average* (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003a; Irizarry *et al.*, 2003b), implementado en el paquete “affy” del repositorio Bioconductor.

Utilizando los valores obtenidos por RMA se procedió al proceso de “prefiltrado no específico” de manera de desechar genes presumiblemente no informativos, antes de realizar cualquier análisis estadístico ulterior. El objetivo principal de esta etapa es el de disminuir la aparición de falsos positivos, es decir, mejorar lo que se conoce como problema de testeo de múltiples hipótesis. En la práctica, se trabajó con tres criterios de selección.

- (A) Aquellos genes que no presentasen una intensidad superior a  $\log_2(40)$  en al menos 20 % de las muestras fueron descartados
- (B) Si la variabilidad registrada entre todos los chips, era inferior a un valor mínimo preestablecido, el gen correspondiente también era descartado
- (C) El tercer criterio adoptado fue el de desechar *a priori*, aquellas sondas que por su diseño presentan problemas de especificidad de hibridación

Una vez llevado a cabo el prefiltrado, la identificación de genes potencialmente modulados se realizó considerando el método implementado en el paquete “limma” (Smyth and Speed, 2003) del repositorio Bioconductor. De acuerdo a la mecánica de este paquete informático, se utiliza una variante del método de Bayes llamado “semi-empírico” para obtener una estimación moderada de la variabilidad específica de un gen, con la cual se computa un estadístico del tipo test de Student, y con lo que se calcula un valor de  $p$  asociado al rechazo de la hipótesis nula para cada gen. La ventaja de este enfoque es que la estimación de la variabilidad resulta mucho más robusta (menos falsos positivos finales), lo que sin duda es gravitante para experimentos con bajo número de réplicas.

Las listas de genes diferenciales se ajustaron por el método que se conoce como *false discovery rate* (FDR) o corrección asociada al testeo de múltiples hipótesis, de manera de lograr un porcentaje adecuado de falsos positivos (Benjamini *et al.*, 2001). Finalmente se aplicó un último filtro a los transcritos seleccionados de manera de reportar cambios de expresión superiores al 30 %. De todas maneras este último criterio dependió del ensayo realizado por lo que en el caso de presentar una modificación será aclarado en la misma sección de resultados.

# Referencias Bibliográficas

- Adams JC, Schwartz MA (2000) Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *The Journal of Cell Biology* 150:807-822.
- Adams JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183-1198.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Aeschlimann D, Kaupp O, Paulsson M (1995) Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *The Journal of Cell Biology* 129:881-892.
- Aeschlimann D, Wetterwald A, Fleisch H, Paulsson M (1993) Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *The Journal of Cell Biology* 120:1461-1470.
- Alam J, Cook JL (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188:245-254.
- Alliel PM, Perin JP, Jolles P, Bonnet FJ (1993) Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *European Journal of Biochemistry* 214:347-350.
- Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, *et al.* (2005) Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res* 65:5123-5132.
- Angers-Loustau A, Côté J-F, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, *et al.* (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 144:1019-1031.
- Ashburner M, Golic K, Hawley S *Drosophila: A Laboratory Handbook (Second Edition)*: New York, 2005.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JJ, Mizel DE, *et al.* (1999) Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology* 1:260-266.
- Bassuk J, Iruela-Arispe L, Lane T, Benson JM, Berg RA, Sage EH (1993) Molecular analysis of chicken embryo SPARC. *European Journal of Biochemistry* 218:117-127.
- Bassuk JA, Baneyx F, Vernon RB, Funk SE, Sage EH (1996a) Expression of biologically active human SPARC in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 325:8-19.
- Bassuk JA, Birkebak T, Rothmier JD, Clark JM, Brandshaw A, Muchowski PJ, *et al.* (1999) Disruption of the Sparc locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Experimental Eye Research* 68:321-331.
- Bassuk JA, Braun LP, Motamed K, Baneyx F, Sage EH (1996b) Renaturation of SPARC expressed in *Escherichia coli* requires isomerization of disulfide bonds for recovery of biological activity. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1031-1043.
- Bassuk JA, Pichler R, Rothmier JD, Pippen J, Gordon K, Meek RL, *et al.* (2000) Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney International* 57:117-128.
- Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC (2001) Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biology* 2.
- Basu A, Rodeck U, Prendergast GC, Howe CC (1999) Loss of insulin-like growth factor I receptor-dependent expression of p107 and cyclin A in cells that lack the extracellular matrix protein secreted protein acidic and rich in cysteine. *Cell Growth Differ* 10:721-728.
- Beck K-F, Walpen S, Eberhardt W, Pfeilschifter J (2001) Downregulation of integrin-linked kinase mRNA expression by nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Life Sciences* 69:2945-2955.
- Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, Stein HJ, Hannah JL, *et al.* (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427:117-120.

## Referencias Bibliográficas

- Bellahcene A, Castronovo V (1995) Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 146:95-100.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125:279-284.
- Bilder D, Li M, Perrimon N (2000) Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors. *Science* 289:113-116.
- Bloor JW, Kiehart DP (2002) Drosophila RhoA regulates the cytoskeleton and cell-cell adhesion in the developing epidermis. *Development* 129:3173-3183.
- Boivin GP, O'Toole BA, Orsmy IE, Diebold RJ, Eis MJ, Doetschman T, *et al.* (1995) Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice. *American Journal of Pathology* 146:276-288.
- Bonnet F, Perin JP, Charbonnier F, Camuzat A, Roussel G, Nussbaum JL, *et al.* (1996) Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271:4373-4380.
- Bornstein P (1995) Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of Cell Biology* 130:503-506.
- Bornstein P, Sage EH (1994) Thrombospondins. *Methods in Enzymology* 245:62-85.
- Bos TJ, Cohn SL, Kleinman HK, Murphy-Ulrich JE, Podhajcer OL, Rempel SA, *et al.* (2004) International Hermelin brain tumor symposium on matricellular proteins in normal and cancer cell-matrix interactions. *Matrix Biol* 23:63-69.
- Bradshaw AD, Bassuk JA, Francki A, Sage EH (2000) Expression and purification of recombinant human SPARC produced by baculovirus. *Molecular and Cellular Biology Research Communications* 3:345-351.
- Bradshaw AD, Francki A, Motamed K, Howe C, Sage EH (1999) Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Molecular Biology of the Cell* 10:1569-1579.
- Bradshaw AD, Graves DC, Motamed K, Sage EH (2003) SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6045-6050.
- Bradshaw AD, Reed MJ, Carbon JG, Pinney E, Brekken RA, Sage EH (2001) Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair Regen* 9:522-530.
- Bradshaw AD, Reed MJ, Sage EH (2002) SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50:1-10.
- Bradshaw AD, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *The Journal of Clinical Investigation* 107:1049-1054.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH (2003) Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 111:487-495.
- Brekken RA, Sage EH (2000) SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biology* 19:569-580.
- Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ (2002) Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 21:7077-7091.
- Brown NH, Gregory SL, Martin-Bermudo MD (2000) Integrins as mediators of morphogenesis in Drosophila. *Dev Biol* 223:1-16.
- Bunch TA, Graner MW, Fessler LI, Fessler JH, Schneider KD, Kerschen A, *et al.* (1998) The PS2 integrin ligand tigrin is required for proper muscle function in Drosophila. *Development* 125:1679-1689.
- Burke RD (1999) Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol* 191:257-284.
- Butler MJ, Jacobsen TL, Cain DM, Jarman MG, Hubank M, Whittle JR, *et al.* (2003) Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the Drosophila wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* 130:659-670.
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, 2nd Edition edn: Germany, 1997.

## Referencias Bibliográficas

- Casado FJ, Poupponnot C, Jeanny JC, Lecoq O, Calothy G, Pierani A (1996) QRI, a retina-specific gene, encodes an extracellular matrix protein exclusively expressed during neural retina differentiation. *Mech Dev* 54:237-250.
- Chandrasekaran L, He C-Z, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD (2000) Cell contact-dependent activation of  $\alpha 3\beta 1$  integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Molecular Biology of the Cell* 11:2885-2900.
- Chandrasekhar S, Harvey AK, Johnson MG, Becker GW (1994) Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1221:7-14.
- Chasan R, Jin Y, Anderson KV (1992) Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. *Development* 115:607-616.
- Chavey C, Boucher J, Monthouel-Kartmann M-N, Sage EH, Castan-Laurell I, Valet P, *et al.* (2006) Regulation of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine during Adipose Conversion and Adipose Tissue Hyperplasia. *Obesity* 14:1890-1897.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47:131-139.
- Chlenski A, Liu S, Crawford SE, Volpert OV, DeVries GH, Evangelista A, *et al.* (2002) SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62:7357-7363.
- Chlenski A, Liu S, Guerrero LJ, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, *et al.* (2006) SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. *Int J Cancer* 118:310-316.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- Chung CY, Erickson HP (1997) Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C. *Journal of Cell Science* 110:1413-1419.
- Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Molecular Biology of the Cell* 7:883-892.
- Claeskens A, Ongenaes N, Neefs JM, Cheyns P, Kaijen P, Cools M, *et al.* (2000) Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation. *British Journal of Cancer* 82:1123-1130.
- Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO (1998) Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family of GTPases. *The Journal of Cell Biology* 142:573-586.
- Cleek RL, Rege AA, Denner LA, Eskin SG, Mikos AG (1997) Inhibition of smooth muscle cell growth in vitro by an antisense oligodeoxynucleotide released from poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles. *J Biomed Mater Res* 35:525-530.
- Clezardin P, Malaval L, Ehrensperger AS, Delmas PD, Dechavanne M, McGregor JL (1988) Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. *European Journal of Biochemistry* 175:275-284.
- Colognato H, Winkelmann DA, Yurchenco PD (1999) Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *The Journal of Cell Biology* 145:619-631.
- Consortium (2003) The FlyBase database of the Drosophila genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* 31:172-175.
- Consortium, Sequencing TCE (1998) Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282:2012-2018.
- Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M (2000) Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *The Journal of Clinical Investigation* 105:21-34.
- Cox RT, McEwen DG, Myster DL, Duronio RJ, Loureiro J, Peifer M (2000) A screen for mutations that suppress the phenotype of Drosophila armadillo, the beta-catenin homolog. *Genetics* 155:1725-1740.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J, Hynes RO, *et al.* (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta 1$  in vivo. *Cell* 93:1159-1170.
- Crossin KL (1991) Cytotactin binding: inhibition of stimulated proliferation and intracellular alkalinization in fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88:11403-11407.

## Referencias Bibliográficas

- Damjanovski S, Huynh MH, Motamed K, Sage EH, Ringuette M (1998) Regulation of SPARC expression during early *Xenopus* development: evolutionary divergence and conservation of DNA regulatory elements between amphibians and mammals. *Development Genes and Evolution* 207:453-461.
- Damjanovski S, Karp X, Funk S, Sage EH, Ringuette MJ (1997) Ectopic expression of SPARC in *Xenopus* embryos interferes with tissue morphogenesis: identification of a bioactive sequence in the C-terminal EF hand. *J Histochem Cytochem* 45:643-655.
- Damjanovski S, Liu F, Ringuette M (1992) Molecular analysis of *Xenopus laevis* SPARC (secreted protein, acidic, rich in cysteine). A highly conserved acidic calcium-binding extracellular-matrix protein. *Biochemical Journal* 281:513-517.
- de Castro F (2003) Chemotropic Molecules: Guides for Axonal Pathfinding and Cell Migration During CNS Development. *News Physiol Sci* 18:130-136.
- De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, Ensslen M, Raynaud P, Requirand G, et al. (2002) Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* 21:6848-6857.
- Delany AM, Canalis E (1998) Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. *American Journal of Physiology* 274:C734-C740.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Dequier E, Souid S, Pal M, Maroy P, Lepesant JA, Yanicostas C (2001) Top-DER- and Dpp-dependent requirements for the *Drosophila* fos/kayak gene in follicular epithelium morphogenesis. *Mech Dev* 106:47-60.
- Desbordes SC, Sanson B (2003) The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* 130:6245-6255.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, et al. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151-156.
- DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, Koch AE, Pyle JM, Polverini PJ (1996) Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *American Journal of Pathology* 148:1851-1860.
- Dominguez P, Ibaraki K, Gehron Robey P, Hefferan TE, Termine JD, Young MF (1991) The expression of the osteonectin gene is potentially controlled by multiple cis and trans acting factors in cultured bone cells. *Journal of Bone Mineralization Research* 6:1127-1136.
- Drysdale RA, Crosby MA (2005) FlyBase: genes and gene models. *Nucleic Acids Res* 33:D390-395.
- Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650-1659.
- Edman P (1960) Phenylthiohydantoins in protein analysis. *Ann N Y Acad Sci* 88:602-610.
- Engel J, Taylor W, Paulsson M, Sage H, Hogan B (1987) Calcium-binding domains and calcium-induced transition in SPARC (osteonectin/BM40), an extracellular glycoprotein expressed in mineralized bone and nonmineralized tissues. *Biochemistry* 26:6958-6965.
- Fauny JD, Silber J, Zider A (2005) *Drosophila* Lipid Storage Droplet 2 gene (*Lsd-2*) is expressed and controls lipid storage in wing imaginal discs. *Dev Dyn* 232:725-732.
- Fields S, Song O-k (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Findlay DM, Fisher LW, McQuillan CI, Termine JD, Young MF (1988) Isolation of the osteonectin gene: evidence that a variable region of the osteonectin molecule is encoded within one exon. *Biochemistry* 27:1483-1489.
- Fink AL (2005) Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 15:35-41.
- Fischer D, Brown-Ludi M, Schulthess T, Chiquet-Ehrismann R (1997) Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. *Journal of Cell Science* 110:1513-1522.
- Fitzgerald MC, Schwarzbauer JE (1998) Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 8:1285-1288.
- Fogerty FJ, Fessler LI, Bunch TA, Yaron Y, Parker CG, Nelson RE, et al. (1994) Tiggrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* 120:1747-1758.
- Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-18.

## Referencias Bibliográficas

- Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailleur M, Reinhardt D, Wiedemann H, *et al.* (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO Journal* 10:3137-3146.
- Framson PE, Sage EH (2004) SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 92:679-690.
- Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH (1999) SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274:32145-32152.
- Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, *et al.* (2004) SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91:915-925.
- Francki A, Motamed K, McClure TD, Kaya M, Murri C, Blake DJ, *et al.* (2003) SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J Cell Biochem* 88:802-811.
- Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 124:619-626.
- Frisch SM, Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology* 9:701-706.
- Funk SE, Sage EH (1991) The Ca<sup>2+</sup>-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88:2648-2652.
- Funk SE, Sage EH (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 154:53-63.
- Furlong EE, Andersen EC, Null B, White KP, Scott MP (2001) Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development. *Science* 293:1629-1633.
- Garczynski SF, Brown MR, Shen P, Murray TF, Crim JW (2002) Characterization of a functional neuropeptide F receptor from Drosophila melanogaster. *Peptides* 23:773-780.
- Garozzo M, Christensen A (1994) Drosophila Information Service. 75:204-205.
- Geneser F *Histología, 2da. ed.* Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 1993.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, *et al.* (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5:R80.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
- Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart J-M, Thompson EW (1998) SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 58:5529-5536.
- Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, *et al.* (1998) Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO Journal* 17:1860-1870.
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, *et al.* (2003) A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science* 302:1727-1736.
- Girard J-P, Springer TA (1995) Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* 2:113-123.
- Gohring W, Sasaki T, Heldin CH, Timpl R (1998) Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *European Journal of Biochemistry* 255:60-66.
- Goicoechea S, Pallero MA, Eggleton P, Michalak M, Murphy-Ullrich JE (2002) The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry* 277:37219-37228.
- Golembieski WA, Ge S, Nelson K, Mikkelsen T, Rempel SA (1999) Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 17:463-472.
- Gooden MD, Vernon RB, Bassuk JA, Sage EH (1999) Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *Journal of Cellular Biochemistry* 74:152-167.
- Gotwals PJ, Paine-Saunders SE, Stark KA, Hynes RO (1994) Drosophila integrins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 6:734-739.
- Gradishar WJ (2006) Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 7:1041-1053.

## Referencias Bibliográficas

- Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, *et al.* (2003) Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)* 39:787-800.
- Greenspan R *Fly Pushing: The theory and Practice of Drosophila Genetics*: New York, 1997.
- Greenwood JA, Murphy-Ullrich JE (1998) Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microscopy Research and Technique* 43:420-432.
- Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S (2001) Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 35:367-375.
- Grinnell F, Ho CH, Wysocki A (1992) Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: Analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *Journal of Investigative Dermatology* 98:410-416.
- Grobstein C (1953) Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* 172:869-870.
- Grose R, Martin P (1999) Parallels between wound repair and morphogenesis in the embryo. *Semin Cell Dev Biol* 10:395-404.
- Gross J, Highberger JH, Schmitt FO (1954) Collagen Structures Considered as States of Aggregation of a Kinetic Unit. The Tropicollagen Particle. *PNAS* 40:679-688.
- Guermah M, Crisanti P, Laugier D, Dezelee P, Bidou L, Pessac B, *et al.* (1991) Transcription of a quail gene expressed in embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88:4503-4507.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Halsell SR, Chu BI, Kiehart DP (2000) Genetic analysis demonstrates a direct link between rho signaling and nonmuscle myosin function during drosophila morphogenesis. *Genetics* 156:469.
- Hamburger AW, Salmon SE (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197:461-463.
- Harden N (2002) Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation* 70:181-203.
- Hartenstein V *Atlas of Drosophila Development*: New York, 1993.
- Hasselaar P, Sage EH (1992) SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 49:272-283.
- Hauschka, Konigsberg (1966) The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc Natl Acad Sci* 55:119-126.
- Hay ED (1973) Origin and Role of Collagen in the Embryo. *Amer Zool* 13:1085-1107.
- Hirt B (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26:365-369.
- Hohenadl C, Mann K, Mayer U, Timpl R, Paulsson M, Aeschlimann D (1995) Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification. *The Journal of Biological Chemistry* 270:23415-23420.
- Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN, Engel J (1996) Structure of a novel extracellular Ca<sup>2+</sup>-binding module in BM-40. *Nature Structural Biology* 3:67-73.
- Hohenester E, Maurer P, Timpl R (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO Journal* 16:3778-3786.
- Holland PW, Harper SJ, McVey JH, Hogan BL (1987) In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>2+</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *The Journal of Cell Biology* 105:473-482.
- Hortsch M, Olson A, Fishman S, Soneral SN, Marikar Y, Dong R, *et al.* (1998) The expression of MDP-1, a component of *Drosophila* embryonic basement membranes, is modulated by apoptotic cell death. *Int J Dev Biol* 42:33-42.
- Howe CC, Kath R, Mancianti ML, Herlyn M, Mueller S, Cristofalo V (1990) Expression and structure of human SPARC transcripts: SPARC mRNA in expressed by human cells involved in extracellular matrix production and some of these cells show an unusual expression pattern. *Experimental Cell Research* 188:185-191.
- Huttenlocher A, Sandborg RB, Horwitz AF (1995) Adhesion in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* 7:697-706.
- Hutter H, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, *et al.* (2000) Conservation and Novelty in the Evolution of Cell Adhesion and Extracellular Matrix Genes. *Science* 287:989-994.
- Hutton L, K. O *Deficiency mapping of genes in Drosophila using single-embryo PCR*, 1999.

## Referencias Bibliográficas

- Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Hynes RO, Zhao Q (2000) The evolution of cell adhesion. *The Journal of Cell Biology* 150:F89-F95.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003a) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research* 31:e15.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, *et al.* (2003b) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249-264.
- Iruela-Arispe ML, Liska DJ, Sage EH, Bornstein P (1993) Differential expression of thrombospondin 1, 2 y 3 during murine development. *Developmental Dynamics* 197:40-56.
- Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD (1999) Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100:1423-1431.
- Iruela-Arispe ML, Vernon RB, Wu H, Jaenisch R, Sage EH (1996) Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function. *Dev Dyn* 207:171-183.
- Iruela Arispe ML, Lane TF, Redmond D, Reilly M, Bolender RP, Kavanagh TJ, *et al.* (1995) Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*. *Molecular Biology of the Cell* 6:327-343.
- Jendraschak E, Sage EH (1996) Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology. *Seminars in Cancer Biology* 7:139-146.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW (2006) Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491-511.
- Jiggins FM, Kim K-W (2005) The Evolution of Antifungal Peptides in *Drosophila*. *Genetics* 171:1847-1859.
- Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N (2000) Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature Medicine* 6:41-48.
- Johnston IG, Paladino T, Gurd JW, Brown IR (1990) Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* 4:165-176.
- Johnston IM, Spence HJ, Winnie JN, McGarry L, Vass JK, Meagher L, *et al.* (2000) Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene* 19:5348-5358.
- Jones FS, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM (1989) A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86:1905-1909.
- Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics* 218:235-259.
- Kamihagi K, Katayama M, Ouchi R, Kato I (1994) Osteonectin/SPARC regulates cellular secretion rates of fibronectin and laminin extracellular matrix proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200:423-428.
- Kantorow M, Huang Q, Yang X-J, Sage EH, Magabo KS, Miller KM, *et al.* (2000) Increased expression of osteonectin/SPARC mRNA and protein in age-related human cataracts and spatial expression in the normal human lens. *Molecular Vision* 6:24-29.
- Katabami M, Donninger H, Hommura F, Leaner VD, Kinoshita I, Chick JFB, *et al.* (2005) Cyclin A Is a c-Jun Target Gene and Is Necessary for c-Jun-induced Anchorage-independent Growth in RAT1a Cells. *J Biol Chem* 280:16728-16738.
- Kato Y, Frankenne F, Noel A, Sakai N, Nagashima Y, Koshika S, *et al.* (2000) High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol Oncol Res* 6:24-26.
- Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sakai N, Baba M, *et al.* (2001) Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287:422-426.
- Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, Hartmann U, Paulsson M, Maurer P, *et al.* (2004) Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* 14:609-619.
- Kelm RJ, Jr., Hair GA, Mann KG, Grant BW (1992a) Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC). *Blood* 80:3112-3119.
- Kelm RJ, Jr., Mann KG (1991) The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J Biol Chem* 266:9632-9639.

## Referencias Bibliográficas

- Kelm RJJ, Hair GA, Mann KG, Grant BW (1992b) Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC). *Blood* 80:3112-3119.
- Kennerdell JR, Carthew RW (2000) Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18:896-898.
- Kiehart DP (1999) Wound healing: The power of the purse string. *Curr Biol* 9:R602-605.
- Kiehart DP, Galbraith CG, Edwards KA, Rickoll WL, Montague RA (2000) Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in Drosophila. *J Cell Biol* 149:471-490.
- Kimura M, Okano Y (2007) Human Misato regulates mitochondrial distribution and morphology. *Exp Cell Res* 313:1393-1404.
- Klingensmith J, Nusse R (1994) Signaling by wingless in Drosophila. *Dev Biol* 166:396-414.
- Koblinski JE, Kaplan-Singer BR, VanOsdol SJ, Wu M, Engbring JA, Wang S, et al. (2005) Endogenous Osteonectin/SPARC/BM-40 Expression Inhibits MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Metastasis. *Cancer Res* 65:7370-7377.
- Kost C, Stueber W, Ehrlich HJ, Pannekoek H, Preissner KT (1992) Mapping of binding sites for heparin, plasminogen activator inhibitor-1, and plasminogen to vitronectin's heparin-binding region reveals a novel vitronectin-dependent feedback mechanism for the control of plasmin formation. *The Journal of Biological Chemistry* 267:12098-12105.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, et al. (2003) Enhanced Expression of SPARC/Osteonectin in the Tumor-associated Stroma of Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Markers of Hypoxia/ Acidity and with Poor Prognosis of Patients. *Cancer Res* 63:5376-5380.
- Kraemer M, Tournaire R, Dejong V, Montreau N, Briane D, Derbin C, et al. (1999) Rat embryo fibroblasts transformed by c-Jun display highly metastatic and angiogenic activities in vivo and deregulate gene expression of both angiogenic and antiangiogenic factors. *Cell Growth Differ* 10:193-200.
- Krushel LA, Prieto AL, Edelman GM, Crossin KL (1994) Differential effects of cytotactin/tenascin fusion proteins on intracellular pH and cell morphology. *Journal of Cellular Physiology* 161:508-518.
- Kudo H, Hirayoshi K, Kitagawa Y, Imamura S, Nagata K (1994) Two collagen-binding proteins, osteonectin and HSP47, are coordinately induced in transformed keratinocytes by heat and other stresses. *Experimental Cell Research* 212:219-224.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. (1993) Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90:770-774.
- Kupprion C, Motamed K, Sage EH (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.
- Kurman M, Argyris TS (1975) The proliferative response to epidermis of hairless mice to full thickness wounds. *Am J Pathol* 79:301-310.
- Kyriakides TR, Bornstein P (2003) Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 90:986-992.
- Kyriakides TR, Tam JW, Bornstein P (1999) Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *Journal of Investigative Dermatology* 113:782-787.
- Kyriakides TR, Zhu Y-H, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, et al. (1998) Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, and increased vascular density, and a bleeding diathesis. *The Journal of Cell Biology* 140:419-430.
- Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH (1994) SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *The Journal of Cell Biology* 125:929-943.
- Lane TF, Sage EH (1990) Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca<sup>++</sup>-binding sites modulate cell shape. *The Journal of Cell Biology* 111:3065-3076.
- Lane TF, Sage EH (1994) The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB Journal* 8:163-173.
- Lawler J (2000) The functions of thrombospondin-1 and -2. *Current Opinion in Cell Biology* 12:634-640.
- Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, et al. (1998) Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *The Journal of Clinical Investigation* 101:982-992.

## Referencias Bibliográficas

- Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, Chernajovsky Y, *et al.* (1997a) Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Medicine* 3:171-175.
- Ledda MF, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL (1997b) The expression on the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 108:210-214.
- Lee SB, Cho KS, Kim E, Chung J (2003) *blistery* encodes Drosophila tensin protein and interacts with integrin and the JNK signaling pathway during wing development. *Development* 130:4001-4010.
- Lev S, Hernandez J, Martinez R, Chen A, Plowman G, Schlessinger J (1999) Identification of a novel family of targets of PYK2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein. *Mol Cell Biol* 19:2278-2288.
- Lieber A, He CY, Kirillova I, Kay MA (1996) Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. *J Virol* 70:8944-8960.
- Liotta LA (1986) Tumor Invasion and Metastases--Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46:1-7.
- Litvak V, Tian D, Carmon S, Lev S (2002) Nir2, a human homolog of Drosophila melanogaster retinal degeneration B protein, is essential for cytokinesis. *Mol Cell Biol* 22:5064-5075.
- Liu BP, Burridge K (2000) Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not b1 integrins. *Molecular and Cellular Biology* 20:7160-7169.
- Lochmuller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, *et al.* (1994) Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5:1485-1491.
- López Haber C, Gottifredi V, Llera AS, Salvatierra E, Prada F, Alonso L, *et al.* (2007) SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *International Journal of Cancer* In press.
- Maillard C, Malaval L, Delmas PD (1992) Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* 13:257-264.
- Maizel JV, Jr., White DO, Scharff MD (1968) The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36:115-125.
- Mann K, Deutzmann R, Pausson M, Timpl R (1987) Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Letters* 218:167-172.
- Marr HS, Basalamah MA, Bouldin TW, Duncan AW, Edgell CJ (2000) Distribution of testican expression in human brain. *Cell and Tissue Research* 302:139-144.
- Marr HS, Basalamah MA, Edgell CJ (1997) Endothelial cell expression of testican mRNA. *Endothelium* 5:209-219.
- Martin-Bermudo MD, Brown NH (2000) The localized assembly of extracellular matrix integrin ligands requires cell-cell contact. *J Cell Sci* 113 Pt 21:3715-3723.
- Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM, *et al.* (1998) *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. *Genes Dev* 12:557-570.
- Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81.
- Martinek N, Zou R, Berg M, Sodek J, Ringuette M (2002) Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in Drosophila. *Development Genes and Evolution* 212:124-133.
- Mashimo J, Maniwa R, Sugino H, Nose K (1997) Decrease in the expression of a novel TGF beta1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells. *Cancer Letters* 113:213-219.
- Mason IJ, Murphy D, Munke M, Francke U, Elliott RW, hogan BLM (1986a) Developmental and transformation-sensitive expression of SPARC gene on mouse chromosome 11. *EMBO Journal* 5:1831-1837.
- Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BLM (1986b) Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein. *EMBO Journal* 5:1465-1472.

## Referencias Bibliográficas

- Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Gohring W, Timpl R, Engel J (1995) The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domains that binds calcium and collagen IV. *Journal of Molecular Biology* 253:347-357.
- Maurer P, Mayer U, Bruch M, Jenö P, Mann K, Landwehr R, *et al.* (1992) High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *European Journal of Biochemistry* 205:233-240.
- Maurer P, Sasaki T, Mann K, Gohring W, Schwarzbauer JE, Timpl R (1997) Structural and functional characterization of the extracellular calcium-binding protein BM-40/secreted protein, acidic, rich in cysteine/osteonectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry* 248:209-216.
- Mayer U, Aumailley M, Mann K, Timpl R, Engel J (1991) Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *European Journal of Biochemistry* 198:141-150.
- Mayer U, Zimmermann K, Mann K, Reinhardt D, Timpl R, Nischt R (1995) Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *European Journal of Biochemistry* 227:681-686.
- McEwen DG, Cox RT, Peifer M (2000) The canonical Wg and JNK signaling cascades collaborate to promote both dorsal closure and ventral patterning. *Development* 127:3607-3617.
- McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-442.
- McKinnon PJ, Margolske RF (1996) SC1: a marker for astrocytes in the adult rodent brain is upregulated during reactive astrogliosis. *Brain Research* 709:27-36.
- McLaughlin F, Ludbrook VJ, Cox J, von Carlowitz I, Brown S, Randi AM (2001) Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood* 98:3332-3339.
- McVey JH, Nomura S, Kelly P, Mason IJ, Hogan BL (1988) Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *The Journal of Biological Chemistry* 263:11111-11116.
- Meredith JE, Jr, Fazeli B, Schwartz MA (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular Biology of the Cell* 4:953-961.
- Miklos GL, Yamamoto M, Burns RG, Maleszka R (1997) An essential cell division gene of *Drosophila*, absent from *Saccharomyces*, encodes an unusual protein with tubulin-like and myosin-like peptide motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5189-5194.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, *et al.* (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436:518-524.
- Misquitta L, Paterson BM (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1451-1456.
- Morel V, Arias AM (2004) Armadillo/beta-catenin-dependent Wnt signalling is required for the polarisation of epidermal cells during dorsal closure in *Drosophila*. *Development* 131:3273-3283.
- Motamed K (1999) SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol* 31:1363-1366.
- Motamed K, Blake D, Angello J, Allen B, Rapraeger A, Hauschka S, *et al.* (2003) Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: A role for protein kinase A. *J Cell Biochem* 90:408-423.
- Motamed K, Funk SE, Koyama H, Ross R, Raines EW, Sage EH (2002) Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry* 84:759-771.
- Motomu Shimizu TY, Mayumi Sato, Junji Morimoto, Akio Matsuzawa, Yasutaka Takeda (2005) Roles of CXC chemokines and macrophages in the recruitment of inflammatory cells and tumor rejection induced by Fas/Apo-1 (CD95) ligand-expressing tumor. *International Journal of Cancer* 114:926-935.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004) Friends or foes - Bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:839-849.
- Mundlos S, Schwahn B, Reichert T, Zabel B (1992) Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:283-291.
- Murphy-Ullrich JE (2001) The de-adhesion activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The Journal of Clinical Investigation* 107:785-790.

## Referencias Bibliográficas

- Murphy-Ullrich JE, Elzie CA, Sweetwyne M (2006) Signaling of intermediate cell adhesion: role in tissue remodeling. *FASEB J* 20:A1335-a-.
- Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Höök M (1993) Heparin-binding peptides from thrombospondin 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *The Journal of Biological Chemistry* 268:26784-26789.
- Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, Sage EH (1995) SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca<sup>2+</sup> binding EF-hand. *Journal of Cellular Biochemistry* 57:341-350.
- Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M (1991) Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *The Journal of Cell Biology* 115:1127-1136.
- Murphy-Ullrich JE, Poczatek M (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11:59-69.
- Murray MA, Fessler LI, Palka J (1995) Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 168:150-165.
- Nakada M, Yamada A, Takino T, Miyamori H, Takahashi T, Yamashita J, *et al.* (2001) Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Research* 61:8896-8902.
- Nakamura S, Kamihagi K, Satakeda H, Katayama M, Pan H, Okamoto H, *et al.* (1996) Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis & Rheumatism* 39:539-551.
- Neri M, Descalzi-Cancedda F, Cancedda R (1992) Heat-shock response in cultured chick embryo chondrocytes. Osteonectin is a secreted heat-shock protein. *European Journal of Biochemistry* 205:569-574.
- Ng KW, Manji SS, Young MF, Findlay DM (1989) Oposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control of pre-osteoblasts. *Molecular Endocrinology* 3:2079-2085.
- Nischt R, Pottgiesser J, Krieg T, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1991) Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *European Journal of Biochemistry* 200:529-536.
- Nomura S, Hashmi S, McVey JH, Parker M, Hogan BLM (1989a) Evidence for positive and negative regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the mouse SPARC (osteonectin) gene. *The Journal of Biological Chemistry* 264:12201-12207.
- Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BL (1989b) Expression of genes for non-collagenous proteins during embryonic bone formation. *Connect Tissue Res* 21:31-35; discussion 36-39.
- Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BLM (1988) Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *The Journal of Cell Biology* 106:441-450.
- Noselli S, Agnes F (1999) Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9:466-472.
- Nozaki M, Sakurai E, Raisler BJ, Baffi JZ, Witta J, Ogura Y, *et al.* (2006) Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A  
10.1172/JCI26316. *J Clin Invest* 116:422-429.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801.
- Otsuka K, Yao KL, Wasi S, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, *et al.* (1984) Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 259:9805-9812.
- Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H (1995) Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 181:435-440.
- Peppel K, Crawford D, Beutler B (1991) A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *J Exp Med* 174:1483-1489.
- Phan E, Ahluwalia A, Tarnawski AS (2007) Role of SPARC--matricellular protein in pathophysiology and tissue injury healing. Implications for gastritis and gastric ulcers. *Med Sci Monit* 13:RA25-30.

## Referencias Bibliográficas

- Pichler RH, Bassuk JA, Hugo C, Reed MJ, Eng E, Gordon KL, *et al.* (1996) SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *American Journal of Pathology* 148:1153-1167.
- Pihlajaniemi T, Rehn M (1995) Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50:225-262.
- Podhajcer OL, Wolf C, Lefebvre O, Segain JP, Rouyer N, Stoll I, *et al.* (1996) Comparative expression of the SPARC and stromelysin-3 genes in mammary tumors. *The Breast* 5:13-20.
- Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, *et al.* (1995) Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *International Journal of Cancer* 64:70-75.
- Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM (1995) Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43:791-800.
- Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Mann K, Timpl R, *et al.* (1994) Changes in calcium and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin). *Journal of Molecular Biology* 234:563-574.
- Prada F, Benedetti LG, Bravo AI, Alvarez MJ, Carbone C, Podhajcer OL (2007) SPARC Endogenous Level, rather than Fibroblast-Produced SPARC or Stroma Reorganization Induced by SPARC, Is Responsible for Melanoma Cell Growth. *J Invest Dermatol*.
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular Biology of the Cell* 9:1863-1871.
- Prieto AL, Andersson-Fisone C, Crossin KL (1992) Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytotactin. *The Journal of Cell Biology* 119:663-678.
- Puolakkainen PA, Bradshaw AD, Brekken RA, Reed MJ, Kyriakides T, Funk SE, *et al.* (2005) SPARC-thrombospondin-2-double-null mice exhibit enhanced cutaneous wound healing and increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges. *J Histochem Cytochem* 53:571-581.
- Puolakkainen PA, Brekken RA, Muneer S, Sage EH (2004) Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Mol Cancer Res* 2:215-224.
- R Development Core Team (2005) R: A language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
- Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, 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 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:1281-1285.
- Ramirez F, Rifkin DB (2003) Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 22:101-107.
- Rayburn LY, Gooding HC, Choksi SP, Maloney D, Kidd AR, 3rd, Siekhaus DE, *et al.* (2003) *amontillado*, the *Drosophila* homolog of the prohormone processing protease PC2, is required during embryogenesis and early larval development. *Genetics* 163:227-237.
- Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
- Reed MJ, Puolakkainen PA, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH (1993) Expression of SPARC and thrombospondin-1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41:1467-1477.
- Reed MJ, Sage EH (1996) SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 213:81-94.
- Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH (1994) TGF- $\beta$  1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *Journal of Cellular Physiology* 158:169-179.
- Rempel SA, Ge S, Gutierrez JA (1999) SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 5:237-241.
- Rempel SA, Golembieski WA, Fisher JL, Maile M, Nakeff A (2001) SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *Journal of Neurooncology* 53:149-160.
- Rempel SA, Golembieski WA, Ge S, Lemke N, Elisevich K, Mikkelsen T, *et al.* (1998) SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57:1112-1121.

## Referencias Bibliográficas

- Revah F, Horellou P, Vigne E, Le Gal La Salle G, Robert JJ, Perricaudet M, *et al.* (1996) Gene transfer into the central and peripheral nervous system using adenoviral vectors. In: *Protocols for gene transfer in neuroscience: Towards gene therapy of neurological disorders* (Lowenstein PR, Enquist LW, eds): John Wiley & Sons, 81-92.
- Ribeiro C, Petit V, Affolter M (2003) Signaling systems, guided cell migration, and organogenesis: insights from genetic studies in *Drosophila*. *Dev Biol* 260:1-8.
- Richardson A, Malik RK, Hildebrand JD, Parsons JT (1997) Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell* 17:6906-6914.
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 114:2713-2722.
- Riesgo-Escovar JR, Jenni M, Fritz A, Hafen E (1996) The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10:2759-2768.
- Robenek H, Robenek MJ, Troyer D (2005) PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res* 46:1331-1338.
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR (1988) A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118:461-470.
- Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG (1985) Isolation and characterization of native adult osteonectin. *The Journal of Biological Chemistry* 260:2728-2736.
- Roote CE, Zusman S (1995) Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev Biol* 169:322-336.
- Rosenblatt S, Bassuk JA, Alpers CE, Sage EH, Timpl R, 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). *Biochemical Journal* 324:311-319.
- Sage EH (2001) Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *The Journal of Clinical Investigation* 107:781-783.
- Sage EH, Bassuk JA, Yost JC, Folkman MJ, Lane TF (1995) Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca<sup>2+</sup> binding EF-hand sequence. *Journal of Cellular Biochemistry* 57:127-140.
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 266:14831-14834.
- Sage EH, Johnson C, Bornstein P (1984) Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry* 259:3993-4007.
- Sage EH, Reed M, Funk SE, Truong T, Steadale M, Puolakkainen P, *et al.* (2003) Cleavage of the Matricellular Protein SPARC by Matrix Metalloproteinase 3 Produces Polypeptides That Influence Angiogenesis. *J Biol Chem* 278:37849-37857.
- Sage EH, Vernon R, Funk S, Everitt E, Angello J (1989a) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading *in vitro* and exhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 109:341-356.
- Sage EH, Vernon RB (1994) Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *Journal of Hypertension* 12:S145-152.
- Sage EH, Vernon RB, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe ML (1989b) Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:819-829.
- Sage H, Decker J, Funk S, Chow M (1989c) SPARC: a Ca<sup>2+</sup>-binding extracellular protein associated with endothelial cell injury and proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 1:13-22.
- Sahai E, Marshall CJ (2002) Rho-GTPases and cancer. *Nature Reviews* 2:133-142.
- Said N, Motamed K (2005) Absence of Host-Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Augments Peritoneal Ovarian Carcinomatosis. *Am J Pathol* 167:1739-1752.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* vol. Vol 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY, 1989.
- Sangaletti S, Stoppacciaro A, Guiducci C, Torrissi MR, Colombo MP (2003) Leukocyte, Rather than Tumor-produced SPARC, Determines Stroma and Collagen Type IV Deposition in Mammary Carcinoma. *J Exp Med*:jem.20030202.

## Referencias Bibliográficas

- Sasaki T, Gohring W, Mann K, Maurer P, Hohenester E, Knauper V, *et al.* (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *The Journal of Biological Chemistry* 272:9237-9243.
- Sasaki T, Hohenester E, W Gh, Timpl R (1998) Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *The EMBO Journal* 17:1625-1634.
- Sasaki T, Miosge N, Timpl R (1999) Immunochemical and tissue analysis of protease generated neoepitopes of BM-40 (osteonectin, SPARC) which are correlated to a higher affinity binding to collagens. *Matrix Biology* 18:499-508.
- Sastry SK, Burridge K (2000) Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research* 261:25-36.
- Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH, *et al.* (2003) SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 22:5021-5030.
- Satyamoorthy K, Samulewicz SJ, Thornburg LD, Basu A, Howe CC (1997) Identification of an intronic enhancer that nullifies upstream repression of SPARC gene expression. *Nucleic Acids Research* 25:3169-3174.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM (1998) NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *The Journal of Cell Biology* 141:1083-1093.
- Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP (2003) SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the TGF-beta-signaling system. *Molecular Biology of the Cell* 14:3977-3988.
- Schneider S, Londer R *The Coevolution of Climate and Life*. Sierra Club Books: San Francisco, 1984.
- Schock F, Perrimon N (2002a) Cellular processes associated with germ band retraction in Drosophila. *Dev Biol* 248:29-39.
- Schock F, Perrimon N (2002b) Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:463-493.
- Schock F, Perrimon N (2003) Retraction of the Drosophila germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev* 17:597-602.
- Schoenwaelder SM, Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology* 11:274-286.
- Schulz RA, The SM, Hogue DA, Galewsky S, Guo Q (1993) Ets oncogene-related gene Elg functions in Drosophila oogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10076-10080.
- Schwartz I, Seger D, Shaltiel S (1999) Vitronectin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31:539-544.
- Schwarzbauer JE, Musset-Bilal F, Ryan CS (1994) Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Enzymology* 245:257-270.
- Schwarzbauer JE, Spencer CS (1993) The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and motility. *Molecular Biology of the Cell* 4:941-952.
- Shankavaram UT, DeWitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM (1997) Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *Journal of Cellular Physiology* 173:327-334.
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, *et al.* (1998) Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *Journal of Cellular Physiology* 174:194-205.
- Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, *et al.* (1995) Effects of fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Developmental Biology* 170:457-466.
- Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, *et al.* (2001) Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* 80:1653-1659.
- Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K (1993) Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *European Journal of Biochemistry* 217:13-19.

## Referencias Bibliográficas

- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, *et al.* (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Sicot FX, Exposito JY, Masselot M, Garrone R, Deutsch J, Gaill F (1997) Cloning of an annelid fibrillar-collagen gene and phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate collagens. *Eur J Biochem* 246:50-58.
- Smyth GK, Speed T (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31:265-273.
- Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M (2002) Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 43:308-319.
- Soderling JA, Reed MJ, Corsa A, Sage EH (1997) Cloning and expression of murine SC1, a gene product homologous to SPARC. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45:823-835.
- Sosa MS, Girotti MR, Salvatierra E, Prada F, Olmo JALd, Gallango SJ, *et al.* (2007) Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics* In press.
- Spring J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R (1989) Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell* 59:325-334.
- Stenner DD, Romberg RW, Tracy RP, Katzmann JA, Riggs BL, Mann KG (1984) Monoclonal antibodies to native noncollagenous bone-specific proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81:2868-2872.
- Stoppacciaro A, Forni G, Colombo MP (1994) Different tumours, transduced with different cytokine genes as G-CSF and IL-2, show inhibition of tumour take through neutrophil activation but differ in T cell functions. *Folia Biol (Praha)* 40:89-99.
- Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, *et al.* (1999) Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *American Journal of Pathology* 155:441-452.
- Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown LF, Janes L, *et al.* (2000) Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *The EMBO Journal* 19:3272-3282.
- Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA (1996) Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 98:426-433.
- Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of Cell Biology* 155:459-470.
- Sugrue SP, Hay ED (1981) Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. *J Cell Biol* 91:45-54.
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley S *Drosophila Protocols*: New York, 2000.
- Swaroop A, Hogan BLM, Franke U (1988) Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. *Genomics* 2:37-47.
- Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB (2005) Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest*:JCI23002.
- Takahashi M, Nagaretani H, Funahashi T, Nishizawa H, Maeda N, Kishida K, *et al.* (2001) The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res* 9:388-393.
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, *et al.* (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282.
- Tanentzapf G, Tepass U (2003) Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* 5:46-52.
- Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, *et al.* (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6494-6499.
- Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R (1990) Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *The Journal of Cell Biology* 111:765-772.
- Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA (1987) Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *The Journal of Cell Biology* 105:2409-2415.

## Referencias Bibliográficas

- Tartare-Deckert S, Chavey C, Monthouel M-N (2001) The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor upregulated in obesity. *The Journal of Biological Chemistry* In press.
- Tazawa H, Okada F, Kobayashi T, Tada M, Mori Y, Une Y, *et al.* (2003) Infiltration of Neutrophils Is Required for Acquisition of Metastatic Phenotype of Benign Murine Fibrosarcoma Cells: Implication of Inflammation-Associated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Am J Pathol* 163:2221-2232.
- Termine JD, Kleiman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99-105.
- Thomas R, True LD, Bassuk JA, Lange PH, Vessella RL (2000) Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research* 6:1140-1149.
- Tian D, Litvak V, Toledo-Rodriguez M, Carmon S, Lev S (2002) Nir2, a novel regulator of cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 22:2650-2662.
- Timpl R, Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* 18:123-132.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N (1993) Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *The Journal of Cell Biology* 122:497-511.
- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z (1993) SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *The Journal of Cell Biology* 121:1433-1444.
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR (2002) Stromal Cells Promote Angiogenesis and Growth of Human Prostate Tumors in a Differential Reactive Stroma (DRS) Xenograft Model. *Cancer Res* 62:3298-3307.
- Uversky VN (2002a) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science* 11:739-756.
- Uversky VN (2002b) What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry* 269:2-12.
- Van Beijnum JR, Moerkerk PT, Gerbers AJ, De Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR, *et al.* (2002) Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: a study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *Int J Cancer* 101:118-127.
- van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research* 305:285-298.
- Vernon RB, Sage H (1989) The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis. *Biology of Reproduction* 40:1329-1340.
- Vial E, Perez S, Castellazzi M (2000) Transcriptional control of SPARC by v-Jun and other members of the AP1 family of transcription factors. *Oncogene* 19:5020-5029.
- Villarreal XC, Mann KG, Long GL (1989) Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* 28:6483-6491.
- Wade PA (2001) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 10:693-698.
- Walpen S, Beck K-F, Eberhardt W, Apel M, Chatterjee PK, Wray GMH, *et al.* (2000) Downregulation of SPARC expression is mediated by nitric oxide in rat mesangial cells and during endotoxemia in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 11:468-476.
- Walsh EP, Brown NH (1998) A Screen to Identify Drosophila Genes Required for Integrin-Mediated Adhesion. *Genetics* 150:791-805.
- Wang HD, Kazemi-Esfarjani P, Benzer S (2004) Multiple-stress analysis for isolation of Drosophila longevity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12610-12615.
- Wankell M, Kaesler S, Zhang YQ, Florence C, Werner S, Duan R (2001) The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. *Journal of Endocrinology* 171:385-395.
- Wayne M. Yokoyama MC, Gary Dos Santos, and Diane Miller. *Current Protocols in Immunology*, vol. 1. John Willey & Sons, Inc: New York, 2006, 2.5-2.6 pp.
- Wen T, Parrish CA, Xu D, Wu Q, Shen P (2005) Drosophila neuropeptide F and its receptor, NPFR1, define a signaling pathway that acutely modulates alcohol sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:2141-2146.

## Referencias Bibliográficas

- Wilson CL, Miller CJ (2005) Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics* 21:3683-3685.
- Wrana JL, Kubota T, Zhang Q, Overall CM, Aubin JE, Butler WT, *et al.* (1991a) Regulation of transformation-sensitive secreted phosphoprotein (SPPI/osteopontin) expression by transforming growth factor-beta. Comparisons with expression of SPARC (secreted acidic cysteine-rich protein). *Biochem J* 273 ( Pt 3):523-531.
- Wrana JL, Overall CM, Sodek J (1991b) Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *European Journal of Biochemistry* 197:519-528.
- Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, *et al.* (1998) EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLC g signaling pathway. *Journal of Cell Science* 111:615-624.
- Xie RL, Long GL (1995) Role of N-linked glycosylation in human osteonectin. Effect of carbohydrate removal by N-glycanase and site-directed mutagenesis on structure and binding of type V collagen. *The Journal of Biological Chemistry* 270:23212-23217.
- Yan Q, Sage EH (1999) SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47:1495-1506.
- Yan Q, Weaver M, Perdue N, Sage EH (2005) Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells. *J Cell Physiol* 203:286-294.
- Yang Q, Zage P, Kagan D, Tian Y, Seshadri R, Salwen HR, *et al.* (2004) Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 10:8493-8500.
- Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P (2000) Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Molecular Biology of the Cell* 11:3353-3364.
- Yang Z, Strickland DK, Bornstein P (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *The Journal of Biological Chemistry* 276:8403-8408.
- Yasuda GK, Schubiger G, Wakimoto BT (1995) Genetic characterization of ms (3) K81, a paternal effect gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140:219-229.
- Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, *et al.* (2001) SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 159:609-622.
- Yost JC, Bell A, Seale R, Sage EH (1994) Purification of biologically active SPARC expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 314:50-63.
- Yost JC, Sage EH (1993) Specific interaction of SPARC with endothelial cells is mediated through a carboxy-terminal sequence containing a calcium-binding E-F hand. *The Journal of Biological Chemistry* 268:25790-25796.
- Young MF, Findlay DM, Dominguez P, Burbelo PD, McQuilan C, Kopp JB, *et al.* (1989) Osteonectin promoter: DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells. *The Journal of Biological Chemistry* 264:450-456.
- Young PE, Richman AM, Ketchum AS, Kiehart DP (1993) Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev* 7:29-41.
- Zhang L, Underhill CB, Chen L (1995a) Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Research* 55:428-433.
- Zhang WW, Koch PE, Roth JA (1995b) Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *Biotechniques* 18:444-447.
- Zhao H, Ettala O, Vaananen HK (2002) Intracellular membrane trafficking pathways in bone-resorbing osteoclasts revealed by cloning and subcellular localization studies of small GTP-binding rab proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293:1060-1065.
- Zhao Y, Lu J, Sun H, Chen X, Huang B (2007) Roles of histone acetylation modification in basal and inducible expression of hsp26 gene in *D. melanogaster*. *Mol Cell Biochem*.
- Zhou HY, Salih E, Glimcher MJ (1998) Isolation of a novel bone glycosylated phosphoprotein with disulphide cross-links to osteonectin. *Biochemistry Journal* 330:1423-1431.

# Anexos

## Anexo 1: Abreviaturas utilizadas

<b>MEC:</b>	matrix extracelular
<b>SPARC:</b>	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
<b>dSPARC:</b>	SPARC de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>SP:</b>	SPARC
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc:</b>	ADN copia
<b>ARN:</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNr:</b>	ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARNm:</b>	ARN mensajero
<b>N-terminal:</b>	extremo amino terminal
<b>C-terminal:</b>	extremo carboxilo terminal
<b>UAS:</b>	<i>upstream activating sequence</i>
<b>HS:</b>	<i>Heat shock</i> o choque térmico
<b>Del:</b>	delección cromosómica
<b>GFP:</b>	<i>green fluorescent protein</i> o proteína verde fluorescente
<b>PBS:</b>	buffer fosfato salino
<b>DIG:</b>	digoxigenina
<b>βGal:</b>	beta galactosidasa
<b>ATCC:</b>	<i>American Tissue Culture Collection</i>
<b>PDGF:</b>	factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>VEGF:</b>	factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>bFGF:</b>	factor de crecimiento de fibroblastos básico
<b>HRP:</b>	peroxidasa de rabanito
<b>Igs:</b>	inmunoglobulinas
<b>MOPS:</b>	3-N[Morpholino] Propanesulfonic Acid
<b>SSC:</b>	solución salina de citrate de sodio
<b>DTT:</b>	ditiotreitól
<b>ABF:</b>	azul de bromofenol
<b>PMN:</b>	neutrófilos polimorfonucleares
<b>RPM:</b>	revoluciones por minuto

## Anexos

<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>SBF:</b>	suero bovino fetal
<b>CD:</b>	dicroismo circular
<b>FDR:</b>	<i>false discovery rates</i>

## Anexo 2: *Drosophila melanogaster* como modelo

### Cien años *at the bench*

En pocos años *Drosophila melanogaster* habrá cumplido un siglo en la mesada de los genetistas. No obstante, desde principios de siglo XIX hasta la fecha se han incorporado paulatinamente biólogos moleculares/celulares, evolucionistas y científicos dedicados al estudio de la biología del desarrollo. Comúnmente conocida como la mosca de la fruta o la mosca del vinagre, este insecto holometábolo se lo encuentra distribuido a lo largo de todas las regiones cálidas del planeta. Sin embargo no fue hasta 1909 cuando **Thomas Hunt Morgan** la presentara en el escenario científico como un nuevo modelo biológico. El “redescubrimiento” del mendelismo al principio del siglo XIX movilizó a Morgan a buscar las bases físicas de los factores de la herencia. Necesitaba un modelo animal de ciclo de vida corto, fácil de cultivar o criar y de alta fecundidad, sin dejar de lado el costo de mantenimiento.

### “No les vengo a vender, les vengo a regalar...”

La utilización de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico presenta una serie de ventajas: (1) Conocimiento de la secuencia completa del genoma de *Drosophila* y disponibilidad de mutantes en Centros de Stocks públicos. (2) Disponibilidad de herramientas que permiten el estudio de la expresión génica *in vivo*. (3) El proceso de generación de líneas transgénicas y su utilización para hiperexpresar una proteína de interés *in vivo* es relativamente fácil. (4) El número reducido de genes disminuye la probabilidad de redundancia. Esto es particularmente importante en el caso de la búsqueda de interacciones moleculares. (5) Conservación de un grupo ancestral de componentes de la MEC, entre ellos SPARC.

*Drosophila melanogaster*, vulgarmente conocida como la mosca del vinagre o de la fruta, es uno de los metazoos más estudiados, y un modelo atractivo, debido a su potencial para abordar estudios genéticos, moleculares, celulares, de desarrollo y neurobiología.

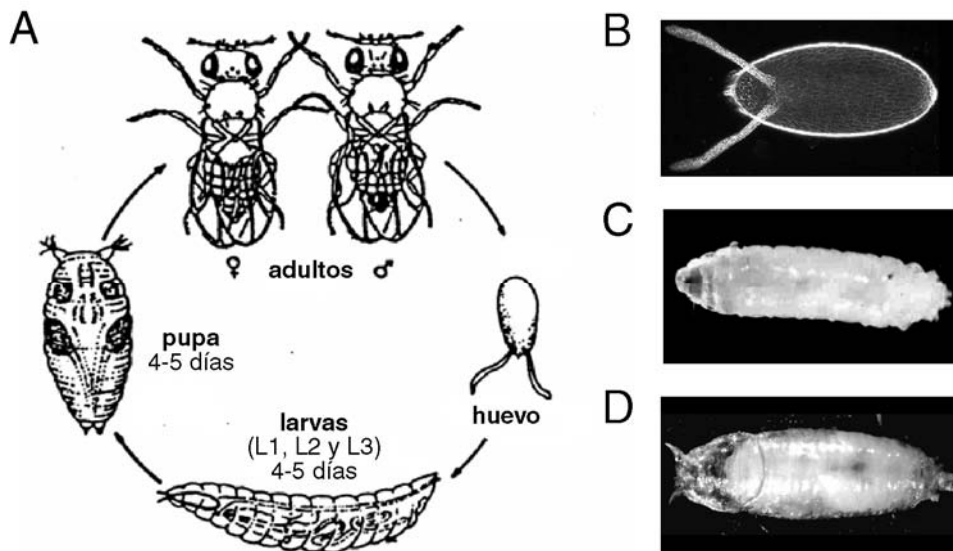
Las ventajas experimentales de la mosca de la fruta son múltiples. Se conoce la secuencia completa de su genoma, la cual está disponible en la base de datos del *Berkley Drosophila Genome Project* (BDPG: <http://www.fruitfly.org>). Experimentalmente son fáciles y económicas para criar. Su crecimiento es rápido, siendo el ciclo de vida de 10-14 días a 25 °C. Su tamaño reducido posibilita mantener cientos de moscas en tubos o

botellas pequeñas. Las técnicas de manipulación e identificación de mutantes son versátiles, lo cual ha llevado a que sea el modelo genético por excelencia en la educación universitaria. Además, en la comunidad científica existe acceso libre a las mutantes y a las técnicas de los otros investigadores. Como recurso, la base de datos **FlyBase** (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) resulta invaluable a la hora de obtener información molecular y genética sobre *Drosophila melanogaster*. El FlyBase, cuyo servidor primario está en la Universidad de Indiana, es la base de datos principal que provee información genómica y genética referida a este organismo modelo. En este sitio pueden obtenerse mapas genómicos y genéticos, listas de genes y alelos con su correspondiente anotación proveniente del proyecto de secuenciación del genoma, así como también información del producto proteico, secuencias, líneas mutantes disponibles en los centros de stocks públicos, información sobre transgenes, información sobre rearrreglos cromosómicos, descripciones anatómicas, imágenes, navegadores para datos fenotípicos y de expresión génica, referencias bibliográficas y un índice de los investigadores que trabajan con *Drosophila* (Consortium, 2003; Drysdale and Crosby, 2005).

### Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila* es un típico insecto holometábolo, es decir, su vida puede dividirse en cuatro estadios: embrionario, larval, pupal e imaginal (adulto), ocurriendo una metamorfosis completa de la forma corporal entre larva y pupa (**Figura 59**) (Ashburner *et al.*, 2005).

En la figura 51 se muestra el ciclo de vida de *Drosophila*. Los huevos fertilizados son puestos inmediatamente luego del apareamiento en la superficie del medio de cultivo. Aproximadamente 24 hs después (a 25 °C), eclosionan las larvas del 1er estadio, las cuales comienzan a alimentarse. La larva pasa por dos mudas sucesivas, dividiéndose este estadio en tres sub-estadios. El más temprano, L1 o “larva 1”, dura 24 hs. Las larvas de este estadio se mantienen en la superficie del medio para alimentarse. Al mudar al siguiente estadio (L2), las larvas comienzan a cavar, enterrándose hasta dejar solamente los espiráculos (estructura terminal del sistema traqueal) por sobre la superficie del medio de cultivo. El estadio L2 dura otras 24 hs, tras lo cual ocurre la última muda larval, alcanzando el estadio L3, que dura 48 hs. Una vez completado este período, las larvas dejan de alimentarse y se desplazan fuera de la comida, buscando un lugar adecuado para la pupariación, que ocurre alrededor de las 120 hs luego de la ovipuesta. Durante el estadio pupal ocurre la metamorfosis, con una duración de cuatro días. Las moscas adultas emergen a los 9 días de la ovipuesta, con las alas sin desplegar y el cuerpo poco pigmentado, adquiriendo su aspecto final entre 1 y 3 hs después. Los adultos tienen una expectativa de vida máxima de 60 días a 25 °C.



**Figura 59. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** (A) El ciclo de vida tiene un período de duración aproximada de 10 a 12 días a 25 °C. La hembras ponen huevos fecundados de los que un día más tarde emergen larvas del primer estadio (en el esquema se muestra una larva como representación de los tres estadios). Luego de pasar por el segundo y tercer estadio larval, la mosca comienza la metamorfosis dentro de un pupario inmóvil. El estadio pupal dura 4-5 días. Del pupario emerge el adulto que alcanza la madurez sexual 12 hs más tarde. (B) Fotografía de un huevo, (C) una larva 3 y (D) una pupa de *Drosophila* tomadas con microscopía óptica con luz blanca.

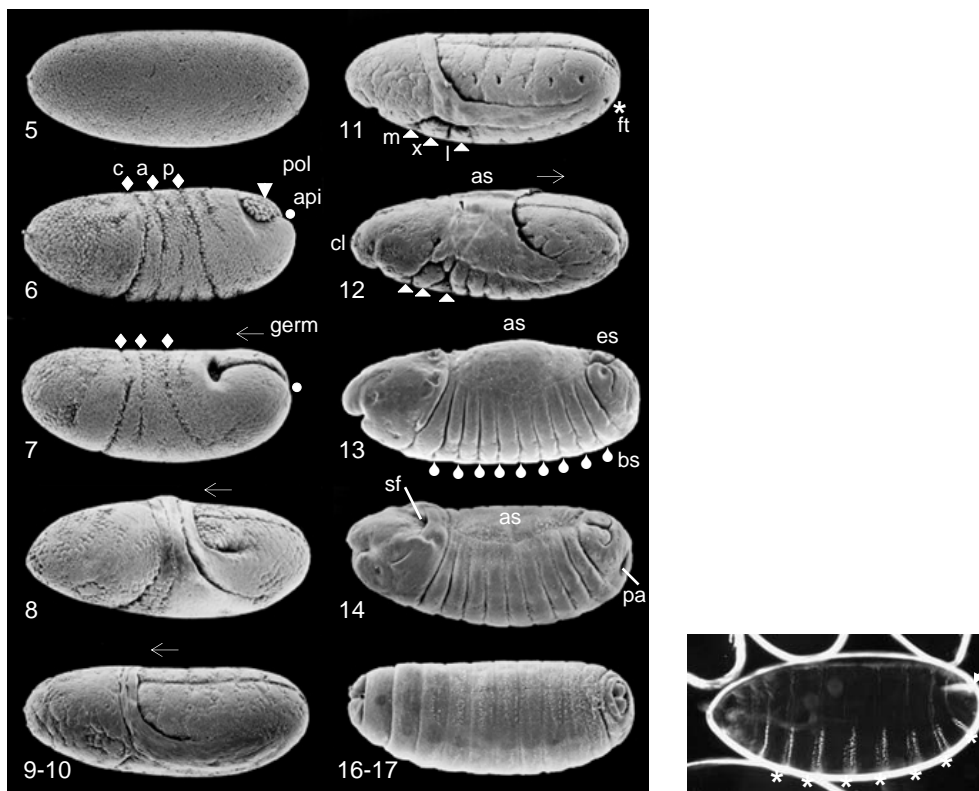
## Embriogénesis de *Drosophila melanogaster*

Artificialmente, la embriogénesis ha sido dividida en estadios en los que ocurren los eventos morfogénicos más importantes (Figura 60A) (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Hartenstein, 1993). El desarrollo temprano del embrión comprende ciclos rápidos de divisiones nucleares (8 ciclos en 1:12 hs) en la parte central del embrión, luego de lo cual la mayor parte de los núcleos migra a la periferia. Los núcleos centrales continúan dividiéndose en forma sincrónica con los núcleos periféricos durante un par de ciclos más (28 min), luego de lo cual se dividen asincrónicamente y se vuelven poliploides, mientras comienza la celularización en la periferia (2:30 hs), que conduce a la formación del blastodermo celular a las 3 hs (estadio 5) (Figura 60A). En el estadio 6 comienza la gastrulación temprana, invaginándose los primordios mesodérmicos y endodérmicos. Este estadio se reconoce por las células polares, dispuestas dorso-posteriormente sobre el primordio del intestino medio, el pliegue cefálico que divide el procefalon de la banda germinal metamérica y los dos pliegues transversales. Hacia el estadio 7 comienza la elongación de la banda germinal, que tiene una fase inicial rápida (40 min., estadios 7 y 8) y una posterior lenta (1 h 40 min, estadios 9-10). Al entrar al estadio 11, la segmentación se hace evidente en la epidermis y protruyen los primordios mandibulares, maxilares y labiales y se evidencian las fosas traqueales. La retracción de la banda germinal comienza en el estadio 12, dejando expuesta la amnioserosa

subyacente. Luego se produce el cierre dorsal, que involucra movimientos morfogénicos del ectodermo y la amnioserosa, el cual se completa hacia el final del estadio 15. En los últimos estadios de la embriogénesis (16-17) se completa la segmentación y la involución de la cabeza, las tráqueas se llenan con aire, el sistema nervioso se condensa, se registran los movimientos musculares y la epidermis secreta la cutícula.

## Generación del patrón epidérmico

Hacia el final del desarrollo del embrión, se ha completado el patrón corporal, el cual está organizado en unidades segmentarias repetitivas. Este patrón de segmentación se refleja en la cutícula que es secretada hacia el final de la embriogénesis por el ectodermo subyacente (**Figura 60B**).



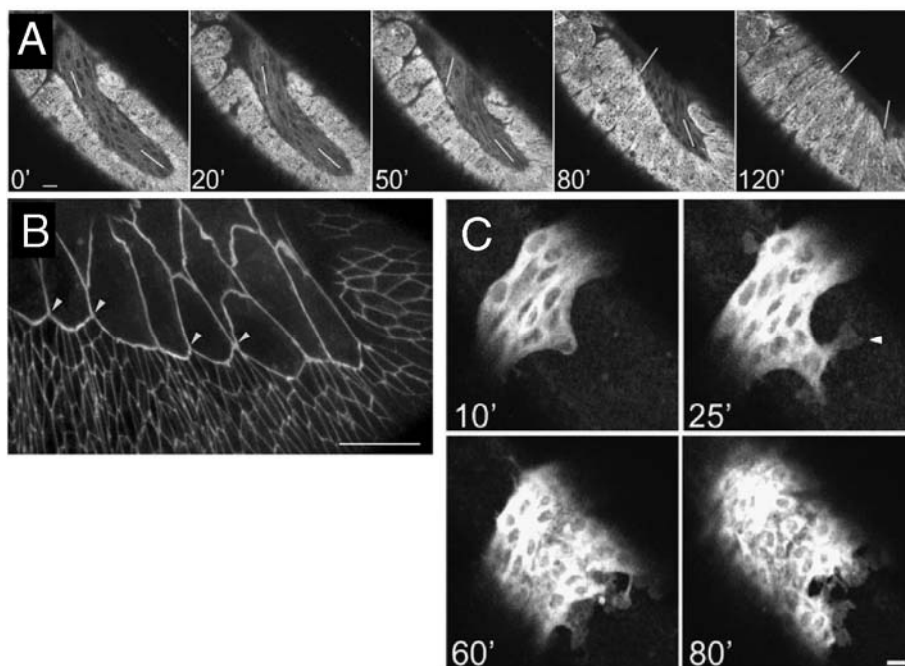
**Figura 60. Desarrollo del embrión de *Drosophila melanogaster*.** (A) Se muestran los principales estadios según Hartenstein. Los embriones están orientados con su parte anterior a la izquierda y la dorsal hacia arriba. (c) pliegue cefálico; (a) pliegue transversal anterior; (p) pliegue transversal posterior; (pol) células polares; (api) invaginación amnioproctodeal; (germ) banda germinal; (m) protrusión mandibular; (x) protrusión maxilar; (l) protrusión labial; (ft) fosa traqueal; (cl) clipeolabro; (as) amnioserosa; (es) espiráculos; (bs) bordes segmentarios; (sf) saco frontal; (pa) placa anal. (B) Cutícula de un embrión silvestre. Se destacan con (\*) las pilas de dentículos ventrales, refringentes en microscopía de campo oscuro. Con una flecha se señalan los espiráculos posteriores, los cuales conectan el sistema traqueal con el exterior. En la parte anterior se ven las mandíbulas (en otro plano focal, no se notan en esta imagen). La cutícula corresponde a un embrión que ha alcanzado el final del desarrollo (estadio 17), justo antes de eclosionar del huevo.

En embriones silvestres la cutícula consta de una serie de estructuras reconocibles. A lo largo del eje antero-posterior, se suceden la región de la cabeza, los segmentos torácicos y los segmentos abdominales. En cada segmento abdominal, se alternan zonas de cutícula desnuda y bandas de “dentículos”. Los dentículos son proyecciones de las células ectodérmicas, recubiertas de cutícula, los cuales en las larvas cumplen una función de tracción durante el desplazamiento. El destino celular del ectodermo que determina que la cutícula secretada sea lisa o denticulada está determinado por las vías de señalización de Wingless (Wg) y de Hedgehog (Hh).

## Anexo 3: Los movimientos morfogénicos

### Retracción de la banda germinal

La retracción de la banda germinal es un proceso morfogenético que involucra movimientos tisulares a gran escala en el embrión de *Drosophila* (Schock and Perrimon, 2002a). Temporalmente comienza en el estadio 12 y comprende un período de 2 hs (Figura 61).



**Figura 61. Retracción de la banda germinal en embriones salvajes.** (A) Progresión temporal en la que se nota que el eje dorso-ventral de la amnioserosa se orienta a lo largo del eje largo del embrión al comienzo de la retracción, y paulatinamente se va orientando en sentido dorso-ventral (barras blancas). Los límites de las células epidérmicas se visualizan por la localización de b-cateninaGFP en las uniones adherentes (Schock and Perrimon, 2002a). (B) Ampliación del límite entre la amnioserosa y la banda germinal. Las flechas indican los sitios en los que la membrana de las células de la amnioserosa contacta en forma perpendicular con las células del borde del ectodermo. En estos puntos de contacto, la banda germinal parece ser arrastrada. Las uniones adherentes están evidenciadas por localización de DE-cadherinaGFP. Barra: 20  $\mu$ m. (C) Vistas

dorsales mostrando la formación de lamelipodios (flecha) en la parte posterior de la amnioserosa, proyectándose hacia la parte posterior sobre el extremo caudal de la banda germinal. Las células de la amnioserosa están marcadas con EGFP. Barra: 10 um.

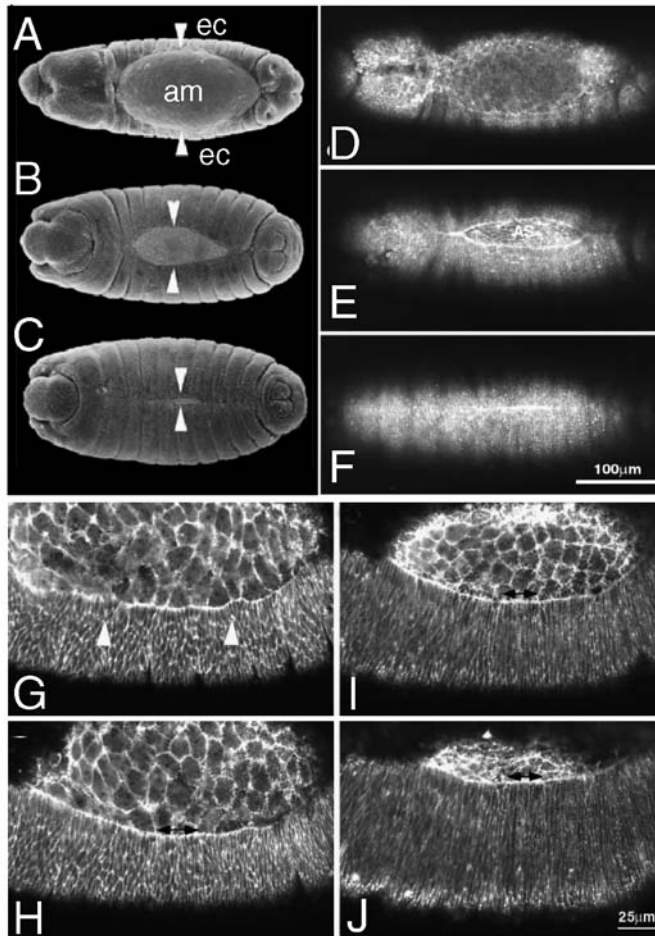
En este estadio el embrión está formado principalmente por dos epitelios, uno escamoso extraembriónico (la amnioserosa) y otro ectodérmico (la banda germinal), además de la masa central mesodérmica y neuroectodérmica. Durante este proceso, se forman los límites segmentarios en el abdomen y en el tórax y el extremo caudal del embrión adopta su posición definitiva (**Figura 61A**). Una vez finalizado, la amnioserosa se ha extendido y cubre la parte dorsal del embrión. El cambio de forma recíproco de las células de ambos epitelios, la amnioserosa y el ectodermo, da cuenta del movimiento coherente de los mismos como una capa epitelial única. Las células de la amnioserosa se acortan a lo largo de su eje dorso-ventral, mientras que las células de la banda germinal se alargan en ese mismo sentido. La unión fuerte de ambos tejidos por medio de uniones adherentes provoca el movimiento coordinado de ambos epitelios como una sola lámina (**Figura 61B**). La amnioserosa cumple un rol activo en este evento morfogénico, adhiriéndose y migrando sobre el extremo caudal de la banda germinal (**Figura 61C**).

## El cierre dorsal del epitelio

Al final de la retracción de la banda germinal, la amnioserosa cubre una buena parte de la superficie dorsal del embrión. El cierre dorsal ocurre cuando la epidermis lateral se elonga hacia la línea media dorsal hasta envolver la amnioserosa y contactar la epidermis del otro lado (**Figura 62A-C**). Esta fase de la embriogénesis toma unas 4 hs a 25°C, desde el comienzo del estadio 13 hasta el final del 15 (Kiehart, Galbraith et al. 2000; Schock and Perrimon 2003).

Durante este proceso, se producen cambios en la forma de las células de la epidermis lateral así como también en las células de la amnioserosa (**Figura 62G-J**). Las células de la amnioserosa al inicio del estadio 13 son isomórficas, y a medida que progresa el cierre dorsal se vuelven asimétricas, sufriendo reducción del área celular en el plano del epitelio, presumiblemente como consecuencia de la contracción del citoesqueleto. Las células de la epidermis lateral son poligonales al principio y luego se elongan en la dirección del estiramiento para acomodarse a la mayor superficie requerida para cubrir la amnioserosa. La fila de células más dorsales de la epidermis lateral, las células del borde, lidera el movimiento de la epidermis hacia la línea media dorsal. Como puede verse en la secuencia de la figura (**Figura 62D-F**), las células en los extremos polares de la

epidermis lateral alcanzan la línea media dorsal antes y forman un epitelio continuo a medida que contactan las del otro lado.

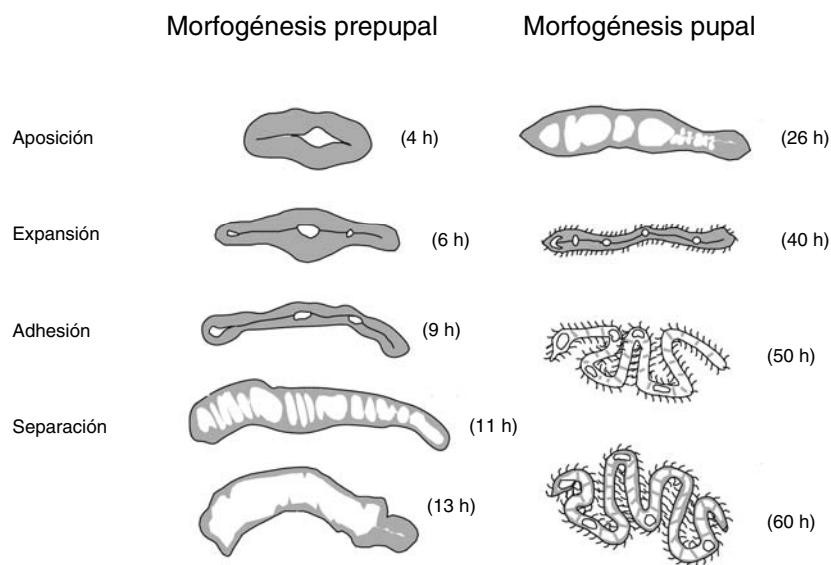


**Figura 62. Cierre dorsal en embriones salvajes.** (A-F) Vista dorsal de embriones de *D. melanogaster* en la que se nota la progresión normal del cierre dorsal. (A-C) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (tomadas de Weigmann et al. 2003) (D-F) Imágenes de microscopía confocal, tomadas de Kiehart et al. 2000. Barra: 100  $\mu$ m. (A y D) Final de la retracción de la banda germinal y comienzo del cierre dorsal. (B y E) El cambio en la forma celular de poligonal a elongada es aparente en las células de la epidermis lateral (alargadas perpendicularmente al eje largo del embrión) y en las células de la amnioserosa (alargadas paralelamente al eje largo del embrión). (C y F) Final del cierre dorsal. Queda un remanente de amnioserosa expuesta, indicando que el cierre se está produciendo. En estadios posteriores no se observan cicatrices. (G-J) Cambios en la forma celular. Imágenes de microscopía confocal (tomadas de Kiehart et al. 2000) (G) Al comienzo del cierre dorsal se observa el borde de la epidermis lateral en forma festoneada irregular (flechas). (H-J) Secuencia mostrando el alargamiento de las células de la epidermis lateral en el plano dorso-ventral y el acortamiento de grupos de células en sentido antero-posterior (indicado por flechas dobles). Al mismo tiempo se evidencia el cambio de forma y la reducción de la superficie de las células de la amnioserosa.

## Morfogénesis de las alas

La unión entre las dos capas de cutícula que forman el ala madura del adulto se produce durante el estadio pupal. En la superficie apical de cada capa de células epidérmicas, la membrana plasmática se une a la cutícula por medio de una unión de tipo hemidesmosoma. Esta unión sirve como un centro organizador para los microtúbulos,

que se extienden de la superficie apical a la basal, y junto con los filamentos de actina asociados conectan ambas superficies del ala (Walsh and Brown, 1998). Durante el desarrollo de las alas se dan dos rondas de aposición-adherencia entre ambos epitelios, una en el período prepupal, y otra durante el período pupal (Figura 63). Hacia mediados del estadio pupal, las alas han alcanzado la forma y el patrón de venación definitivos. En el resto de este estadio, el área de las alas se incrementa unas 10 veces (Murray *et al.*, 1995). Después de la emergencia del imago ocurre el desplegamiento y expansión del ala y las células entre las venas degeneran, quedando la cutícula dorsal directamente apoyada sobre la cutícula ventral. Las células que rodean las venas persisten, presumiblemente para mantener el espacio abierto.



**Figura 63. Diagrama representativo de los eventos que dan forma al ala en *D. melanogaster*.** Los esquemas muestran el desarrollo del ala en sucesivos estadios prepupales y pupales. Los tiempos aproximados a 25 °C luego de la formación del pupario se indican entre paréntesis. Notar que la expansión ocurre antes de la adhesión en la prepupa, pero después en la pupa. Tomada y modificada de Fristrom *et al* 1993.

## Anexo 4: Genómica de *Drosophila*

### Tabla de genes diferencialmente expresados en el modelo de ganancia de función ubicua de dSPARC

En la siguiente tabla se muestran los transcritos diferencialmente expresados ( $p < 0.35$  con el ajuste de FDR) utilizando el inductor de choque térmico. Los datos fueron ordenados por el *p* valor. Las veces de cambio (fc: tratamiento/control) están expresadas en escala lineal.

<b>Símbolo</b>	<b>Sonda affy</b>	<b>LocusLink</b>	<b>HS.fc</b>	<b>HS.p</b>
Rab35	1624567_at	33014	-1.64	0.02
BM-40-SPARC	1625825_at	43230	2.23	0.02
Ipod	1628843_at	31954	-1.62	0.04
CG14696	1635764_at	41317	0.91	0.08
CG9449	1633200_at	40117	-0.89	0.08
CG13813	1637644_at	40218	0.93	0.12
CG1529	1624100_at	33077	-1.12	0.15
CG9449	1628150_a_at	40117	-0.72	0.15
CG32032	1629205_at	192535	-0.69	0.15
CG6416	1632121_a_at	38988	0.66	0.15
CG13404	1634502_at	32382	0.72	0.2
Ccp84Ae	1624216_at	40821	0.59	0.2
CG9056	1633390_at	32547	0.6	0.2
NPFR1	1628982_at	40754	-0.68	0.2
CG7860	1634351_at	32488	-0.87	0.21
	1641367_at		0.6	0.21
CG13067	1628261_at	39785	1.06	0.21
mst	1638175_at	33119	0.67	0.21
Ark	1624898_a_at	36914	0.58	0.21
rdgB	1634099_at	32340	-0.85	0.23
CG13783	1637519_at	33998	0.59	0.23
CG2560	1638768_at	32198	0.84	0.23
TpnC25D	1632633_at	33752	0.59	0.24
CG6416	1629383_a_at	38988	0.49	0.24
CG17841	1623704_at	31965	0.59	0.24
HDAC4	1635284_a_at	32278	-0.54	0.24
CG13361	1638223_at	31019	-0.51	0.24
Obp18a	1625531_at	32897	-0.49	0.24
CG7298	1628405_at	40210	0.97	0.31
CG12607	1641064_at	38547	0.49	0.33
CG3502	1635921_at	37695	0.6	0.33
dro5	1627327_at	38409	-0.64	0.33
Obp99b	1623675_at	43497	-0.45	0.33
CG18136	1641688_at	40075	-0.46	0.33
CG5470	1632518_at	41934	-0.49	0.33
TfllFbeta	1633349_at	41290	0.6	0.33
CG7529	1624895_at	40381	-0.47	0.33

## Tabla de genes diferencialmente expresados en el modelo de ganancia de función de dSPARC en ectodermo

En la siguiente tabla se muestran los primeros 100 transcritos diferencialmente expresados ( $p < 0.35$ ) utilizando el inductor 69B. Los datos fueron ordenados por el *p* valor. Las veces de cambio (fc: tratamiento/control) están expresadas en escala lineal.

<b>Símbolo</b>	<b>Sonda affy</b>	<b>LocusLink</b>	<b>69B.fc</b>	<b>69B.p</b>
Rab35	1624567_at	33014	-1.66	0
rdgB	1634099_at	32340	-1.06	0.06
CG13813	1637644_at	40218	0.9	0.06
BM-40-SPARC	1625825_at	43230	1.16	0.06
CG4570	1637691_at	41306	-0.99	0.08
CG32032	1629205_at	192535	-0.71	0.11
CG13404	1634502_at	32382	0.7	0.11
CG1529	1624100_at	33077	-1.01	0.11
mst	1638175_at	33119	0.79	0.13
lpod	1628843_at	31954	-1.83	0.13
CG14696	1635764_at	41317	0.74	0.13
CG17841	1623704_at	31965	0.71	0.13
CG5321	1638582_at	32399	0.67	0.13
osk	1639953_at	41066	-1.65	0.14
plu	1632814_at	44848	-0.9	0.18
CG32634	1633451_at	318131	-0.65	0.18
asp	1627383_at	42946	-0.6	0.23
CG15092	1633076_at	37164	-0.93	0.23
CG30154	1640217_at	246487	0.68	0.23
NPFR1	1628982_at	40754	-0.54	0.23
CG7860	1634351_at	32488	-0.63	0.23
Pen	1637276_at	34338	-0.9	0.23
Scamp	1641444_a_at	32470	-0.57	0.23
Cks30A	1627770_at	34250	-0.6	0.23
slam	1638948_at	33890	-0.63	0.23
CG8665	1631452_at	35407	0.48	0.23
sno	1635992_at	32273	0.49	0.23
gwl	1631785_at	45969	-0.77	0.23
swa	1633458_at	31580	-0.6	0.23
CG7465	1626616_at	38553	-0.49	0.23
osk	1631153_at	41066	-1.65	0.23
Thor	1635900_at	33569	-0.47	0.23
bcd	1631463_a_at	40830	-0.92	0.23
CG3238	1639821_at	33567	-0.48	0.23
cmet	1624191_at	53561	-0.55	0.23

Rbp2	1624595_a_at	49809	-0.54	0.23
CG4250	1623364_at	37599	0.44	0.23
l(1)G0136	1640339_at	32513	0.46	0.23
Oat	1627352_at	40145	0.62	0.23
Hph	1638797_a_at	40633	-0.65	0.23
CG5391	1639532_at	42611	0.53	0.23
CG32638	1634787_at	318133	-0.44	0.23
CG18814	1629675_at	59175	0.51	0.23
	1624031_at		1.02	0.23
CG6897	1638411_at	40031	-0.54	0.23
nos	1632713_at	42297	-1.73	0.23
dp	1634075_at	318824	-0.61	0.23
CG17510	1624857_at	49892	0.59	0.23
LysX	1632720_at	38122	-0.61	0.23
CG12817	1638311_at	41250	0.45	0.23
CG13990	1632017_at	50424	-0.42	0.23
CG7763	1626144_at	36235	0.61	0.23
CG30035	1627582_a_at	36248	0.61	0.23
CG11122	1640110_at	32046	-0.57	0.23
Top2	1631837_at	35225	-0.43	0.23
CG15737	1631125_at	32152	-1.14	0.23
dhd	1636303_at	31444	-2.88	0.23
dro5	1627327_at	38409	-0.71	0.23
CycB	1639876_a_at	37618	-0.49	0.23
CG6113	1624505_at	34450	0.62	0.23
glu	1635123_at	35001	-0.42	0.23
Rbp1-like	1626413_at	32293	-0.42	0.23
CG16700	1636835_at	32694	0.44	0.23
Tis11	1623863_a_at	32222	-0.53	0.23
alphaTub67C	1630239_at	39130	-1.21	0.23
CG31300	1635379_at	326132	0.47	0.23
CG12717	1623493_at	32229	-0.64	0.23
CG14655	1627852_at	40594	-0.5	0.23
Cas	1637053_at	35016	-0.42	0.23
nod	1626438_at	32107	-0.42	0.23
CG11063	1625797_at	32351	-0.41	0.23
CG13640	1636000_at	42967	0.54	0.23
CG4004	1638751_a_at	32226	-0.44	0.23
CG15747	1632401_at	32288	-0.45	0.23
	1630184_at		0.49	0.23
sns	1633648_at	44097	-0.4	0.23
	1641367_at		0.88	0.23
Spn1	1630619_at	49808	0.46	0.23

Pkdelta	1628677_at	32191	-0.53	0.23
nej	1622925_at	43856	-0.8	0.23
scra	1637214_a_at	35696	-0.46	0.23
	1641024_at		-0.54	0.23
CG6425	1626997_at	43216	-0.53	0.23
CG8526	1631933_at	41208	-0.4	0.23
Borr	1634359_a_at	34245	-0.57	0.23
mu2	1638979_a_at	38257	-0.59	0.23
CG30070	1623720_at	36599	0.49	0.23
CG11509	1625642_at	31115	-0.41	0.23
	1625287_at		0.4	0.24
	1624497_at		-0.43	0.24
trr	1635103_at	31149	-0.46	0.24
CG9427	1627645_at	41164	0.4	0.24
CG8245	1633201_at	35503	0.39	0.24
CG11858	1633856_at	43044	0.4	0.24
CG18669	1636181_at	50072	0.48	0.24
CG33968	1638195_at	318102	0.59	0.24
CG7282	1641329_at	32879	-0.41	0.24
Prat2	1624586_a_at	38753	0.54	0.24
CG11360	1640439_at	43810	0.43	0.24
thr	1634727_a_at	37042	-0.62	0.24

## Tabla de genes regulados positivamente en el modelo de pérdida de función de hemipterus (Hep)

En la siguiente tabla se muestran los primeros 100 transcritos diferencialmente aumentados respecto del control ( $p < 0.05$ ). Los datos están ordenados por veces de cambio (expresados como  $\log_2$ ). Los números de  $p$  notados como cero corresponden a valores menores de 0.001.

Símbolo	Sonda affy	LocusLink	Hep.p	Hep.fc
CG12200	1625292_at	32932	0	5.84
	1628918_at		0	4.7
CG13822	1635936_at	42787	0	4.51
CG12344	1629280_at	36145	0	4.23
miple	1626667_at	38047	0	3.72
	1633191_at		0	3.56
Odc2	1631439_at	35767	0	2.99
CG31103	1638583_at	43030	0	2.96
CG11164	1632747_at	32323	0	2.92
w	1624393_at	31271	0	2.85

CG2993	1638016_at	40924	0	2.78
CG31300	1635379_at	326132	0	2.76
CG7408	1626665_at	39991	0	2.64
mtrm	1629445_at	38958	0	2.62
	1630934_at		0	2.62
CG18661	1623883_at	50438	0	2.59
ninaD	1632705_at	326160	0	2.54
Hsc70-2	1636055_at	41609	0	2.52
CG31955	1633946_at	319045	0	2.49
RfC38	1634081_at	34550	0	2.38
CG30017	1641538_at	246394	0	2.36
CG32602	1637929_a_at	32384	0	2.35
CG11854	1630761_at	43037	0	2.34
	1640416_at		0	2.23
CG5629	1624604_a_at	42295	0	2.21
mre11	1637151_at	34565	0	2.17
	1625433_at		0	2.14
CG10237	1627106_a_at	35222	0	2.13
CG3509	1639853_at	41780	0	2.1
CG13375	1629828_at	30976	0	2.1
Cyp6a13	1635110_at	35837	0	1.98
CG14102	1641235_at	40156	0	1.97
CG32104	1629995_at	39413	0	1.96
	1630700_at		0	1.96
fz	1639883_at	45307	0	1.95
CG32373	1630163_at	318000	0	1.94
CG14410	1628317_at	32409	0	1.93
CG31032	1633741_at	318565	0	1.92
l(2)03659	1637046_at	47905	0	1.91
CG32073	1631145_at	326191	0	1.88
CG7650	1633616_at	39694	0	1.87
CG3520	1625459_at	37708	0	1.82
CG10962	1639009_at	31824	0	1.81
	1638428_at		0	1.76
CG3457	1623025_at	31196	0	1.76
CG13795	1624836_at	34049	0	1.72
CG8245	1633201_at	35503	0	1.7
TM4SF	1633696_at	37786	0	1.68
beat-Vb	1636074_at	41583	0	1.66
	1639114_at		0	1.65
CG5724	1638903_at	41573	0	1.63
CG3788	1634995_at	37644	0	1.63
CG17669	1623294_at	37125	0	1.61

	1641245_a_at		0	1.58
CG9027	1636961_a_at	36232	0	1.56
CG15047	1637642_at	32845	0	1.55
CG4949	1633764_a_at	32691	0	1.55
CG9883	1626264_at	33442	0	1.54
CG14898	1627842_at	42004	0	1.53
CG3857	1623351_at	2768908	0	1.51
sisA	1623391_at	32068	0	1.49
alpha-Est5	1641650_at	40905	0	1.49
	1636132_at		0	1.48
TBPH	1638268_at	37781	0	1.48
	1635795_at		0	1.47
CG32625	1623296_at	318128	0	1.46
CG3326	1624312_at	33544	0	1.44
CG17841	1623704_at	31965	0	1.43
CG14612	1626717_at	50143	0	1.41
timeout	1641590_at	41615	0	1.38
CG12491	1639562_at	37759	0	1.38
CG31935	1631591_at	33338	0	1.37
	1633297_at		0	1.36
	1631874_at		0	1.34
CG5999	1638182_at	41574	0	1.34
spn-E	1636886_at	41919	0	1.32
l(1)dd4	1636052_at	48481	0	1.32
CG2183	1641671_at	35795	0	1.31
CG32181	1631451_at	317897	0	1.31
CG5466	1633986_at	42444	0	1.29
CG7384	1624425_at	34447	0	1.28
RpL28	1633905_at	38397	0	1.28
CG3221	1630533_at	37377	0	1.27
CG31918	1632694_at	326172	0	1.25
Ady43A	1641062_at	44750	0	1.25
CG1906	1631146_at	43481	0	1.25
CG13742	1631617_at	35916	0	1.24
CG31676	1630255_at	35351	0	1.24
CG9107	1623304_at	33843	0	1.24
	1640821_at		0.01	1.23
Nek2	1637523_at	31696	0	1.23
CG13397	1634468_at	46386	0	1.23
CG4686	1629695_at	42361	0	1.22
CG6934	1641302_at	41819	0	1.22
PGRP-SB1	1636490_at	39870	0	1.21
l(2)35Bg	1634344_at	49424	0	1.2

CG30007	1632352_a_at	36027	0	1.2
CG9890	1630982_at	37659	0	1.19
His1:CG31617	1629740_at	318854	0	1.19
CG7137	1638539_at	37204	0	1.18

## Tabla de genes regulados negativamente en el modelo de pérdida de función de hemipterus (Hep)

En la siguiente tabla se muestran los primeros 100 transcritos diferencialmente aumentados respecto del control ( $p < 0.05$ ). Los datos están ordenados por veces de cambio (expresados como  $\log_2$ ). Los números de  $p$  notados como cero corresponden a valores menores de 0.001.

<b>Símbolo</b>	<b>Sonda affy</b>	<b>LocusLink</b>	<b>Hep.p</b>	<b>Hep.fc</b>
dro5	1627327_at	38409	0	-7.12
Cyp4p2	1640566_at	35946	0	-4.96
CG5726	1633517_at	37082	0	-4.29
CG2177	1626088_at	43786	0	-4.1
CG13083	1641113_at	35230	0	-4.02
CG13794	1629637_at	34048	0	-3.87
CG32301	1624242_at	38285	0	-3.44
CG12480	1626827_at	32359	0.01	-3.35
MtnD	1631962_at	326270	0.02	-3.17
CG7465	1626616_at	38553	0.01	-3.15
CG12310	1640683_at	39634	0	-3.11
CG18777	1631558_at	59157	0	-3.06
lpod	1628843_at	31954	0	-3.01
CG32186	1629643_at	39977	0.01	-2.97
Cyp28d2	1624911_at	33748	0.02	-2.96
CG32189	1636516_at	317902	0.01	-2.95
CG4830	1623398_at	41477	0.01	-2.86
CG32572	1629410_at	32657	0	-2.85
MtnB	1630291_at	42424	0.01	-2.8
CG10170	1641664_at	42774	0	-2.8
CG7658	1641136_at	40355	0.01	-2.77
CG31789	1630692_at	318943	0.01	-2.71
CG8629	1626601_at	38781	0.01	-2.69
Lcp65Af	1626142_at	45017	0.02	-2.69
CG13067	1628261_at	39785	0.01	-2.68
CG9070	1641588_at	36196	0.02	-2.67
Jon44E	1639364_at	35853	0.02	-2.65

CG18594	1624979_at	42644	0.01	-2.63
CG7299	1630669_at	34468	0.03	-2.6
CG32266	1635413_at	317945	0.01	-2.59
CG10725	1638716_a_at	39510	0.01	-2.57
Jon65Aiv	1628800_at	38682	0.02	-2.56
CG13285	1639440_at	38623	0.01	-2.53
CG12934	1633862_at	36124	0.01	-2.53
CG6452	1630126_at	43204	0	-2.52
CG14565	1629731_at	40423	0.02	-2.48
CG8836	1640878_at	36349	0.01	-2.47
CG11852	1637900_at	43035	0.04	-2.46
CG9297	1636603_a_at	41688	0.01	-2.44
Peritrophin-15a	1636622_at	50433	0.01	-2.44
CG9468	1636395_at	34206	0.02	-2.43
GstE5	1624732_at	37110	0	-2.39
CG11370	1625894_at	40486	0	-2.38
CG6933	1632076_a_at	40214	0.02	-2.37
CG17290	1625558_a_at	36938	0.02	-2.36
CG32245	1626837_a_at	38562	0	-2.35
CG15515	1635140_at	43538	0.02	-2.35
CG8630	1624398_at	41629	0.03	-2.33
CG1368	1630670_at	32361	0.01	-2.32
CG14302	1641250_at	42252	0.01	-2.31
CG13230	1625066_at	50237	0.01	-2.31
fau	1638789_at	41291	0	-2.31
TotF	1626526_at	117461	0	-2.3
CG7017	1623981_at	40213	0.01	-2.3
CG11131	1635817_at	40511	0.01	-2.29
CG13990	1632017_at	50424	0.01	-2.29
CG18779	1627388_at	59159	0.01	-2.28
CG6416	1632121_a_at	38988	0.01	-2.27
CG18585	1632695_at	34041	0	-2.27
CG13361	1638223_at	31019	0	-2.25
Gpdh	1636311_at	33824	0	-2.25
CG32241	1626558_at	317934	0.01	-2.24
I(2)01289	1630402_at	46017	0.01	-2.23
fau	1633459_a_at	41291	0.01	-2.22
CG7710	1629435_at	42248	0.01	-2.21
CG13705	1632527_at	38587	0.02	-2.2
CG31436	1626326_at	318734	0	-2.19
CG6947	1626206_at	39360	0.01	-2.18
CG31198	1631537_at	318622	0.02	-2.18
CG5084	1626715_at	37051	0.01	-2.17

CG31672	1633843_at	48440	0	-2.16
CG10633	1633636_at	38616	0	-2.16
CG5023	1631167_at	42400	0.03	-2.15
CG10598	1633409_a_at	32713	0.02	-2.15
Zeelin1	1635372_a_at	41824	0.01	-2.15
CG12506	1623134_at	33249	0.01	-2.15
igl	1633157_a_at	36681	0.01	-2.14
CG5476	1629011_at	43207	0.01	-2.14
Jon25Bii	1639196_at	33707	0.02	-2.13
CG1468	1636119_at	31920	0.01	-2.13
CG33127	1626718_at	318893	0.01	-2.12
CG18649	1631350_at	39636	0.02	-2.12
CG31343	1626832_at	326133	0.01	-2.12
CG2064	1634019_at	35708	0	-2.11
CG6416	1629383_a_at	38988	0.01	-2.1
CG8157	1638301_at	36700	0.02	-2.09
Lcp65Ag2	1640975_at	38702	0.01	-2.08
CG8997	1629520_at	34799	0.01	-2.08
CG12116	1635987_at	31782	0.01	-2.08
CG33110	1634318_at	42659	0.02	-2.07
CG14120	1628823_at	39463	0.02	-2.06
CG17633	1625948_at	34297	0.03	-2.06
CG14240	1629588_at	43201	0.01	-2.05
CG7715	1629765_at	42251	0.01	-2.05
CG31086	1637350_at	43179	0.01	-2.05
CG30457	1623130_at	36940	0.01	-2.05
Zeelin1	1636600_a_at	41824	0.01	-2.05
CG32603	1632685_at	318109	0.01	-2.04
CG16884	1635483_at	34812	0.01	-2.04
Cyp4p1	1638053_at	45524	0	-2.02

# Dando las gracias

No hace falta aclarar que es difícil plasmar sentimientos en una hoja. No obstante, estoy convencido de que hoy es necesario hacerlo. Quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido junto a mí la realización de esta tesis. La gente que me conoce sabe que considero la profesión de científico como un trabajo social que se nutre de los pares al punto de terminar amalgamando proyectos, ideas, discusiones, almuerzos, viajes, moscas, cursos, rondas de mate, seminarios, congresos, asados de primavera, ratones desnudos, *lab-meetings*, charlas de pasillo, etc. A toda esta gran **Familia** le digo gracias por el apoyo, la colaboración, el ánimo en los momentos complicados y, sobre todo, el cariño y la amistad.

También me gustaría agradecer a la UBA, la Facu y los buenos profesores que supieron formarme como biólogo y científico. A la FIL, el CONICET, la Agencia de Promoción Científica, la Unión Europea y todas las fundaciones sin fines de lucro que apoyaron espiritual y económicamente los proyecto incluidos en este trabajo de tesis.

### **Del Instituto Leloir**

Quiero agradecer a Osvaldo por el espacio que me dejó ocupar en su lab. Por la dirección de esta tesis. Por mis primeros viajes como científico y todo el aprendizaje compartido.

A Amaicha, Andrea, Mariano A y Edgard por los experimentos a muchas manos, por los logros compartidos, por entenderme y apoyarme, por enseñar y aprender con gusto, por compartir la ciencia con una sonrisa.

A Andre por el cariño y el apoyo que me brindó desde su llegada al lab sin dejarse amedrentar por todo lo que se nos interponía (monitores, papeles y ficheros). Por su ayuda invaluable para terminar esta tesis.

A Ceci R y su paradoja de la *Coca light* bien fría junto a su cálida presencia. Por su ayuda incondicional durante todos estos años. Por su cariño interminable día a día a día a día...

A Lore por su gran ayuda en esta larga recta final (3x10E6 westerns). A Cecilia C por los resultados compartidos. A Ariel y Mariano por la minería de datos.

A Lachi y Andrés por esa amistad *beyond* de lab. Por la Kangoo nuestra de cada tarde. Por las moscas vividas y las charlas compartidas. Por el Tigre.

## Agradecimientos

A las pendex (Lore, Romi y Marian), a Jorchis, Dani, Mariano S, el flaco Viale, Vero, Cari, Fernanda L, Leo, Maxi, Mariana B, Nara Ale N y Gabriel.

A Caffè, Martín R y Ale R por que la ciencia se necesita tipos como uds.

A Mariana B (metro y medio de pura polenta) por saber compartir su escritorio con los *nonallizos* que fueron llegando a su vida.

A los chicos del 106 y Fernando por el larguísimo tiempo compartido, por los primeros adenos construidos en Argentina y por su gran ayuda en histología.

A la comunidad del pasillo del primer piso. Gente como uno remando por objetivos distintos y compartidos. Compañeros de trabajo, nada menos.

A la inconmensurable ayuda de Mónica y los chicos de la Biblio Cardini.

A Marta, Marcela, Fernando y todas las chicas del CIEMAT de Madrid con quienes pasé muy lindos momentos haciendo mi post-doc antes de doctorarme.

A los laboratorios de Pablo W, Gonzalo PG, Inés Bravo (Hospital Eva Perón), Enrique Martín Blanco (Parque Científico, Barcelona), y Fernando P que supieron abrir sus puertas para apoyar gran parte del proyecto. A Fabio y Fabricio por la parte animalística de esta tesis (Bioterio FIL y Bioterio de La Facultad de Veterinaria de la ULP respectivamente).

A Ielpi, Quesada, Algranati, Wolo, Claudia M, Graciela P, Guillermo M, Alberto Díaz y Darío Codner por su aliento en distintas etapas de esta tesis.

A Pancho, Mari, Laura, el Tano, Hugo y Víctor. Para ellos tengo pocas palabras y mucho que agradecer. A Ana por todo su trabajo en cultivo, nuestra foto del armario y aquel experimento compartido. A Hilda, esa loca linda. A Dora y los chicos de administración por su laburo cotidiano.

A aquellos que alimentaron nuestro “espíritu” científico durante todos estos años: Nieves, Mamá Tomasa, Los tres 2, S<sup>ta</sup> María, Delly y las medialunas del Abuelo.

### **De la vida misma**

Quiero agradecerle a Ile por su apoyo constante, por los proyectos de vida compartidos y, principalmente, por su amor.

A mis hijos Joaquín (el que ama las celulitas, las moleculitas y la Naturaleza toda), Agustín (el tímido, el curioso y el preguntón de la familia) y Santino (quien se apersonó

## Agradecimientos

un 16 de septiembre para no perderse de la tesis) por hacer que mi vida tenga sentido con el sólo hecho de verlos sonreír.

A los pueblos de Tandil y Junín por haber moldeado con su tierra fértil a dos personajes clave de mi vida como científico y hombre libre. Gracias por todo Gogo y Derli.

A mi hermana Flor y mi cuñado Sergio (Jey-Jey) por su gran cariño y amor para con nosotros y nuestros hijos. Flor de tíos! Los queremos un monton!

A Gabi por lo que vivimos juntos, por tus secretos compartidos, por tus charlas filosóficas de gran altura bordeando el abismo de lo desopilante, por tu gran cariño. Quiero dedicarte este pequeño logro que para mí tiene un gran valor.

A Cacho y Gorda por sus palabras de aliento, el afecto y el cariño. Por el cantin!

A Martín, Estani, Diego y Pol. Por seguir siendo Murguistas. Por seguir siendo amigos. Gracias Estani por tenerme siempre presente en tus proyectos.

A Pablo F, Diego G, Vani, Carli y Flor K. A los chicos del Normal 8 por estar cerca de pesar de los años y la distancia. A Chachi por haberse abierto a todo sin decir ni mu. A Grancha por su *utopía* conseguida. A Lisa por su diseño siempre presente en mis tesis...

A Dan y UADE por la oportunidad que nos dieron de generar, durante estos últimos años, un proyecto docente 100 % propio.

A Guille (*New Station*) y Matías (*Katmandú*). Lindos personajes de mi vida.

### **De leyendas y objetos inanimados con historia**

A la radio plateada del abuelo Antonio con el dial clavado (antiguo lab 212)

A la lámpera, al mate de chapa azul, al termo del ojo y a la música de Kevin.

A las leyendas del empalado, el enmascarado, Cocot y el galpón de Freddy Krueger.

A los bagels con quesito Philadelphia que impuse junto a Álvarez como el obsequio más esperado después de un viaje a USA.

Al famoso "TC" o "tal cual" (heredado de Gabi Pittis y tan bien aceptado por el 106 y 107).

**Gracias a todos!**