

Tesis Doctoral

Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc

Girotti, María Romina

2010

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

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

Cita tipo APA:

Girotti, María Romina. (2010). Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Girotti, María Romina. "Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES DE PROGRESIÓN TUMORAL
RELACIONADOS CON LA PROTEÍNA SPARC.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Bioq. María Romina Girotti

Directora de tesis: Dra. Andrea Sabina Llera

Consejero de Estudios: Dr. Ricardo Wolosiuk

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, CONICET

Buenos Aires, 2010.-

*A mis padres,
mi principal ejemplo de esfuerzo y sacrificio.*

*Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.*
(Isaac Newton; 1642-1727)

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE PROGRESIÓN TUMORAL RELACIONADOS CON LA PROTEÍNA SPARC.

Resumen

SPARC (*proteína secretada ácida y rica en cisteínas*) es una glicoproteína sobreexpresada en una gran variedad de tumores favoreciendo la progresión tumoral y metástasis. Su rol biológico ha sido demostrado además en remodelación de tejidos, migración celular endotelial, morfogénesis y angiogénesis.

Nuestro laboratorio ha demostrado que la transfección estable de células tumorales de melanoma con una secuencia de ADN antisentido de SPARC, promovió la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo murino *in vivo*. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales SPARC ejerce su efecto protumoral. Esta tesis de doctorado se enfocó en la búsqueda de intermediarios moleculares por los cuales SPARC favorece la progresión tumoral. Mediante análisis proteómicos globales aplicados al modelo de melanoma humano con disminución forzada de la expresión de SPARC, pudimos dilucidar un mecanismo molecular por el cual SPARC actúa sobre la progresión tumoral. Esta vía se centra en el eje TGF β 1/ colágeno tipo I/ integrinas α 2 β 1 a través del cual SPARC regula la invasividad celular mediada por catepsina B. Por otro lado, se demostró que SPARC induce el cambio de E- a N-caderina de membrana permitiéndoles a las células de melanoma transmigrar a través de una monocapa de células endoteliales mediante un mecanismo molecular independiente al descrito para la inducción de catepsina B. Además, las células deficientes en SPARC presentaron una expresión disminuida de genes asociados con propiedades mesenquimales revelando que SPARC está involucrada activamente en la transición epitelio-mesenquimal y en la progresión metastásica.

Palabras clave: SPARC, proteómica, cáncer, melanoma, transición epitelio-mesenquimal

A PROTEOMIC ANALYSIS OF SPARC-RELATED MOLECULAR MECHANISMS OF TUMOR PROGRESSION

Abstract

SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteins*) is a secreted glycoprotein related to tumor progression and metastasis and overexpressed in different tumors. Its role has been described in several biological processes that include tissue remodelling, endothelial cell migration, morphogenesis and angiogenesis. Our laboratory showed that the stable transfection of tumor cells with antisense SPARC DNA abolished tumorigenicity in an in vivo melanoma murine model. However, little is known about the molecular mechanisms affected by SPARC during tumor growth. This thesis was focused in the search of molecular mediators of SPARC protumoral effect and to address this objective a proteomic strategy was applied. Global protein expression analysis of the melanoma proteome following enforced downregulation of SPARC expression led us to elucidate a molecular mechanism where SPARC makes use of TGF β 1/collagen I and integrin α 2 β 1 to promote cathepsin B-mediated melanoma invasiveness. SPARC also induces E- to N-cadherin switch enabling melanoma cells to transmigrate across an endothelial layer through a mechanism that does not involve the molecular mediators showed for cathepsin B. In addition, SPARC-deficient cells also exhibited decreased expression of genes associated with the acquisition of mesenchymal traits revealing that SPARC plays a key role in the promotion of epithelial to mesenchymal transition and melanoma aggressiveness.

Key words: SPARC, proteomics, cancer, melanoma, epithelial-mesenchymal transition

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

-María Soledad Sosa, **María Romina Girotti***, Edgardo Salvatierra, Federico Prada, Juan Antonio López de Olmo, Silvia Juárez Gallango, Juan Pablo Albar, Osvaldo Luis Podhajcer and Andrea Sabina Llera. *"Proteomic analysis of melanoma cells identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells"*.

Proteomics. Nov 12;7(22):4123-4134. 2007.

* Primera autoría compartida.

- Podhajcer OL, Benedetti L, **Girotti MR**, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. *"The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host."*

Cancer Metastasis Rev. 2008 Dec;27(4):691-705. Review.

- Fernández Elmer A., **Girotti María R.**, López del Olmo Juan, Llera Andrea S., Podhajcer Osvaldo L., Cantet Rodolfo J. C., Balzarini Mónica. *"Improving 2D-DIGE protein expression analysis by two-stage linear mixed models: Assessing experimental effects in a melanoma cell study"*.

Bioinformatics. 2008 Dec 1;24(23):2706-12. Epub 2008 Sep 25.

- Andrea Sabina Llera, **Maria Romina Girotti**, Lorena Gabriela Benedetti, Edgardo Salvatierra and Osvaldo Luis Podhajcer. *"Matricellular proteins and inflamMatory cells: A task force to promote or defeat cancer?."*

Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Feb;21(1):67-76. Epub 2009 Dec 16.

-**María Romina Girotti**, Marisol Fernández Rodríguez, Juan Antonio López del Olmo, Emilio Camafeita' Elmer Fernández, Juan Pablo Albar, Osvaldo Luis Podhajcer and Andrea Sabina Llera. *"SPARC promotes cathepsin B-mediated invasiveness through a collagen I/TGF β 1/integrin α 2 β 1 axis during mesenchymal transformation of melanoma cells."*

Será enviado a evaluación a mediados de agosto de 2010.

Agradecimientos

- Quiero agradecerle a Andre por haberme guiado en este camino del doctorado, por haberme permitido crecer en el laboratorio, por haber dirigido esta tesis, por haber promovido colaboraciones científicas que me ayudaron a manejar nuevas técnicas y a conocer nuevos horizontes, por apoyarme en cada beca a la que me quise presentar, por permitirme ejercer la docencia durante la etapa de tesis, por tu confianza en mí, gracias...totales.
- A Osvaldo por darme un lugar (y un escritorio) para trabajar en el laboratorio, por las discusiones científicas, por la financiación de aquel viaje a Roma en el 2005, cómo olvidarlo!
- A mis padres, Pity y el gordo, por el amor que me dan, por apoyarme siempre en todo, por aguantar la distancia que nos separa, por estar siempre ahí para ayudarme, por darme el coraje y las fuerzas para alcanzar nuevos objetivos, por haberme permitido obtener la educación que me ayudó a llegar a estas instancias, por ser mi principal ejemplo de esfuerzo y sacrificio, por saber que siempre están ahí para lo que los necesite, por tanto y por todo, los amo. A ustedes les dedico esta tesis.
- A mi amada hermana Añi, por todo su amor, por ser además de una hermana una amiga, por haberme apoyado a que esté acá aunque siempre me pidas que vuelva, por nuestro vínculo que va mas allá de todo, por ser incondicional, por existir.
- A Santi, por haberme dado bola al fin!! por estar siempre, por bancarte mi carrera, por acompañarme, por tu alegría, por hacerme reír, por los mates mientras escribía esta tesis, por confiar en mí, por darme fuerzas, por aguantarte mi humor después de 16 hs de trabajo, por ser tan generoso, por ser mi gran compañero, te amo.
- A mi querida amiga Gracy, por nuestra gran amistad, como no agradecerte por haber estado todos estos años juntas, cuanto que hemos compartido y seguiremos compartiendo, por haber crecido juntas, te agradezco por ser mas que una amiga una hermana, por escucharme, por ser mi consejera, por apoyarme, por darme fuerzas, por saber que siempre puedo contar con vos para todo, por ser incondicional, te adoro Gracy!!
- A Lore, por tanto compartido, nuestros primeros viajes a simposios, los interminables viajes a UADE, por compartir mas que la mesada del laboratorio, por haber crecido juntas en esta etapa, por las catarsis cotidianas, por el día a día.

- A mis amigos de Bahía: Verito, Maru, Romi y Lu, por haber seguido nuestra amistad a pesar de la distancia luego de estos 6 años y medio desde que me fui de Bahía. Por saber que puedo contar con ustedes, los quiero muchísimo.
- A mi familia, especialmente a mi abuela Catalina, quien siempre se alegra por mis logros. Gracias por tus alfajores de maizena y por el dulce de membrillo que me hacés con tanto cariño.
- A Cari, por nuestro posgrado paralelo en moda, accesorios y deportes, por tu amistad, por haberme contagiado tu entusiasmo por correr, por hacer mas divertido el día a día en el laboratorio, por tus ideas disparatadas, por haberme hecho conocer Londres en un city tour guiado de 12 horas... por nuestro Leo 2X y la clase de abdominales de Kent.
- A Ceci, por esa ternura maternal que nos cuida a todos en el labo, por tu inconmensurable cariño, por estar siempre dispuesta a dar una mano o a ofrecer un café, gracias Ceci!!!!
- A Doris, por tu amistad, por nuestras revistas compartidas, gracias por recibirme con una sonrisa todos los días y por saber que puedo contar con vos.
- Al grupo de los pavos navideños: Cari, Rodo, Lore, Gracy y Vero, por generar una tradición que no se pierde...por compartir cenas, té y buenos momentos...
- A Fede, por haberme defendido en las primeras reuniones de grupo allá por el 2004, por compartir algunos años de nuestros doctorados, por ser un amigo, por hacernos reir con tus anécdotas.
- A todos mis compañeros de laboratorio Diegui, Marie, Lu, Leo, Vero, Ed, Caffé, Santi, Marce, por el día a día, por los mates y cafés, por las consultas cotidianas.
- A Florcis y Pía, por su calidez, por haberme permitido enseñarles algo de lo que aprendí.
- A los vecinos del 106, con quienes compartimos mas que anticuerpos, por la buena onda.
- A Marisol, mi querida amiga venezolana, quien me abrió las puertas de su casa en Madrid donde siempre me recibe con los brazos abiertos, gracias por haberme enseñado a hacer geles de DIGE y arepas, gracias por tu amistad y generosidad, por tu ternura, por el ponche crema y demás bebidas espirituosas, por tantos momentos divertidos que pasamos juntas, por tu cariño.

- Gracias a todos aquellos que me permitieron trabajar y aprender en sus laboratorios, especialmente a Juan Antonio, quien me abrió las puertas de su laboratorio en el 2006 cuando se rompió el espectrómetro del CNB. Gracias por todo el trabajo que hicimos juntos en estos años que me permitió aprender mucho y sin el cual no podría haber terminado esta tesis. Gracias por haberme recibido tan afectuosamente cada vez que fui, por ayudarme y aconsejarme, por las cartas de recomendación, por tu generosidad, por haberme hecho sentir como en mi casa en tu laboratorio, por haber aguantado ese carácter que tengo...
- Gracias a Emilio y Enrique, dos referentes de la espectrometría de masas, gracias por haberme enseñado algo de lo que ustedes saben hacer, por haber pasado días tan divertidos en Madrid (y en Pamplona)...
- A Elmer, aunque nunca entendí lo de los nodos variables en estadística, gracias por todos tus análisis de datos, por tus clases de estadística, por el curso CABBIO y la programación en R (que tampoco entendí), gracias por tu amistad y por la buena onda.
- A Albert (DAN) por haber confiado en mí cuando fui a decirte que quería dar clases en la UADE, por tus inventos “brillantes”, gracias por haberme dado un lugar en la universidad.
- A la UADE por permitirme ser docente de tantos alumnos, por dejarnos ser parte de un proyecto docente en el que pudimos aportar libremente.
- A todas las instituciones que apoyaron económicamente mi trabajo de tesis y los proyectos científicos presentados: CONICET, AFULIC, Instituto Leloir, International Union Against Cancer, Fundación Bunge y Born, Fundación Boehringer Ingelheim, Journal of Cell Science, y European Molecular Biology Laboratory.
- Finalmente quiero agradecer a toda la gente que trabaja en la FIL por su gran trabajo cotidiano que mantiene al instituto, a Pancho por los deliciosos asados de la primavera y las tortafritas del mundial, a Ana, a los chicos del droguero, a los chicos de soporte que siempre solucionan nuestros problemas con la informática, a la gente de Biblioteca por proveernos en tiempo record de todos los que papers que les solicitamos, gracias a todos.

Indice

- RESUMEN	iii
- ABSTRACT	iv
- Agradecimientos	vi
- INTRODUCCION GENERAL	1
Cáncer: Un conjunto de enfermedades, un gran desafío	1
Por qué investigar en cáncer?.....	1
El cáncer a nivel celular.....	1
El microambiente tumoral y el proceso de invasión.....	4
Melanoma.....	6
SPARC: una proteína de la matriz extracelular	10
Dándoles a las células un contexto: la Matriz extracelular.....	10
SPARC, nuestra proteína de estudio.....	11
Estructura y regulación del gen de SPARC.....	12
Características estructurales y bioquímicas de SPARC.....	13
Proteínas homólogas a SPARC.....	16
Expresión de SPARC.....	17
Funciones biológicas de SPARC en tejidos normales: antiproliferación y antiadhesión.....	17
Interacción de SPARC con otras proteínas.....	19
Interacción entre SPARC y Colágeno tipo I.....	21
Interacción entre SPARC y TGF- β 1.....	22
SPARC y Tumores	24
Controversias del rol de SPARC en cáncer: pro o antitumoral.....	24
SPARC: rol protumorigénico y prometastásico.....	24

SPARC: también una proteína antitumoral.....	28
SPARC en melanoma, nuestro modelo de estudio.....	29
Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: angiogénesis.....	31
Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: inflamación.....	31
Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: Transición Epitelio-Mesenquimal.....	33
Proteómica: una herramienta con alto rendimiento.....	35
Qué es la proteómica?.....	35
Estrategia de trabajo en proteómica.....	36
Electroforesis bidimensional.....	37
DIGE (difference gel electrophoresis)	40
Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	42
Identificación de las proteínas por huella peptídica.....	45
La metodología iTRAQ para la cuantificación e identificación por espectrometría de masas basada en LC-TQ Orbitrap	46
- HIPOTESIS DE TRABAJO.....	49
- OBJETIVO GENERAL.....	49
- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	49
- MODELOS DE ESTUDIO.....	50
- RESULTADOS.....	52
 CAPITULO I: Análisis proteómico del secretoma y extractos de líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC.....	52
Uso de la tecnología DIGE en la búsqueda de proteínas reguladas por SPARC.....	52
Caracterización del secretoma por iTRAQ y espectrometría de masas basada en LC-TQ Orbitrap.....	56

Análisis ontológico de los resultados obtenidos por proteómica.....	59
CAPITULO II: Validaciones técnicas y biológicas de las proteínas diferenciales seleccionadas.....	62
Criterio de selección de los resultados obtenidos por proteómica para su posterior validación.....	62
Validación técnica de las proteínas seleccionadas.....	63
Análisis de las formas moleculares expresadas diferencialmente de catepsina B.....	64
Análisis de las formas moleculares expresadas diferencialmente de N-caderina.....	66
Validación biológica de catepsina B.....	67
Validación biológica de N-caderina.....	71
CAPITULO IIIa: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas. Análisis del rol de catepsina B en la progresión tumoral mediada por SPARC.....	74
Rol del colágeno tipo I en la regulación de la secreción de catepsina B.....	79
Rol del TGFβ1 en la regulación de la secreción de catepsina B.....	83
CAPITULO IIIb: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas. Análisis del rol de N-caderina en la progresión tumoral mediada por SPARC.....	89
- DISCUSION.....	94
CAPITULO I: Análisis proteómico del secretoma y extractos de líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC.....	94
Interpretación de los datos obtenidos por proteómica del secretoma.....	94
SPARC y el primer indicio de control sobre la Transición Epitelio Mesenquimal.....	97
CAPITULO II: Validaciones técnicas y biológicas de las proteínas diferenciales seleccionadas.....	98
Por qué es necesario validar las proteínas?.....	98
Validación técnica y biológica de catepsina B.....	99

Validación técnica y biológica de N-caderina.....	101
Validación técnica de otras proteínas involucradas en el proceso de Transición Epitelio – Mesenquimal.....	102
Interpretación global de los resultados obtenidos en proteómica de secretoma y extractos celulares.....	103
CAPITULO III: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas.....	105
Análisis del rol de catepsina B en la progresión tumoral mediada por SPARC.....	105
Secreción de catepsina B mediada por SPARC: rol del colágeno tipo I.....	106
Secreción de catepsina B mediada por SPARC: rol del TGFβ1	108
Análisis del rol de N-caderina en la progresión tumoral mediada por SPARC.....	109
- CONCLUSION.....	111
- MATERIALES Y METODOS.....	113
Cultivos Celulares.....	113
Mantenimiento de los cultivos celulares	115
Generación de un vector lentiviral llevando un ARN de interferencia para SPARC.....	115
Purificación de SPARC humana a partir de medios condicionados.....	116
Obtención de vectores adenovirales.....	116
Obtención de medios condicionados.....	116
Obtención de extractos celulares.....	117
Marcaje don fluoróforos para DIGE (differential in gel electrophoresis).....	118
Isoelectroenfoque (primera dimensión).....	119
Electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión).....	121
Obtención de imágenes y procesamiento de las mismas.....	122
Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	122
Marcaje y diseño experimental de la metodología ITRAQ.....	124
Identificación por LC-TQ Orbitrap.....	124
Western blot.....	125
Northern blot.....	126

PCR en tiempo real.....	126
Análisis del crecimiento tumoral in vivo.....	127
Ensayo de actividad enzimática de catepsina B.....	128
Crecimiento de las células sobre sustratos específicos.....	128
Citometría de flujo.....	128
Inmunohistoquímica.....	129
Inmunocitoquímica.....	130
Ensayo de invasión en Matrigel.....	130
Ensayo de migración transendotelial.....	131
Análisis estadístico.....	132
ANEXO I. Proteínas diferenciales obtenidas por análisis proteómico por metodología DIGE....	
133	
ANEXO II. Reactivos utilizados en proteómica y soluciones utilizadas en cultivo celular.....	142
ANEXO III. Referencias bibliográficas correspondientes a las Tablas 5 y 6.....	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

Introducción General

Cáncer: un conjunto de enfermedades, un gran desafío

Por qué investigar en cáncer?

La proporción actual de la población mundial que se encuentra en riesgo de padecer cáncer representa un dato alarmante: una de cada tres personas desarrollará cáncer y de aquellos que desarrollen la enfermedad uno de cada cuatro hombres y una de cada cinco mujeres morirá a causa de esta patología. Las estadísticas indican que el cáncer representa hoy la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares y con proyecciones de convertirse en la primera. (American Cancer Society, estadísticas 2009, www.cancer.org).

Frente a este desalentador panorama, el alivio del sufrimiento humano y el reto intelectual de un problema casi sin igual en cuanto a complejidad e impacto en la salud, son los dos factores principales que motivan la investigación del cáncer. Preguntas tales como: ¿Cómo se genera? ¿Cómo evitarlo? ¿Cómo tratarlo? surgen tanto en personas ligadas a la medicina y la ciencia como en aquellas que no. Desde nuestro lado, se trata de contestarlas mediante la investigación, y aunque nuestro aporte pueda ser ínfimo ante tal reto nos queda la esperanza de que el resultado del trabajo en conjunto logre encontrar la respuesta a semejante enigma.

El cáncer a nivel celular

En el año 1837 Johannes Müller describía que el cáncer “estaba hecho de células” (Müller, 1837), un descubrimiento que sería el punto de partida para años de investigación que se enfocarían en tratar de encontrar cuales son las diferencias entre las células normales y las tumorales. El esfuerzo puesto en combatir esta enfermedad condujo a grandes descubrimientos en la biología celular: se descubrieron proteínas cuyas anomalías funcionales estaban directamente ligadas a procesos de reparación del ADN, señalización celular, ciclo celular y apoptosis, crecimiento descontrolado, aumento de la división celular, disminución de muerte celular y otras características típicas de las células cancerosas.

En la actualidad se acepta que el cáncer, palabra de origen griego *karkinos* que significa “cangrejo”, es un desorden molecular en las células que surge como consecuencia de alteraciones genéticas que conducen

a la transformación progresiva de las células normales a malignas (Hanahan and Weinberg, 2000). Mediante el análisis patológico de distintos órganos se reveló la existencia de lesiones que podrían representar un estadio intermedio del proceso a través del cual las células evolucionan progresivamente desde la normalidad hacia la malignidad (Foulds, 1954). La observación de modelos experimentales en cáncer tanto en ratones como en humanos llevó a postular que el desarrollo tumoral procede a través de un mecanismo de evolución darwiniana en la cual una sucesión de cambios genéticos que confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento celular, conduce a la conversión progresiva de una célula normal a una cancerosa (Nowell, 1976).

En la actualidad, existe consenso científico en cuanto a 6 características que comparten las células tumorales, independientemente del órgano en el cual se desarrollen: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), ilimitado potencial replicativo, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000) (**Figura 1**).

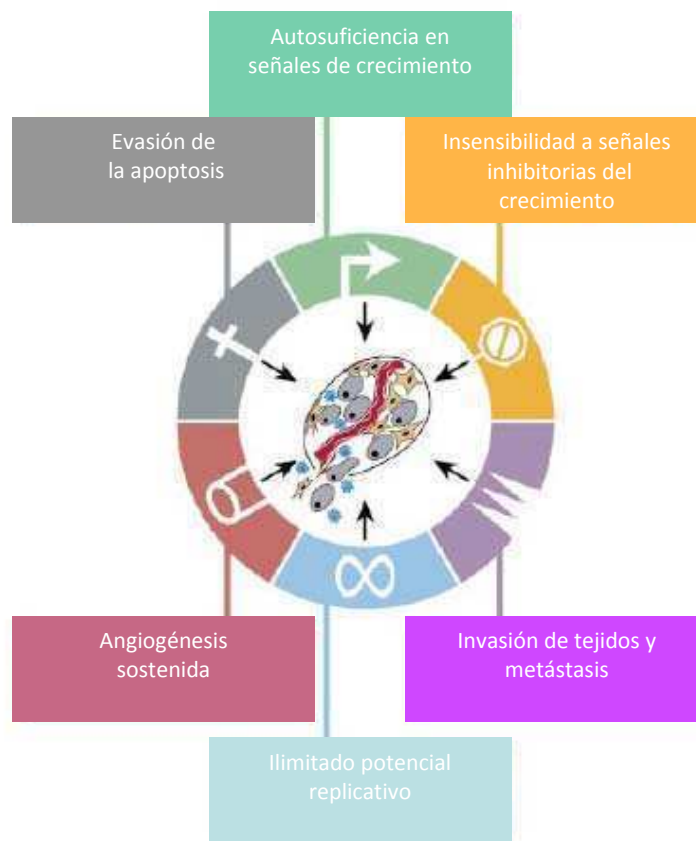


Figura 1. Capacidades adquiridas de las células cancerosas. A través de diferentes estrategias las células tumorales adquieren capacidades funcionales durante el proceso de malignización. Adaptado de Hanahan *et al.* (Hanahan and Weinberg, 2000).

Autosuficiencia en señales de crecimiento: las células normales requieren de señales mitogénicas de crecimiento para poder pasar de un estado quiescente a un estado replicativo. Estas señales son transmitidas a la célula a través de receptores de membrana que se unen a distintas moléculas de señalización (proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento solubles, moléculas de adhesión). Ninguna célula normal puede proliferar en ausencia de estas señales de crecimiento. Sin embargo, en las células tumorales, muchos oncogenes mimetizan el efecto de los factores de crecimiento favoreciendo el crecimiento en forma independiente de las señales externas. Por otro lado, las células tumorales son capaces de sintetizar y secretar sus propios factores de crecimiento activando la proliferación de células vecinas (efecto parácrino) o su propia proliferación (efecto autócrino) Esta liberación del control de la proliferación o dependencia exógena, altera en gran medida la homeostasis celular que opera para asegurar el normal comportamiento celular dentro de un tejido.

Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento: en un tejido normal existen múltiples señales inhibitorias del crecimiento que operan para mantener la quiescencia y homeostasis celular. Estas señales inhibitorias incluyen factores solubles inmovilizados en la matriz extracelular. Las células tumorales evaden el control de los puntos de chequeo permitiendo que la proliferación avance en las distintas etapas del ciclo celular.

Evasión de la apoptosis: la adquisición de resistencia a la apoptosis es un evento crítico en la carcinogénesis. La sobreexpresión o mutación de oncogenes pueden llevar a la supresión de la apoptosis y mayor supervivencia. Las mutaciones adquiridas por las células tumorales las llevan a ignorar las señales de muerte y continuar proliferando, lo que aumenta el riesgo de nuevas mutaciones y por ende, la progresión maligna. Una de las mutaciones más comunes (en más del 50% de los cánceres humanos) es en el gen supresor p53. También se han detectado mutaciones en las vías PI3K y en las proteínas Bcl-2, RAS y SRC.

Ilimitado potencial replicativo: las células normales en cultivo tienen un potencial replicativo finito: luego de un determinado número de duplicaciones, dejan de replicarse y entran en estado de senescencia. Las células tumorales poseen ilimitado potencial replicativo *in vitro*, siempre que sean provistas de nutrientes y factores de crecimiento. La expectativa de vida de una célula depende en gran medida del acortamiento de los extremos de los cromosomas, los telómeros, que ocurre cada vez que la célula se divide. Cuando se alcanza una longitud límite del telómero, las células entran en estado de senescencia replicativa. En las células tumorales, la telomerasa (que utiliza ARN como molde para replicar ADN telomérico) se encuentra en niveles altos de expresión encargándose del mantenimiento de la longitud de los telómeros como mecanismo esencial para la adquisición de inmortalidad.

Angiogénesis sostenida: el oxígeno y los nutrientes aportados por la vasculatura son cruciales para la función celular y la supervivencia. Las células tumorales deben desarrollar la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos para proveer de oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento. Para esto, la estrategia es balancear positivamente la expresión de factores proangiogénicos, por ejemplo VEGF (*vascular endothelial growth factor*) quien se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los tumores comparado con sus contrapartes normales.

Invasión de tejidos y metástasis: tarde o temprano la mayoría de los tumores invaden tejidos adyacentes y viajan a sitios distantes del tumor primario donde pueden desarrollar nuevas colonias de células en el proceso que se conoce como metástasis. Estas metástasis son las causantes del 90% de las muertes por cáncer (Sporn, 1996). Al igual que en el tumor primario, la metástasis exitosa depende de la adquisición de las características nombradas previamente. Adicionalmente, dos cambios principales ocurren en las células para favorecer el proceso de invasión y metástasis: cambios en el perfil de expresión de proteínas de adhesión y cambios en el patrón de secreción de proteasas.

Es importante destacar que el resultado de la progresión tumoral depende, además de las capacidades adquiridas nombradas previamente, de la interacción de la célula tumoral con su microambiente. Este tema es introducido a continuación.

El microambiente tumoral y el proceso de invasión

Varios autores han postulado al cáncer como el resultado de un desbalance patológico de las sociedades constituidas entre las células y los tejidos (Brown et al., 1999; Hanahan and Weinberg, 2000; Park et al., 2000). La malignidad de una célula tumoral es un estado que emerge del microambiente comprendido entre el tumor y el huésped en el cual el huésped participa en la inducción, selección e invasión de las células neoplásicas. En este contexto, las células tumorales reclutan vasculatura y estroma a partir de la producción y secreción de factores de crecimiento y citoquinas (Brown et al., 1999). A su vez, el microambiente tumoral “activado” por el huésped (compuesto por células y componentes extracelulares) modifica el comportamiento proliferativo e invasivo de las células tumorales.

La arquitectura tisular normal, mantenida por la membrana basal que delimita los límites de los tejidos y órganos y por la comunicación célula-célula, restringe la mezcla inapropiada de células de diferentes tipos. De esta forma, las células permanecen confinadas al tejido al cual corresponden debido al control ejercido por la intercomunicación con células vecinas y con la matriz extracelular (MEC). Sin embargo, las células malignas son resistentes a las señales regulatorias ejercidas por su contexto social.

Existen situaciones normales en las que células de un determinado tipo deben invadir tejidos para cumplir su función normal. Es así como los procesos de neovascularización, cicatrización de heridas y

crecimiento de neuritas, son ejemplos de procesos invasivos fisiológicos. En respuesta a factores tróficos, las células vasculares, las capas de células epiteliales o las neuritas, migrarán, penetrarán las barreras tisulares y establecerán nuevos procesos de anastomosis (Liotta and Kohn, 2001). Los procesos de invasión fisiológica y maligna usan mecanismos moleculares similares, la diferencia es que el proceso maligno persiste hasta desestabilizar la arquitectura normal de los tejidos afectados (Liotta et al., 1991). Las células malignas estimulan en forma perpetua a las células vasculares y estromales del huésped a conducir el proceso invasivo. De esta manera, las células vasculares migran e invaden hacia adentro de la masa tumoral mientras que las células tumorales migran e invaden en dirección opuesta. La activación del microambiente local parece generar un entorno permisivo para las células malignas (**Figura 2**).

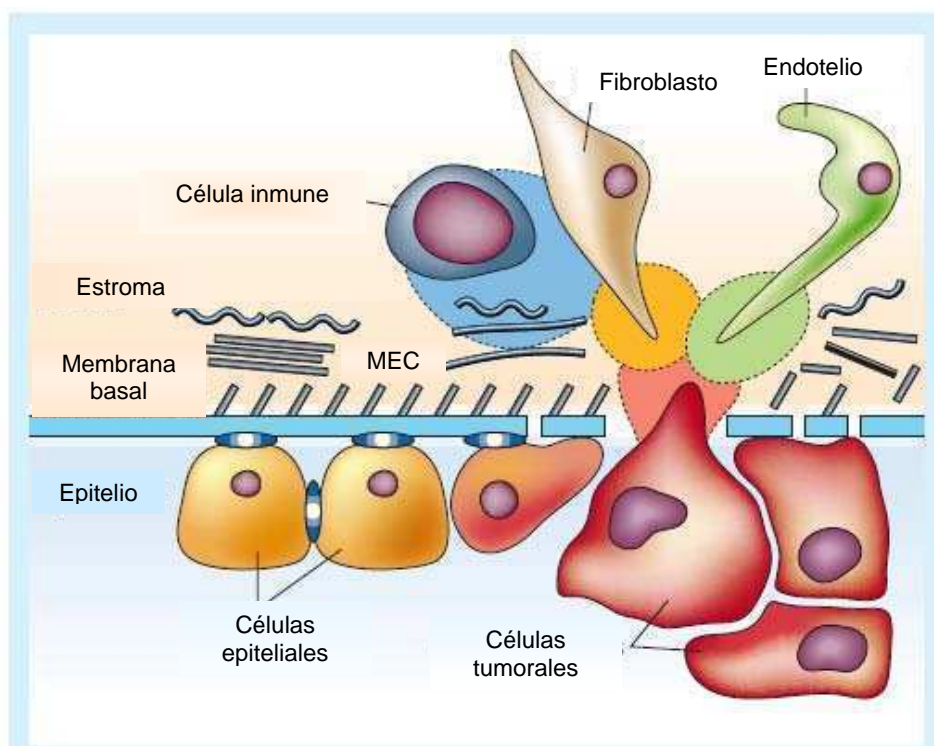


Figura 2. Microambiente huésped-tumor y el campo invasivo. El carcinoma invasivo es representado como una patología de múltiples sociedades celulares. La transición a carcinoma invasivo es precedida por la activación de fibroblastos del huésped, células inmunes y células endoteliales. La invasión ocurre en una zona de contacto y cooperación entre las células estromales y el epitelio pre-maligno. El intercambio de citoquinas y enzimas entre las células participantes estimula la migración de ambos tipos celulares (en sentidos opuestos) y modifica la matriz extracelular adyacente. El resultado de esta interacción es la ruptura de los límites normales de los tejidos. Adaptado de Liotta y Kohn (Liotta and Kohn, 2001).

Recientemente los autores Kristian Pietras y Arne Ostman (Pietras and Ostman, 2010), han revisado los conceptos descritos por Hanahan hace 10 años, quien describía los cambios celulares que una célula tumoral presenta y que se denominaron “the hallmarks of cancer” o “los sellos del cáncer”. En la revisión actual, se plantea que las células tumorales no actúan solas y que el crecimiento tumoral y la metástasis

son el resultado de la subsistencia tumoral en un microambiente enriquecido por células estromales como fibroblastos, células endoteliales, pericitos, leucocitos y matriz extracelular.

En cáncer, la invasión inicia el proceso metastático mediante la adhesión y deadhesión de las células tumorales a otras células (normales o tumorales o a componentes de la matriz), la degradación proteolítica del tejido circundante y la movilidad a través de esas matrices desorganizadas. La repetición cíclica de estos tres procesos permite a la célula tumoral penetrar los tejidos vecinos y acceder eventualmente a la circulación sanguínea.

El proceso de invasión está acompañado por un aumento de enzimas proteolíticas activas, capaces de degradar matriz y proveer una vía de evasión a la célula tumoral, estas enzimas proteolíticas incluyen las serinoproteasas (plasmina), las metaloproteasas (MMP1, MMP2, MMP9, MT-MMP), las cisteín-proteasas (catepsina B, L y X) y las aspartil- proteasas (catepsina D). Uno de los principales blancos de estas enzimas proteolíticas es la membrana basal, un tipo especial de matriz extracelular (ver apartado Dándoles a las células un contexto: la matriz extracelular).

Las células tumorales y las que forman parte del estroma tumoral producen mayor cantidad de estas enzimas en comparación con las células normales de igual estirpe. Por otro lado, la actividad de estas enzimas está regulada en parte por los inhibidores endógenos. En los tumores, el balance entre proteasas e inhibidores se desplaza hacia la degradación proteolítica, estableciendo un fenotipo invasivo y metastático.

Melanoma

El *melanoma* es un cáncer que se origina en los melanocitos. Entre los diferentes tipos de cáncer, el melanoma es uno de los más agresivos. Los melanomas surgen normalmente por transformaciones malignas de los melanocitos de la piel, aunque pueden surgir desde melanocitos no cutáneos como los que rodean la capa coroidal del ojo o las meninges. Entre otros nombres para este tipo de cáncer se encuentran los de melanoma maligno y melanoma cutáneo o más frecuentemente melanoma cutáneo maligno (CMM).

El melanoma es responsable del 80% de las muertes provocadas por cáncer de piel y sólo el 14% de los pacientes con melanoma metastático logran sobrevivir más de 5 años. Los factores de riesgo más fuertes para melanoma son una historia familiar de melanoma, múltiples nevos-benignos (lunares) o pecas, ojos claros, pelo colorado y un melanoma previo. La exposición a rayos UV es un importante factor ambiental que favorece la aparición de melanoma ya que agrede y desestabiliza la piel, afectando la función inmune cutánea y generando la formación de especies reactivas de oxígeno que causan daños en el ADN de melanocitos y queratinocitos (Thompson et al., 2005). El bronceado de la piel es una medida defensiva

contra dicha agresión donde los melanocitos sintetizan melanina y la transfieren a los queratinocitos , allí la melanina absorbe y disipa la energía ultravioleta (Gilcrest et al., 1999).

Para entender la génesis del melanoma y el contexto en el cual se encuentran las células es de fundamental importancia conocer el órgano en el cual se encuentran. La piel humana es un órgano complejo compuesto de dos capas, la epidermis y la dermis, separadas por una membrana basal (**Figura 3**). En la epidermis, los queratinocitos proveen una barrera primaria hacia el ambiente externo mediante continua autorrenovación mientras que los melanocitos se encuentran en la membrana basal entre la unión epidermis-dermis donde producen el pigmento protector melanina el cual es transportado y cedido a los queratinocitos protegiéndolos de los efectos dañinos de los rayos ultravioletas (UV). A pesar de la dinámica celular que existe en estas capas, la proliferación de los melanocitos es controlada estrictamente y prácticamente no ocurre en condiciones fisiológicas. La dermis presenta componentes mesenquimales: fibroblastos y vasos sanguíneos y linfáticos, los cuales proveen soporte mecánico y nutricional, rigidez y espesor a la piel.

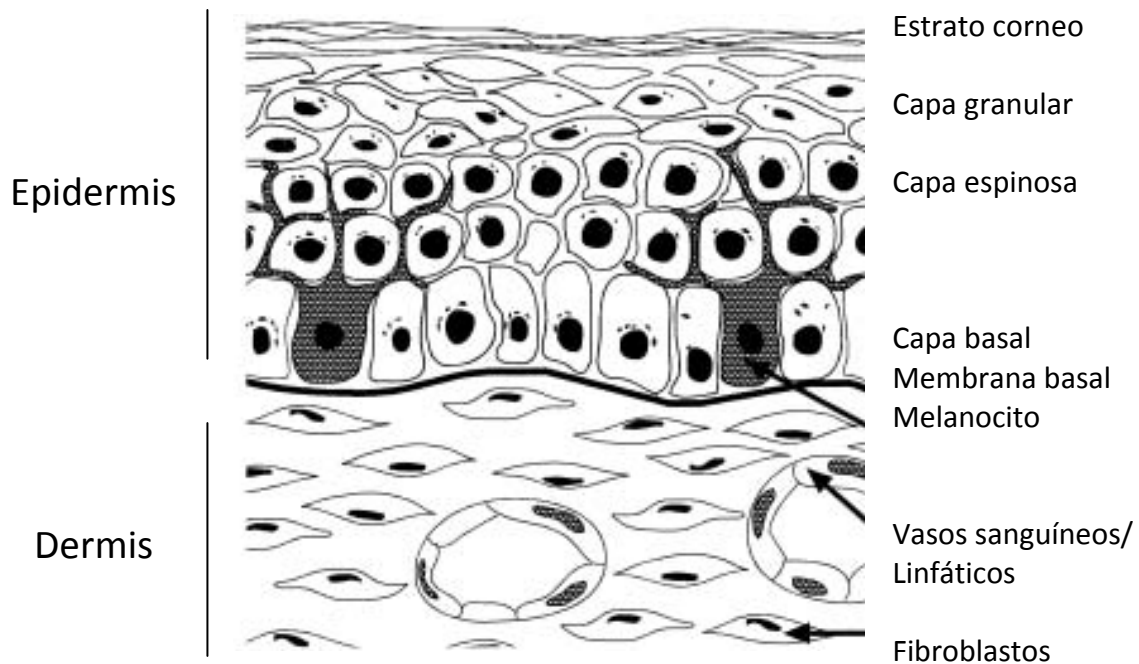


Figura 3. Esquema de la piel normal humana. La epidermis contiene las 3 capas principales de queratinocitos que son la capa basal (cercana a la dermis); la capa espinosa (compuesta por células poliédricas); y la capa granular que se encuentra entre la capa espinosa y el estrato corneo donde las células presentan una morfología aplanada. Los melanocitos, que residen en la capa basal, existen en un estado de proliferación controlada en una relación 1: 36 respecto a queratinocitos (1:5-10 respecto a queratinocitos basales). En la capa basal los melanocitos sintetizan y donan melanina, un pigmento protector, a los queratinocitos a través de sus múltiples dendritas. Adaptado de Hsu et al (Hsu et al., 2002).

En el contexto de la piel normal, los melanocitos interactúan con los principales componentes de la epidermis, los queratinocitos. De hecho, el cocultivo de queratinocitos y melanocitos hace que estos

últimos readquieran sus características normales semejantes a las *in situ* (Mancianti et al., 1993; Valyi-Nagy et al., 1993).

En el año 1984, Wallace Clark publicó la definición de los 5 pasos, caracterizados histo-patológicamente, de la progresión tumoral en melanoma (Clark et al., 1984) (**Figura 4**). El **estadio nevo benigno** se postula como la lesión melanocítica hiperplásica mas temprana. El **estadio nevo displásico**, se determinó que es el precursor candidato del melanoma cutáneo. El **crecimiento en fase radial**, es el primer estadio maligno reconocible donde las células tumorales son confinadas a la epidermis o son localmente invasivas pero no muestran capacidad de crecimiento rápido o metástasis. Durante el **estadio de crecimiento en fase vertical**, las células de melanoma infiltran la dermis y tejidos subcutáneos como una masa en expansión, con el consecuente riesgo de la diseminación sistémica. Finalmente, la **metástasis** representa el estadio más avanzado de la progresión tumoral.

Muchos cambios moleculares e interacciones célula-célula cambian durante este proceso de malignización. En la piel normal, la homeostasis entre queratinocitos y melanocitos es mantenida por uniones homotípicas entre E-caderinas y uniones tipo gap.

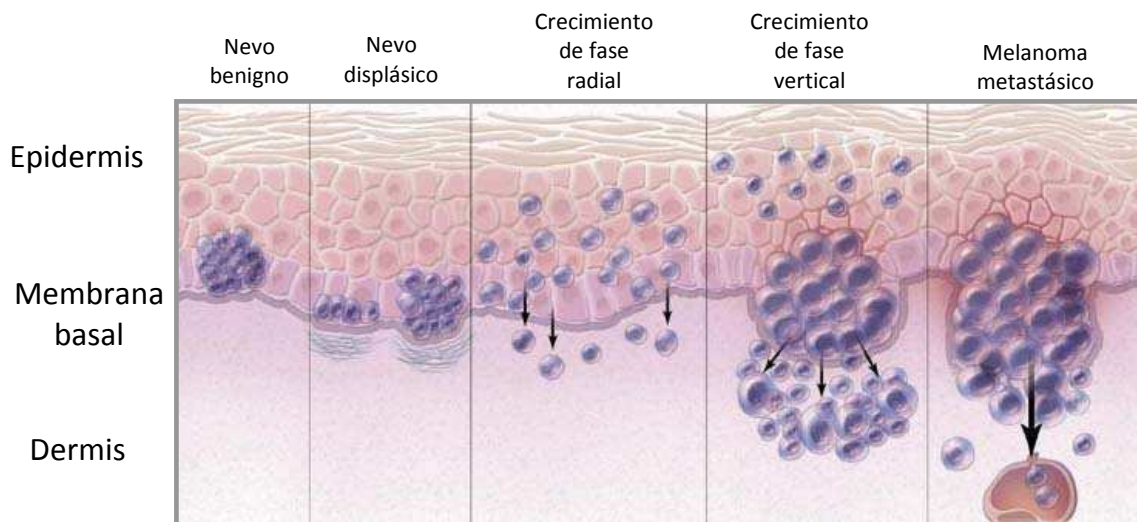


Figura 4. Cambios histo-patológicos durante la progresión del melanoma cutáneo maligno. (Ver texto). Adaptado de Clark et al (Clark, 1991).

Durante la progresión del melanoma, la disminución de la expresión de E-caderina conjuntamente con la ganancia de expresión de N-caderina conduce a un cambio entre las células que se comunican donde los melanocitos dejan de comunicarse con los queratinocitos y comienzan a establecer comunicaciones con células que también expresan N-caderina como fibroblastos y células endoteliales. Esto genera que se pierda el control de proliferación de los melanocitos, quienes en estadios avanzados de la progresión del melanoma comienzan también a expresar Mel-CAM y L1-CAM. Estas dos moléculas de adhesión

favorecen el reclutamiento de células normales al tumor como células endoteliales, células de músculo liso y células T activadas que producen múltiples factores que afectarán finalmente la motilidad y la síntesis de proteasas. Estas a su vez potencian la invasión y la migración (Haass and Herlyn, 2005; Herlyn et al., 2000; Hsu et al., 2002; Li et al., 2002).

Como se describiera anteriormente, el melanoma es un tipo de cáncer de piel que se detecta muchas veces en el estado ya metastático. Es una patología que presenta un mal pronóstico y una muy baja tasa de supervivencia. Al respecto, el “espesor de invasividad” del tumor fue un concepto introducido por Breslow en el año 1970 (Breslow, 1970) que se utiliza en la actualidad para predecir una supervivencia de 5 años. Por ejemplo, un espesor de melanoma de menos de 0,76 mM está asociado con una supervivencia de 5 años en el 97% de los pacientes mientras que un espesor de mas de 8,0 mM está asociado con una supervivencia de 5 años en el 32% de los pacientes.

La opción con mejor chance de éxito para el tratamiento de melanoma es la remoción quirúrgica de la piel de melanomas en estadios tempranos mientras que los estadios mas avanzados son muy resistentes al tratamiento con los agentes quimioterápicos convencionales. En la actualidad, no existe un tratamiento estandarizado convencional para el tratamiento de la enfermedad (Tsao et al., 2004) y a pesar de que existe una gran cantidad de trabajos que aplican análisis genómicos, todavía ha sido infructuosa la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

De las características anteriormente mencionadas, queda claro en melanoma que la búsqueda de los mecanismos moleculares que gobiernan la invasividad es de fundamental importancia para el diseño de nuevas estrategias de tratamiento con el objetivo de prevenir la rápida evolución de la enfermedad.

SPARC: una proteína de la matriz extracelular

Dándoles a las células un contexto: la Matriz extracelular

Ya desde el año 1850, se reconocía que el material fuera de las células era producido por las células; este material recibiría luego el nombre de matriz extracelular (MEC). Desde el año 1930 a 1975, los componentes de la matriz extracelular fueron caracterizados por métodos químicos, fisicoquímicos y biológicos. A principios de esta última década, Bornstein y colaboradores propusieron un modelo de interacción célula-matriz donde la matriz se representaba como una red proteica externa compuesta por fibronectina, colágeno y otras proteínas (Bornstein, 2002).

Actualmente se define a la matriz extracelular como una compleja red de macromoléculas secretadas, localizadas en el espacio extracelular, cuya función es intervenir en la regulación de la proliferación, diferenciación, migración e interacciones intercelulares. La red macromolecular de la matriz está compuesta en gran medida por colágenos, elastina, glicoproteínas y proteoglicanos secretados por fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, entre otras, que cumplen funciones estructurales. La abundancia relativa, la distribución de las proteínas y la organización molecular de estos componentes de la matriz extracelular varían enormemente de tejido a tejido dependiendo de su estructura y función.

Existe otro grupo de proteínas presentes en la matriz denominadas **proteínas matricelulares** las cuales modulan la interacción célula-matriz pero no cumplen roles estructurales (Bornstein, 2000). Este grupo de proteínas comprende principalmente a: SPARC, trombospondina 1 y 2, proteínas CCN, galectinas, osteopontina y la familia de tenascinas. Existen características comunes a este grupo de proteínas:

- Son expresadas en altos niveles durante el desarrollo y en respuesta a injuria;
- No tienen roles estructurales en la MEC pero funcionan como moduladores de las interacciones célula-matriz;
- Se unen a varios receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, citoquinas, otros componentes de la MEC o proteasas;
- Generalmente inducen estados antiadhesivos, en contraste con la mayor parte de las proteínas estructurales de la matriz.

Muchas de las funciones de estas proteínas en cáncer e inflamación serán luego descritas en el apartado “Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: inflamación”.

En este punto es importante también mencionar un tipo especializado de matriz extracelular que se denomina **membrana basal**, una capa especializada de entre 50 y 100 nm compuesta por una compleja mezcla de proteínas de matriz extracelular que se encuentra en forma basolateral a todas las capas celulares del organismo como epitelios y endotelios. La membrana basal separa estas capas celulares del

tejido conectivo circundante, provee soporte estructural a estas células e influencia y modifica el comportamiento celular mediante señalización desde afuera hacia adentro (*outside in*) (LeBleu et al., 2007). Los cuatro componentes proteicos principales de la membrana basal son: colágeno tipo IV, laminina, nidógeno y perlecano. Estos componentes proteicos son los principales targets de las proteasas que fueron descritas en el apartado “El microambiente tumoral y el proceso de invasión”. La membrana basal representa una barrera de contención para el tumor primario, el cual debe degradar esta matriz especializada para poder invadir y metastatizar.

SPARC, nuestra proteína de estudio

La proteína SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteins*) es una proteína de secreción que presenta un peso molecular estimado de 32 kDa, y cuyas modificaciones post-traduccionales dan como resultado una glicoproteína con un peso molecular aparente de 40-44 kDa por SDS-PAGE (Hughes et al., 1987). Como vimos anteriormente, es una proteína matricelular, con funciones no estructurales sino de modulación de la función celular.

SPARC fue descrita por primera vez en el año 1981 por Termine y colaboradores (Termine et al., 1981) quienes demostraron que SPARC es una proteína presente en hueso y el principal componente no colagenoso del tejido óseo humano y bovino. Posteriormente Sage y colaboradores (Sage et al., 1984; Sage et al., 1981) la describirían como una proteína secretada por células endoteliales *in vitro*, mientras que Otsuka y colaboradores (Otsuka et al., 1984) la presentarían como una proteína producida por fibroblastos en cultivo. Otras nomenclaturas le fueron otorgadas a SPARC, tales como *osteonectina* por su presencia en hueso, **43 K**, teniendo en cuenta su masa o **BM (membrana basal)-40**, debido a que fue encontrada también en ese tejido (Mann et al., 1987).

SPARC es el producto de un único gen tanto en vertebrados como en nematodos (Mason et al., 1986a; Schwarzbauer and Spencer, 1993) donde presenta un alto grado de conservación evolutiva, tal como lo muestra la **Tabla 1**.

SPARC	Número de acceso (a)	SPARC	
		murino	humano
humano	NP-003109	92	-
bovino	AAA30678	93	99
rata	CAA74042	98	92
ratón	CAA27642	-	92
pollo	AAA16893	86	87
codorniz	AAD12179	79	89
rana	CAA44350	77	79
trucha	AAC99813	74	77
drosophila	CAB39319	32	30
nematodos	AAA16827	32	31

Tabla 1. Comparación de la identidad de la secuencia de aminoácidos de SPARC en diferentes especies.

a, Número de identificación en la base de datos Genbank del NCBI. Adaptado de Brekken *et al* (Brekken and Sage, 2000).

Como vemos, el gen humano es en un 92% idéntico al del ratón y un 31% al gen del nematodo. Su expresión en numerosas especies, a lo largo de varias *phyla*, incluyendo *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, y otros, junto con su alto grado de homología entre las distintas especies, supone que su función biológica es fundamental para las diferentes especies.

Estructura y regulación del gen de SPARC

SPARC es el producto de un único gen localizado en el brazo largo del cromosoma 5 humano, en la posición 5q31-q33; en la región central del cromosoma 11 murino, y en el cromosoma 4 de nematodos (Mason et al., 1986a; Schwarzbauer and Spencer, 1993; Swaroop et al., 1988). El promotor del gen de SPARC carece de la clásica caja TATA pero posee cajas GCA repetidas continuas así como también elementos de respuesta a AMPc, shock térmico y elementos de respuesta a glucocorticoides (Mason et al., 1986b; McVey et al., 1988). El gen murino de SPARC consiste de 10 exones separados por 9 intrones, con una longitud de aproximadamente 26,5 kb como puede observarse en la **Figura 5**.

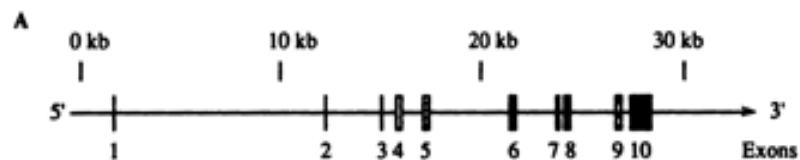


Figura 5. Representación esquemática del gen murino de SPARC el cual presenta un 92% de homología con el humano. Los exones están representados como rectángulos en negro y están numerados desde el extremo 5' del gen. El exón 1 y una porción del exón 2 contribuyen a la región no traducida del ARNm de SPARC. El exón 2 codifica el péptido señal y el sitio de clivaje y los dos primeros aminoácidos de la proteína secretada. El exón 10 codifica los últimos 10 aminoácidos de la proteína y contiene la región 3' no traducible de la proteína. Desde el exón 3 al exón 10 son codificados los aminoácidos que forman parte de la secuencia de la proteína secretada.

Tomado de Lane and Sage (Lane and Sage, 1994).

El gen homólogo de SPARC en *C. elegans* contiene 6 exones y presenta claras diferencias respecto a su contraparte en mamíferos. Los exones 1,3 y 10 de mamíferos parecen estar ausentes y los exones 6 y 7 se encuentran fusionados. La ausencia del exón 3, que contiene la secuencia más variable en vertebrados da como resultados un acortamiento en el dominio I de la proteína (ver apartado siguiente: Características Estructurales y Bioquímicas de SPARC). Un resumen de las características estructurales del gen de SPARC y sus transcritos es representado en la **Tabla 2** a continuación:

<i>Características estructurales del gen de SPARC</i>
<i>Localización</i>
Cromosoma humano 5q 31-33
Cromosoma murino 11
Cromosoma nematodo 4
<i>Tamaño</i>
10 exones murino (aproximadamente 26,5 kb)
6 exones en nematodos (aproximadamente 3,6 kb)
<i>Características</i>
No posee cajas TATA o CAAT
Primer intrón mayor a 10 kb
Posee secuencias repetidas GCA
<i>Tamaño del ARNm de SPARC</i>
2,2-3.0 kb en humanos
2,2 kb murino o bovino
1,1kb en nematodos

Tabla 2. Características estructurales del gen de SPARC. Tomado de Lane and Sage (Lane and Sage, 1994)

Características Estructurales y Bioquímicas de SPARC

El gen de SPARC en vertebrados codifica para una proteína de 298 a 304 aminoácidos de extensión. Los 17 primeros aminoácidos constituyen el péptido señal que es removido previo a la secreción de la proteína. La proteína SPARC humana madura sobre la cual se basa el trabajo presentado en esta tesis, presenta 286 aminoácidos y un punto isoeléctrico de 4,76. El peso esperado de la proteína es de aproximadamente 32kDa, sin embargo, por modificaciones post-traduccionales la proteína secretada presenta un peso aproximado de entre 40 y 44 kDa. Esta variación estructural de SPARC, se debe principalmente a glicosilaciones, las cuales varían dependiendo del tejido de donde proviene la proteína (Kaufmann et al., 2004). La proteína derivada de hueso y plaquetas migra en forma diferente mediante electroforesis en geles (SDS-PAGE) y la digestión enzimática con N-glicosidasa F y endoglicosidasa H, demostró que la diferencia se debe a la N-glicosilación variable en la proteína derivada de hueso que presenta predominantemente oligosacáridos de alta manosa, mientras que la proteína derivada de plaquetas presentada oligosacáridos de estructura compleja (Kelm and Mann, 1991). Esta característica presente en plaquetas, también se demostró en la proteína SPARC derivada de líneas de melanoma, objeto de estudio en esta tesis (Ledda et al., 1997b).

La estructura de SPARC se divide en 3 dominios bien diferenciados (Maurer et al., 1995; Maurer et al., 1997) que se encuentran representados en la **Figura 6** y cuyas funciones se resumen en la **Tabla 3**.

Dominio I o Dominio Acídico (aa 3-51): Este dominio está codificado por los exones 3 y 4, es altamente ácido con un valor de pI cercano a 3. Aunque la estructura de este dominio todavía no ha sido resuelta, estudios de dicroísmo circular predicen la existencia de regiones de tipo α hélice sensibles a cambios en la concentración de Ca^{2+} . SPARC de nematodos, al carecer del exón 3, es 21 aminoácidos más corta (Schwarzbauer et al., 1994), pero mantiene las propiedades de unión al Ca^{2+} . Este dominio N-terminal presenta los epítopes inmunodominantes (Maillard et al., 1992; Stenner et al., 1984) y se une a hidroxiapatita, por lo que ha sido implicado en la mineralización de hueso y cartílago (Romberg et al., 1985).

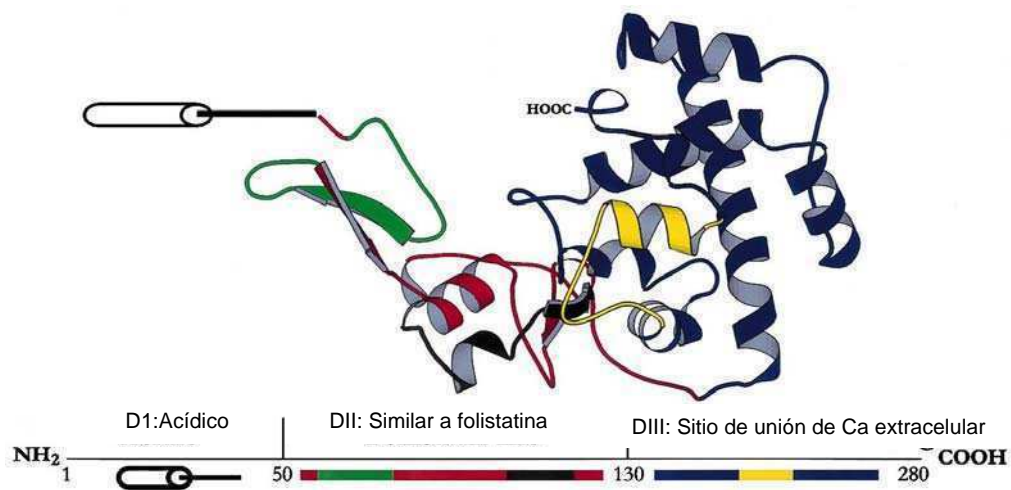


Figura 6. Estructura de SPARC humana. La representación deriva de la información obtenida por cristalografía donde se observan 2 dominios (el dominio ácido no pudo ser determinado por esta técnica). El dominio similar a folistatina, desde el aminoácido 57 al 137, está representado en rojo, excepto el péptido 2.1 (aa 55-74) y el péptido angiogénico (K)GHK (aa 114-130) que se encuentran representados en verde y negro respectivamente. El dominio EC o sitio de unión extracelular al Ca (aa 138-286) está representado en azul, excepto por el péptido 4.2 (aa 255-274) representado en amarillo.

Adaptado de Brekken *et al* (Brekken and Sage, 2000).

Dominio II o Dominio Similar a Folistatina (FS) (aa 52-132): Este dominio es codificado por los exones 5 y 6 y contiene 10 cisteínas y un complejo carbohidrato N-ligado en la posición Asn99. La estructura de este dominio es homóloga al dominio repetido de folistatina y estudios de cristalografía de rayos X demostraron que el dominio II consiste de una estructura alargada formada por una horquilla β N-terminal y un pequeño núcleo de estructura mixta α/β . Tanto los estudios de secuencia como la estructura cristalina muestran que el núcleo del dominio II se asemeja a un inhibidor de serina-proteasa y que el dominio NH₂ terminal tipo horquilla β se parece al del EGF (factor de crecimiento epidermal) (Hohenester et al., 1997). La región N-terminal del dominio II posee además péptidos bioactivos que

ejercen diferentes efectos sobre las células endoteliales. Por ejemplo, el péptido 2.1 (aa 55-74) inhibe la proliferación de células endoteliales (Funk and Sage, 1993) mientras que el péptido 2.3 (aa 113-130) que contiene la secuencia de unión al Cu^{2+} , estimula la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Por otro lado, la región N-terminal del dominio II posee afinidad por heparina y proteoglicanos. **(Figura 6)**

Dominio III o Dominio EC extracelular de unión al Ca^{2+} (aa 133-285): Este dominio está codificado por los exones 7 a 9. Un estudio de cristalografía de rayos X reveló la estructura globular de este dominio que contiene dos motivos manos EF con elevada afinidad por Ca^{2+} (Hohenester et al., 1996). Este dominio interactúa con el dominio II a través de una hélice N-terminal anfifílica, esto ocurre a través de múltiples residuos que se encuentran conservados en los miembros de proteínas de la familia SPARC, SC1 y QR1 **(Figura 7)**. El dominio III posee el péptido 4.2 (aa 254-273) que se ha demostrado que inhibe la proliferación de células endoteliales (Kupprion et al., 1998; Motamed and Sage, 1998). Los colágenos fibrilares tipo I, III y V, y el colágeno de lámina basal tipo IV, se unen al dominio EC de SPARC en forma dependiente de la concentración de Ca^{2+} (Maurer et al., 1995; Pottgiesser et al., 1994; Sasaki et al., 1997b; Sasaki et al., 1998).

La afinidad de SPARC por colágeno puede ser aumentada por el clivaje entre las leucinas L197 y L198 y se ha demostrado la especificidad de varias metaloproteasas extracelulares (MMP-7, MMP-3, MMP-2, MMP-13) para clivar a SPARC en la mencionada posición. 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 de colágeno aumentando de esta manera la afinidad de la interacción (Sasaki et al., 1998).

El dominio III de SPARC también posee afinidad por la región de unión a heparina de la vitronectina, pero esta interacción sólo ha sido observada en ensayos de fase sólida mientras que la vitronectina en forma soluble no interacciona con SPARC (Rosenblatt et al., 1997).

<i>Dominio I</i>	<i>Dominio II</i>	<i>Dominio III</i>
Une Ca^{2+} con baja afinidad	Inhibe proliferación	Une Ca^{2+} con alta afinidad
Sitio de transglutaminación	Desensambla adhesiones focales	Inhibe estiramiento celular
Inhibe estiramiento celular	Estimula angiogénesis	Inhibe proliferación
Inhibe producción de FN y TSP	Une Cu^{2+}	Desensambla adhesiones focales
Induce producción de PAI-1	Une PDFG y VEGF	Induce producción de MMP-9

Tabla 3. Resumen de las diferentes funciones y propiedades en ensayos *in vitro* que le han sido atribuidas a los 3 dominios de SPARC.

Proteínas homólogas a SPARC

SPARC es una proteína extracelular que pertenece a la familia de proteínas de la matriz extracelular y además pertenece al grupo de proteínas que poseen un dominio similar a folistatina y un dominio EC. Dentro de este grupo de proteínas denominadas “*SPARC-like*” se han identificado otros 4 miembros: (a) **SC1**, una proteína identificada inicialmente en cerebro de rata (Johnston et al., 1990) y su homóloga humana hevina, aislada de endotelio de vénulas (Girard and Springer, 1995); (b) la proteína de retina de codorniz **QR1** (Guermah et al., 1991) ; (c) La proteína **TSC36/FRP** , una proteína inducida por TGF- β en células de glioma (Shibanuma et al., 1993); y (d) **testican/SPOCK**, una 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 al., 1997). Mientras que todas las proteínas tienen un dominio similar a folistatina, seguido por un dominio EC, difieren considerablemente en el dominio ácido N-terminal como se puede observar en la **Figura 7**.

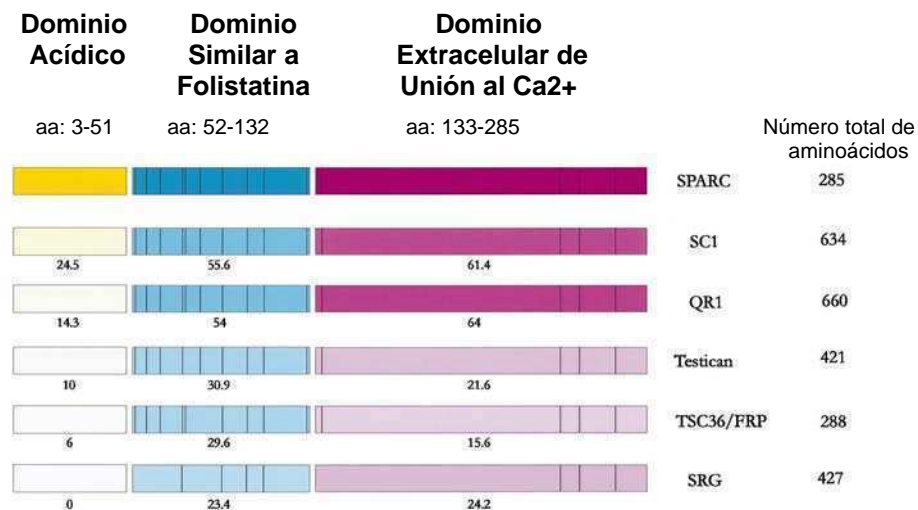


Figura 7. Esquema estructural de las proteínas homólogas a SPARC. En la figura se encuentran representadas en forma lineal la homología en cada dominio (el degradé de colores da idea de grado de homología). Los números representan el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a SPARC. Adaptado de Brekken *et al* (Brekken and Sage, 2000).

Las funciones biológicas de estas proteínas homólogas a SPARC no se conocen con precisión hasta el momento. La proteína hevina ha sido descrita como una proteína antiadhesiva (Girard and Springer, 1996), mientras que QR1 y TSC36 están asociadas con inhibición del ciclo celular (Shibanuma et al., 1993). 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 ratón adulto (McKinnon and Margolskee, 1996). Que SPARC y SC1 tengan solapada su expresión en algunos tejidos podría indicar que se compensan funcionalmente una con otra.

Expresión de SPARC

Estudios de la expresión de SPARC en vertebrados menores e invertebrados han demostrado que la expresión de la proteína 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 mientras que en ratones la expresión de la proteína puede ser detectada desde el día 9 en el primordio del corazón; mas tarde en el día 14 SPARC es expresada en cartílago, hueso, epitelio del tracto digestivo, vasos sanguíneos y piel. En el humano, altos niveles de ARNm y de proteína han sido descritos en hueso y dientes durante el desarrollo, principalmente en osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos adyacentes a condrocitos (Mundlos et al., 1992).

La expresión y función biológica de SPARC en el adulto parece estar limitada a tejidos que sufren remodelación, como el intestino, hueso y tejidos en reparación como durante la cicatrización de heridas (Holland et al., 1987; Sage et al., 1989b). Característicamente expresada por las células ganglionares y astrocitos en la retina, SPARC parece estar involucrada en el mantenimiento de la función de la retina, dado que se observa en el adulto un aumento de la expresión en comparación con tejido retinal de recién nacidos (Yan and Sage, 1999).

SPARC ha sido descrita en zonas de angiogénesis durante el crecimiento de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo y su expresión se correlaciona con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Iruela Arispe et al., 1995). Desafiando el concepto de que SPARC es solamente una proteína de secreción, SPARC no sólo se observa en células en cultivo con una localización perinuclear que rodea el aparato de Golgi, sino que además Gooden y colaboradores, describieron a SPARC en el núcleo de células en división (Gooden et al., 1999). Aunque la función de SPARC en el núcleo es desconocida, la evidencia sugiere que podría estar involucrada en la regulación de la mitosis de células prediferenciadas.

Funciones Biológicas de SPARC en tejidos normales:

antiproliferación y antiadhesión

Antiproliferación y antiadhesión son las dos principales funciones biológicas definidas para SPARC *in vitro*, cada una de las cuales actúa por una vía de señalización independiente (Motamed and Sage, 1998). En los comienzos de las investigaciones que se enfocaron en describir las funciones biológicas de SPARC, se demostró que era un importante inhibidor del ciclo celular arretando fibroblastos en fase G₁ (Funk and Sage, 1991; Sage et al., 1995). Además se demostró que SPARC inhibe la proliferación de células endoteliales, músculo liso y fibroblastos estimulados *in vitro* con VEGF, PDGF, bFGF y suero fetal bovino (Hasselaar and Sage, 1992; Kupprion et al., 1998; Raines et al., 1992). Esta propiedad antiproliferativa fue confirmada en células de ratones null para SPARC, donde los fibroblastos, células mesangiales y del

músculo liso, mostraron una tasa de proliferación mayor comparadas con su contraparte *wild-type*. Los estudios que se concentraron en determinar el mecanismo por el cual SPARC inhibe al ciclo celular han sido infructuosos hasta el momento. Mediante estudios de inhibición de vías de señalización, se ha demostrado que la inhibición general de proteínas tirosina-quinasa con herbimicina A y genisteína, protegió a células endoteliales del efecto antiadhesivo de SPARC pero el efecto antiproliferativo no pudo ser inhibido (Motamed and Sage, 1998). El estudio concluyó que el efecto antiadhesivo de SPARC sobre células endoteliales es mediado a través de una vía dependiente de fosforilación de tirosinas mientras que la función antiproliferativa es dependiente en forma parcial de una vía acoplada a receptor de proteína G.

La adhesión celular y el consecuente estiramiento sobre un sustrato, son requisitos esenciales para el apropiado crecimiento y supervivencia de las células. Si estos requisitos no pueden concretarse, podría conducir al redondeamiento de las células y la consecuente apoptosis.

El proceso de adhesión celular es un proceso reversible que ocurre en tres pasos: pegado, estiramiento y formación de contactos focales de adhesión y fibras de estrés (**Figura 8**). La función antiadhesiva de SPARC es quizás la más caracterizada de las funciones de esta proteína, y su efecto es logrado por la disolución de los contactos focales de adhesión y la reorganización de fibras de estrés. Lane y Sage documentaron mediante estudios *in vitro* las secuencias de SPARC responsables del efecto antiadhesivo (Lane and Sage, 1994). Se ha demostrado que el efecto de anti-estiramiento y el desensamblaje de los contactos focales de adhesión en células endoteliales bovinas es mediado por SPARC o por un péptido C-terminal de la misma conteniendo el sitio de unión a Ca^{2+} . Se cree que alguna de estas dos moléculas, SPARC o su péptido derivado, están involucradas en la fosforilación de tirosinas de proteínas asociadas a los contactos focales de adhesión (Young et al., 1998).

Mientras que el proceso de adhesión celular ha sido bien caracterizado, se conoce mucho menos acerca de la de-adhesión. De-adhesión se refiere al proceso reverso a la adhesión en el cual la célula cambia desde un estado de adherencia mas fuerte a uno de adherencia débil (Greenwood and Murphy-Ullrich, 1998). La transición desde un estado fuertemente adherido a un estado intermedio involucra la reestructuración de los contactos focales de adhesión y fibras de stress manteniendo la morfología celular estirada. Este tipo de adhesión es mediada no sólo por SPARC sino también por otras proteínas matricelulares como trombospondina 1 y tenascina C.

La reversibilidad del proceso de adhesión celular se ve representada en eventos tales como: remodelación de tejidos durante morfogénesis y cicatrización de heridas, metaplasia celular, proliferación celular y durante carcinogénesis y metástasis.

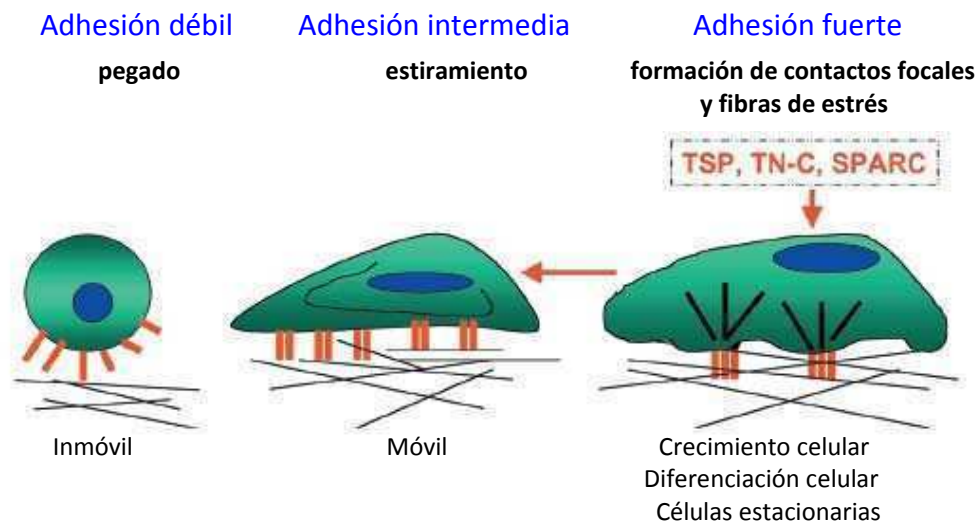


Figura 8. Los estadios de la adhesión celular y la inducción de un estado intermedio de adhesividad por proteínas matricelulares. Durante el proceso de adhesión, la célula se pega, se estira y forma fibras de estrés y contactos focales de adhesión. Con cada cambio de estado, la fuerza de adhesión se incrementa. El proceso de de-adhesión es la transición desde un fuerte estado de adherencia hacia un estado de adherencia intermedio, caracterizada por el desensamblaje de fibras de estrés y los contactos focales de adhesión en la célula que permanece estirada. TSP1 (trombospondina 1), tenascina C (TN-C) y SPARC inducen un estado de adhesión intermedio. El estado débil de adhesión puede ser encontrado en células en apoptosis o durante la citoquinesis. El estado de adhesión fuerte es característico de células diferenciadas o quiescentes mientras que el estado intermedio de adhesión ocurre durante injuria como en cicatrización de heridas o remodelación de tejidos durante la morfogénesis o en procesos patológicos como la carcinogénesis. Adaptado de Murphy-Ullrich (Murphy-Ullrich, 2001)

Interacción de SPARC con otras proteínas

SPARC es una proteína que se une con alta afinidad a cationes bivalentes, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular. La unión del Ca^{2+} a SPARC provoca un cambio conformacional que reduce la susceptibilidad del dominio EC frente a proteasas y altera la afinidad por el colágeno (Engel et al., 1987; Maurer et al., 1992; Pottgiesser et al., 1994). SPARC se une también a Cu^{2+} y Fe^{2+} (Vernon and Sage, 1989).

Por otro lado, SPARC se une a PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y esta interacción interfiere con la unión de PDGF a su receptor en fibroblastos e inhibe la proliferación de células de músculo liso estimulada por PDGF (Raines et al., 1992). El mismo hallazgo en células de músculo liso aórtico fue descrito posteriormente (Motamed et al., 2002).

También se ha demostrado que, SPARC y péptidos derivados del dominio EC (aa 254-273) y FS (aa 54-72) se unen a VEGF (factor de crecimiento de células endoteliales de la vasculatura), interfiriendo con la unión de VEGF a su receptor VEGF-R1 en células endoteliales e inhibiendo la proliferación de dichas

células (Kupprion et al., 1998). Además, SPARC es capaz de inhibir la fosforilación del receptor VEGF-R1 inducida por VEGF, pero no inhibe la activación del receptor VEGF-R2.

Se demostró que SPARC y péptidos derivados del dominio EC inhibieron la actividad de FGF-2 (factor 2 de crecimiento de fibroblastos) sobre células endoteliales aórticas bovinas (Hasselaar and Sage, 1992). 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 (Brekken and Sage, 2000). Sin embargo, no se ha podido demostrar una interacción directa de SPARC con FGF-2 sugiriendo que SPARC sería capaz de inhibir la fosforilación del receptor FGF-R1 a través de un mecanismo que no depende de la interacción de SPARC con FGF-2.

Respecto a las interacciones de SPARC con proteínas de la MEC, la interacción con colágenos es una de las principales. SPARC interacciona con colágenos tipo I, II, III, IV, V y VIII, además presenta una estrecha relación con TGF- β 1. (ver mas adelante)

Respecto a interacciones de SPARC con proteínas involucradas en vías de señalización como las quinasas, es importante mencionar que se ha reportado la interacción de SPARC con la proteína ILK o “*integrin-linked kinase*” demostrándose que la interacción de estas proteínas es necesaria para el correcto ensamblaje de una matriz de fibronectina. Esto resultó en la primer evidencia del mecanismo molecular por el cual SPARC estaría regulando el ensamblaje de la matriz extracelular (Barker et al., 2005). Coincidentemente, Shi y colaboradores demostraron que la disminución de la expresión de SPARC en glioma condujo a una menor activación de las quinasas ILK y FAK (“*focal adhesion kinase*”), y a la consecuente disminución de la supervivencia celular y capacidad invasiva (Shi et al., 2007). Finalmente, Weaver y colaboradores probaron que la supervivencia celular *in vitro* ante condiciones de estrés celular como la privación de suero, conducen a una activación de ILK mediada por SPARC lo cual genera un aumento de la resistencia a la apoptosis (Weaver et al., 2008).

La **Tabla 4** presentada a continuación, resume las evidencias científicas que demuestran las interacciones de SPARC con otras proteínas y cationes.

Ligandos	Referencias bibliográficas
Cationes	
Ca ²⁺	Maurer et al. 1992, 1995
Cu ²⁺	Lane et al 1994
Fe ²⁺	Vernon and Sage
Factores de crecimiento	
PDGF	Raines et al. 1992, Gohring et al. 1998
VEGF	Kupprion et al. 1999
Proteínas de Matriz Extracelular	
Colágeno I	Termine et al. 1981, Sasaki et al. 1998, Giudici et al. 2008
Colágeno II	Sage et al. 1989, Giudici et al. 2008
Colágeno III	Sage et al. 1989, Giudici et al. 2008

Colágeno IV	Mayer et al. 1991, Maurer et al. 1995
Colágeno V	Sage et al. 1989, Giudici et al. 2008
Colágeno VIII	Sage et al. 1989
Vitronectina	Rosenblatt et al. 1997
Trombospondina-1	Clezardin et al. 1988
Unión a la superficie celular	
Células endoteliales	Yost and Sage 1993
Plaquetas	Kelm et al. 1992
Otros	
Albúmina	Sage et al. 1984
Hidroxiapatita	Romberg et al. 1985
ILK (quinasa unida a integrina)	Barker et al. 2005, Weaver et al. 2008, Shi et al. 2007.

Tabla 4. Interacción de SPARC con otras moléculas. Adaptado y actualizado de Yan y Sage (Yan and Sage, 1999).

Dada la importancia biológica que resulta de las interacciones de SPARC y colágeno tipo I y de la relación entre SPARC y TGF β , estas serán descriptas en detalle a continuación.

Interacción entre SPARC y Colágeno tipo I

SPARC se une a los colágenos tipo I a V y el clivaje de SPARC por la acción de metaloproteasas resulta en una incrementada afinidad de SPARC estas proteínas de MEC (Sage et al., 1989a; Sasaki et al., 1997a). Se ha demostrado además, que una modificación estructural del dominio extracelular de unión al calcio de SPARC conduce a un aumento en 10 veces de la afinidad por colágenos I a IV (Sasaki et al., 1998).

En estudios *in vivo*, Iruela-Arispe y colaboradores reportaron que ratones que no expresan colágeno tipo I en tejidos mesenquimales fallan en el depósito de SPARC en la MEC tanto *in vivo* como *in vitro* (Iruela-Arispe et al., 1996). Estas evidencias sugerían claramente que la producción de colágeno tipo I parecía ser un requisito para la asociación de SPARC a la MEC embrionaria de los ratones. Por otro lado, ratones con expresión null para SPARC (SP $-/-$) presentan diferentes anormalidades que parecen reflejar, al menos en parte, cambios en la estructura y composición de la MEC (Bradshaw and Sage, 2001). Esto fue confirmado posteriormente en otro trabajo que demostró que las fibrillas de colágeno de la dermis de los ratones null para SPARC eran mas pequeñas en comparación con la dermis normal (Bradshaw et al., 2003), lo cual además se correlacionó con una menor tensión de la piel. Los autores de este trabajo propusieron entonces que la expresión de SPARC era necesaria para la correcta maduración del colágeno en la MEC. Esta idea fue retomada y confirmada por Rentz y colaboradores quienes demostraron que SPARC regula el procesamiento de procolágeno tipo I y la fibrillogénesis del colágeno en fibroblastos dérmicos (Rentz et al., 2007).

En estudios mas recientes, se ha llegado a plantear a SPARC como una molécula chaperona de colágeno (Martinek et al., 2007) dada la capacidad de SPARC de unirse a colágeno a través de una secuencia altamente conservada entre distintas especies favoreciendo la fibrillogénesis. Asimismo, se han propuesto un “dominio de interacción a la matriz” y un “dominio de interacción con la célula” en la fibrilla de colágeno tipo I, siendo este último el sitio propuesto de interacción con SPARC, entre otras proteínas de MEC, y el responsable de la maduración y procesamiento del colágeno (Sweeney et al., 2008).

Numerosas publicaciones han demostrado la estrecha relación entre la expresión de SPARC y colágeno tipo I así como también su interacción a nivel molecular. Por otra parte, Brekken y Sage demostraron que la producción de SPARC acompaña la inducción de colágeno tipo I (Brekken and Sage, 2001). Por otro lado, en cultivos de células mesangiales donde se inhibió la expresión de SPARC, se demostró una expresión disminuida de colágeno tipo I tanto a nivel del ARNm como de la proteína en comparación con la línea *wild type* (Francki et al., 1999). Estas células presentaron a su vez, niveles disminuidos de TGF- β 1, tanto a nivel de ARNm como de proteína secretada, y la adición de SPARC exógena restableció tanto la expresión de colágeno tipo I como de TGF- β 1, por lo que se postuló que SPARC regula la expresión de ambas proteínas. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en fibroblastos humanos, donde la transfección de fibroblastos con un ARN de interferencia para SPARC, condujo a una disminución de colágeno tipo I. La adición exógena de TGF- β 1 indujo a un incremento en la expresión tanto de SPARC como de colágeno tipo I en fibroblastos normales pero no en aquellos transfectados con un ARN de interferencia para SPARC (Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2005a).

Interacción entre SPARC y TGF- β 1

El factor de crecimiento transformante TGF- β 1 y SPARC han sido relacionados con la rápida remodelación de tejidos conectivos durante el proceso de cicatrización de heridas (Sporn et al., 1983; Wasi et al., 1984). Numerosas publicaciones científicas demostraron posteriormente que la regulación de la expresión de SPARC y TGF- β 1 estaba intrínsecamente relacionada y que una proteína estimula la expresión de la otra y viceversa. Concretamente, en el año 1988 Wrana y colaboradores demostraron que TGF- β 1 inducía la expresión de proteínas específicas de matriz extracelular, entre ellas SPARC y colágeno tipo I en diferentes tipos celulares encontrados en hueso (Wrana et al., 1988). Posteriormente, estas observaciones serían confirmadas en fibroblastos *in vitro* los cuales, luego de la adición exógena de TGF- β 1, presentarían niveles aumentados de la expresión de SPARC y colágeno tipo I (Wrana et al., 1991). Asimismo, Ford y colaboradores demostraron que el aumento de la expresión de SPARC durante la diferenciación de queratinocitos humanos era un proceso dependiente de TGF- β 1 (Ford et al., 1993). Por otro lado, se demostró en un modelo de células dentales que la Vitamina D en presencia de TGF- β 1 inducía la expresión de SPARC (Pavasant et al., 2003; Shiba et al., 2001). Además, Reed y colaboradores

demonstraron que TGF- β 1 induce la expresión de colágeno tipo I y SPARC en fibroblastos (Reed et al., 1994). Como vemos, estas evidencias dan cuenta de que la expresión de SPARC es inducida por TGF- β 1 además de relacionar la expresión de estas proteínas a la de colágeno tipo I.

Por otro lado, numerosos trabajos científicos han demostrado que este proceso es recíproco, esto es, que SPARC induce la expresión de TGF- β 1. Como comentamos en el apartado anterior, se demostró en cultivos de células mesangiales y en fibroblastos normales que la inhibición de la expresión de SPARC inducía a una disminución de la expresión de colágeno tipo I y TGF- β 1 tanto a nivel del ARNm como de la proteína, en comparación con la línea *wild type*, lo cual podía revertirse mediante el agregado exógeno de SPARC (Francki et al., 1999; Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2005b). Por otro lado, Bassuk y colaboradores demostraron, en un modelo de glomerulonefritis en rata, que el agregado exógeno de SPARC conducía a un aumento de la expresión de TGF- β 1 y colágeno tipo I en células mesangiales (Bassuk et al., 2000c). Además, se demostró que SPARC inhibe la proliferación de células epiteliales a través de la estimulación de la señalización de la vía TGF- β 1-Smad 2/3 (Schiemann et al., 2003a). Del mismo modo, se reportó que SPARC regula la fosforilación de Smad 2 mediada por TGF- β 1 en células mesangiales indicando que SPARC no sólo regula la expresión de TGF- β 1 sino también la cascada de señalización dependiente de esta proteína (Francki et al., 2004b).

Estos resultados refuerzan la evidencia que une a estas tres proteínas: SPARC, colágeno tipo I y TGF- β 1 en procesos regulatorios comunes.

Hasta ahora hemos focalizado nuestra atención en la acción de SPARC sobre células normales. En células malignas no siempre SPARC se correlaciona con las mismas actividades que en células normales. A continuación introduciremos las evidencias de la actividad de SPARC en tumores.

SPARC y Tumores

Controversias del rol de SPARC en cáncer: pro o antitumoral?

Las evidencias que dan cuenta de la importancia del rol de SPARC en una gran variedad de tipos tumorales son numerosas aunque todavía no existe un modelo que unifique y pueda explicar todas las facetas de su función molecular y su contribución al desarrollo de la progresión tumoral. Se han reportado evidencias que prueban la sobreexpresión de SPARC en una amplia variedad de tipos tumorales como melanoma, mama, cerebro, glioblastoma, entre otros, lo cual podría llevarnos a hipotetizar acerca del potencial rol de SPARC en la promoción y progresión tumoral. Sin embargo, se ha demostrado que existe una baja expresión de la proteína en cáncer de ovario, páncreas y cáncer colorrectal, entre otros, lo cual sugeriría un rol inhibitorio de SPARC en la formación del tumor.

Estas evidencias, aparentemente contradictorias, resaltan la compleja biología de SPARC en cáncer que puede ser explicada en parte teniendo en cuenta que existen numerosas proteínas en la MEC con funciones similares o complementarias a las de SPARC. Es de esperarse que el balance particular que existe en cada tejido tumoral respecto a las actividades de las proteínas de la MEC pueda influir, para un lado o para otro, en el comportamiento del tumor. Esto puede depender del linaje tumoral, de la proporción y/o composición relativa del estroma o de otros factores que modifiquen la actividad de SPARC. Por ejemplo, existen fragmentos peptídicos derivados de la proteína que presentan actividades biológicas que se oponen a las actividades de la proteína nativa (Tai and Tang, 2008). Dado que además el perfil de proteasas que se encuentran en el microambiente tumoral de cada tipo tumoral puede diferir entre los distintos tumores y sabiendo que SPARC puede sufrir proteólisis por acción de metaloproteasas (Iruela Arispe et al., 1995), estas diferencias, en combinación con cambios en la composición local de moléculas de matriz y citoquinas, pueden contribuir al complejo comportamiento de SPARC en los distintos tipos de cáncer.

A continuación se presentarán las evidencias que sustentan el rol de SPARC como proteína protumoral y como antitumoral en distintos tipos de cáncer.

SPARC: rol protumorigénico y prometastásico

La matriz extracelular es una compleja red dinámica cuya función va mas allá de ser un soporte mecánico sino que estabiliza las funciones fisiológicas de las células como migración, proliferación y diferenciación. La mayoría de los componentes estructurales de la MEC como colágeno, laminina y nidógeno favorecen la señalización que promueve la supervivencia celular. Sin embargo, y como ya se adelantó en el apartado "Funciones biológicas de SPARC en tejidos normales", existe un segundo grupo de proteínas

matricelulares que favorecen un estado de adhesión intermedio caracterizado por disrupción de los contactos focales de adhesión y reorganización de fibras de estrés. Estas proteínas son secretadas en forma transiente a la MEC, y no se vuelven parte de la red de proteínas presentes. Esta familia incluye a trombospondina 1 y 2, tenascina y SPARC. Debido a su capacidad antiadhesiva, se ha propuesto que el rol de SPARC reside en promover el desensamblaje de las células malignas de la matriz extracelular, promoviendo la migración y diseminación de las mismas hacia los tejidos circundantes (Ledda et al., 1997a; Rempel et al., 2001).

Mediante estudios de expresión de genes por tecnología de microarreglos, entre otros enfoques experimentales, se ha identificado a SPARC como una proteína de mal pronóstico, muy frecuentemente asociada con los tumores más agresivos en una gran cantidad de tipos humanos de cáncer, tal como lo muestra la **Tabla 5**, donde podemos ver que SPARC se sobre-expresa en melanoma, glioma, cáncer de mama, colon, próstata, riñón, esófago, pulmón, páncreas, hígado, ovario, vejiga, útero, piel, tiroides, cáncer de cabeza y cuello, leucemia y cáncer gástrico.

La sobre-expresión de SPARC ha sido asociada a los tipos más agresivos de melanoma humano y se ha sugerido que su expresión predice el resultado clínico del melanoma cutáneo maligno (Ledda et al., 1997b; Massi et al., 1999; Rumpler et al., 2003). Más recientemente la presencia de SPARC en el suero de pacientes fue propuesta como marcador útil para la detección temprana del melanoma (Ikuta et al., 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que SPARC podría favorecer la diseminación metastásica y el mecanismo mediante el cual ejercería esta acción es mediante la regulación de la expresión, secreción y actividad de proteasas. Al respecto, se demostró que la expresión de SPARC en melanoma correlaciona en forma directa con los niveles y actividad de MMP-2 y MMP-9 (Ledda et al., 1997a). Además, tanto células de cáncer de mama como glioma, mostraron un incremento en el nivel de MMP-2 en respuesta al agregado exógeno de SPARC, indicando que SPARC podría incrementar la capacidad invasiva de las células a través de la activación de enzimas degradadoras de la matriz (Gilles et al., 1998). Los resultados presentados en esta tesis aportarán mayor información respecto al rol de SPARC en la regulación de proteasas degradadoras de la matriz como la catepsina B y el consecuente incremento de la invasividad de las células.

Por otro lado, el aumento de la expresión de SPARC y VE-caderina se observó en la vasculatura tumoral y estroma en cáncer de mama en correlación con la progresión de carcinoma in situ a carcinoma invasivo (Parker et al., 2004) sugiriendo que SPARC podría promover la angiogénesis.

Estudios más recientes enfocados en establecer el rol de SPARC en la metástasis en cáncer de mama, demostraron que SPARC pertenece a un subconjunto de genes asociados con las poblaciones celulares metastásicas en pulmón más agresivas (Minn et al., 2005). Este subconjunto de genes permitió predecir la probabilidad de las células cancerosas de mama de metastatizar en pulmón.

Más recientemente, un meta-análisis realizado tomando datos ya publicados acerca de firmas moleculares de expresión de genes en diferentes tipos tumorales, identificó a SPARC, TIMP3 y osteopontina como proteínas co-reguladas durante la progresión maligna (Finocchiaro et al., 2007). Esta evidencia postularía a SPARC como parte de una red de proteínas de la matriz extracelular que ejecutan concertadamente un efecto promaligno.

TIPO TUMORAL	ENFOQUE EXPERIMENTAL	
	MODELOS	MUESTRAS HUMANAS
Mama	Gilles et al 1998 [1]; Jacob et al 1999 [2]; Zajchowski et al 2001 [3]; Briggs et al 2002 [4]; Woelfle et al 2003 [5]; Campo McKnight et al 2005 [6]; Watkins et al 2005 [7]; Sangaletti et al 2003 [8]; Minn et al 2005 [9]; Gupta et al 2005 [9]	Watkins et al 2005 [10]; Porter et al 1995 [11]; Bellahcene et al 1995 [12]; Podhajcer et al 1996 [13]; Graham et al 1997 [14]; Castronovo et al 1998 [15]; Iacobuzio-Donahue et al 2002 [16]; Porter et al 2003 [17]; Dairkee et al 2004 [18]; Amatschek et al 2004 [19]; Jones et al 2004 [20]; Parker et al 2004 [21]; Barth et al 2005 [22]; Jansen et al 2005 [23]; Lakhani et al 2005 [24]; Minn et al 2007 [9]; Lien et al 2007 [25].
Melanoma	Ledda et al 1997 [26]; Ledda et al 1997 [27]; Sturm et al 2002 [28]; Rumpfer et al 2003 [29]; Kuphal et al 2005 [30]; Alvarez et al 2005 [31]; Robert et al 2006 [32]; Moreno-Bueno et al 2006 [33]; López-Haber et al 2007 [34]; Prada et al 2007 [35]; Sosa et al 2007 [36]; Smit et al 2007 [37]	Massi et al 1999 [38]; Ikuta et al 2005 [39]; Alonso et al 2007 [40]
Cerebro	Golembieski et al 1999 [41]; Vajkoczy et al 2000 [42]; Menon et al 2000 [43]; Huang et al 2000 [44]; Rempel et al 2001 [45]; Schultz et al 2002 [46]; Golembieski et al 2002 [47]; Rich et al 2003 [48]; Zhou et al 2005 [49]; Cantarella et al 2006 [50]; Kunigal et al 2006 [51]; Gagliano et al 2006 [52]; Colin et al 2006 [53]; McClung et al 2007 [54]; Shi et al 2007 [55]	Rempel et al 1998 [56]; Rempel et al 1999 [57]; Rich et al 2005 [58]
Colon	Volmer et al 2004 [59]; Sansom et al 2007 [60]	Porte et al 1995 [61]; Madoz-Gúrpide et al 2006 [62]; Wiese et al 2007 [63]; Kaiser et al 2007 [64]
Próstata	Lecrone et al 2000 [65]; De et al 2003 [66]; Chen et al 2007 [67]	Jacob et al 1999 [2]; Thomas et al 2000 [68]; Lapointe et al 2004 [69]; Best et al 2005 [70]

Riñón	Kato et al 1998 [71]	Porter et al 1995 [11]; Sakai et al 2001 [72]; Gieseg et al 2002 [73]; Amatschek et al 2004 [19]; Moreno-Bueno et al 2006 [33]
Esófago	Luo et al 2004 [74]; Mitas et al 2005 [75]; Che et al 2006 [76]	Porte et al 1998 [77]; Yamashita et al 2003 [78]; Xue et al 2006 [79]
Pulmón	Siddiq et al 2004 [80]	Porter et al 1995 [11]; Koukourakis et al 2003 [81]; Amatschek et al 2004 [19]
Leucemia		De Vos et al 2002 [82]; Hedvat et al 2003 [83]; Martinez et al 2003 [84]; Aouacheria et al 2007 [85]
Páncreas		Guweidhi et al 2005 [86]; Bloomston et al 2006 [87]; Prenzel 2006 [88]; Sato et al 2007 [89]
Hígado		Le Bail et al 1999 [90]; Goldenberg et al 2002 [91]; Lau et al 2006 [92]
Estómago		Maeng et al 2002 [93]; Inoue et al 2002 [94]; Wang et al 2004 [95]
Ovario		Porter et al 1995 [11]; Paley et al 2000 [96]; Brown et al 1999 [97]
Vejiga	Kram et al 2001 [24]; Nimphius et al 2007 [98]	Yamanaka et al 2001 [99]
Utero		Chen et al 2003 [100]; Sova et al 2006 [101]; Rodriguez-Jimenez et al 2007 [102]
Osteosarcoma		Fanburg-Smith et al 1998 [103]; Dalla Torre et al 2006 [104]
Tiroideas		Takano et al 2000 [105]
Cabeza y cuello		Chin et al 2005 [106]
Piel		Aycock et al 2004 [107]

Tabla 5. Resumen de evidencias en la literatura que muestran a SPARC como una proteína **protumorigénica**. *Modelos:* comprende modelos de estudio *in vitro* de líneas celulares murinas y humanas o estudios *in vivo* en modelos tumorales en ratones. *Muestras humanas:* comprende el estudio de expresión de genes o inmunohistoquímica en biopsias de pacientes. Tabla perteneciente al review de Podhajcer y colaboradores (Podhajcer et al., 2008). Las referencias indicadas se encuentran en el ANEXO III de esta tesis.

SPARC: también una proteína antitumoral

La expresión de SPARC también ha sido asociada con buen pronóstico en ciertos tipos de cáncer, aunque todavía existe una gran controversia al respecto. En la **Tabla 6**, se encuentran listados los tipos tumorales en donde se encontró a SPARC como proteína anti-tumorigénica. Como se observa, SPARC se puede comportar como una proteína pro o anti tumorigénica en un mismo tipo tumoral, según el sistema experimental que se diseñe.

En neuroblastoma se ha demostrado que SPARC es un factor anti-angiogénico (Chlenski et al., 2004; Chlenski et al., 2002). En ovario, se propuso que SPARC podría actuar como un supresor tumoral (Said et al., 2007a; Said et al., 2007b; Yiu et al., 2001). Asimismo, se demostró que la sobre-expresión de SPARC en cáncer de ovario inhibió la tumorigenicidad de las células ováricas *in vivo* en modelos de ratones nude (Mok et al., 1996).

El cáncer de colon representa otro caso paradigmático del rol de SPARC como proteína anti-tumorigénica aunque se presentaron datos discrepantes entre sí. Análisis genómico de líneas celulares de cáncer colorrectal resistentes a agentes quimioterapéuticos mostraron que los niveles de SPARC se encuentran fuertemente disminuidos (Tai et al., 2005). Por otro lado, se vinculó a la expresión de SPARC con una disminuida resistencia a la apoptosis, mediante una posible interacción directa de SPARC con pro-caspasa 8 (Gooden et al., 1999; Taghizadeh et al., 2007). En contraste con estas evidencias, un estudio demostró la presencia de una incrementada expresión de SPARC en muestras de cáncer de colon humano comparado con tejido colónico normal (Porter et al., 1995). Además, un estudio reciente sobre firmas moleculares de genes identificó la sobreexpresión de SPARC dentro de un grupo de 65 genes que distinguieron cáncer invasivo colorrectal de células colorrectales normales (Wiese et al., 2007).

Por otro lado, SPARC y tenascina- C, promovieron la capacidad invasiva de células de cáncer colorrectal en presencia de colágeno tipo I (Nguyen et al., 2005). Por lo tanto, aunque parece existir evidencias significativas respecto al potencial antitumorigénico de SPARC en neuroblastoma, cáncer de ovario y cáncer colorrectal, se debe ser cauteloso cuando las discrepancias surgen de diferentes enfoques experimentales. Una posible explicación de las discrepancias que modifican fuertemente los resultados según el experimento, podría ser que la distribución histológica de SPARC, más que los niveles cuantitativos totales de expresión, pueda ser diferencial. Por ejemplo, la sobreexpresión de SPARC podría localizarse preferencialmente en el borde invasivo tumoral, ya sea expresada por las propias células tumorales o por células peritumorales como fibroblastos.

Finalmente, fue recientemente demostrado que la inhibición de la expresión de SPARC en células de cáncer de hígado, condujo a una inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* cuando estas células fueron inyectadas en ratones (Atorrasagasti et al., 2010). Los autores demostraron además que la inhibición de la expresión de SPARC indujo un cambio en el perfil de caderinas de membrana, aumentando la expresión

de E-caderina y disminuyendo la de N-caderina, sugiriendo que SPARC podría estar promoviendo el proceso de Transición Mesenquimal- Epitelial (proceso contrario a la EMT).

TIPO TUMORAL	ENFOQUE EXPERIMENTAL	
	MODELOS	MUESTRAS HUMANAS
Ovario	Said et al 2005 [1]; Said et al 2007 [2]; Mok et al 1996 [3]; Cody et al 2007 [4]	Yiu et al 2001 [5]
Mama	Dhanesuan et al 2002 [6]; Koblinski et al 2005 [7]	Bergamaschi et al 2007 [8]
Colon	Tai et al 2005 [9]; Taghizadeh et al 2007 [10]; Tang et al 2007 [11]; Yang et al 2007 [12]	
Riñón	Chlenski et al 2006 [13]; Chlenski et al 2007 [14]	
Próstata		Sato et al 2003 [15]; Puolakkainen et al 2003 [16]
Neuroblastoma		Chlenski et al 2002 [17]; Chlenski et al 2004 [18]
Pulmón	Brekken et al 2003 [19]	
Hígado	Atorrasagasti et al 2010	

Tabla 6. Resumen de evidencias en la literatura que muestran a SPARC como una proteína **antitumorígenica**.

Modelos: comprende modelos de estudio *in vitro* de líneas celulares murinas y humanas o estudios *in vivo* en modelos tumorales en ratones. *Muestras humanas:* comprende el estudio de expresión de genes o inmunohistoquímica en biopsias de pacientes.

Tabla perteneciente al review de Podhajcer y colaboradores (Podhajcer et al., 2008). Las referencias indicadas se encuentran en el ANEXO III de esta tesis.

SPARC en melanoma: nuestro modelo de estudio

Nuestro laboratorio desde hace varios años se encuentra enfocado en el rol de SPARC en melanoma como modelo de progresión tumoral y nuestros aportes, entre muchos otros, han contribuido al mayor entendimiento de la acción protumoral de SPARC en melanoma (Alonso et al., 2004; Alonso et al., 2007; Alvarez et al., 2005; Ikuta et al., 2005; Kuphal et al., 2005; Ledda et al., 1997a; Ledda et al., 1997b; López Haber et al., 2007; Massi et al., 1999; Moreno-Bueno et al., 2006; Prada et al., 2007; Robert et al., 2006b;

Rumpler et al., 2003; Smit et al., 2007; Sosa et al., 2007; Sturm et al., 2002). En el año 1997, nuestro laboratorio publicó la evidencia que sería la base para muchas sublíneas o enfoques de investigación que se iniciarían luego. En la revista *Nature Medicine* fueron publicados los resultados que demostraban que cuando se inhibía la expresión de SPARC mediante estrategias antisentido en líneas celulares de melanoma humano que eran posteriormente xenotransplantadas a ratones nude, el crecimiento tumoral era completamente abolido en comparación con el crecimiento que sí se observaba en la línea wild type con alta expresión de SPARC (Ledda et al., 1997a). En este trabajo se describía el uso del plásmido con la secuencia antisentido de SPARC que permitió generar las líneas celulares derivadas del melanoma humana MEL-LES: L-CMV (línea control) y L-1D (clon con 80% de disminución de la expresión de SPARC). La histología asociada al sitio de inyección de las células tumorales indicaba que las células L-1D eran rechazadas por leucocitos polimorfonucleares (PMN) reclutados en el sitio y que como consecuencia, los tumores no crecían.

Un trabajo posterior del grupo demostró que el mecanismo de reclutamiento y activación de PMN involucraba la expresión aumentada de IL-8, GRO y leucotrienos por parte de las células tumorales con expresión disminuida de SPARC (Alvarez et al., 2005). Sin embargo, cabe destacar que el sistema experimental en donde se evaluaron estos efectos tiene la limitación de que al ser células humanas inyectadas en ratones nude (inmunodeficientes), no se está evaluando la acción de SPARC en un caso fisiológicamente normal. Por otro lado, nuestro laboratorio ha demostrado que SPARC derivada del estroma modula la proliferación y capacidad migratoria de células endoteliales y fibroblastos, mientras que en células de melanoma, glioblastoma y colon se observó un efecto refractario a la acción de SPARC (López Haber et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de SPARC en fibroblastos circundantes al tumor no afectó el crecimiento tridimensional *in vitro* de esferoides heterotípicos ni el crecimiento *in vivo* de tumores compuestos de una mezcla de células de melanoma humano y fibroblastos (Prada et al., 2007). Es interesante postular de acuerdo a estos resultados que las células tumorales, en algunos casos, pueden desarrollar una “resistencia” a la acción de SPARC como moderadora del crecimiento tumoral.

La plétora de efectos relacionados con SPARC y tumorigenicidad complican el análisis de vías moleculares que median la acción de SPARC, más aún cuando los numerosos intentos de definir un receptor celular que interaccione físicamente con SPARC extracelular han sido infructuosos. Sin embargo, la posibilidad de modular la actividad de SPARC en tumores con el fin de obtener un efecto terapéutico es promisorio (Ledda et al., 1997a) y supone la posibilidad de obtener información más precisa de los procesos que serían afectados por dicha intervención. Es por ello que se necesitan nuevas estrategias para abordar la pregunta que nos planteamos, que es: cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en la progresión tumoral, específicamente aquellos relacionados con la proteína SPARC?

Como se mencionara anteriormente, en los últimos años se obtuvieron evidencias experimentales que apuntan al rol de SPARC en tres procesos fundamentales que serán presentados a continuación: la transición epitelio-mesenquimal, la angiogénesis y la inmunovigilancia (Podhajcer et al., 2008).

Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: angiogénesis

Uno de los potenciales mecanismos por los cuales SPARC podría promover la progresión tumoral es la angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos a partir de vasculatura preexistente, que es esencial para los tumores que crecen mas allá de un determinado tamaño.

Como se mencionara anteriormente en el apartado “Funciones Biológicas de SPARC en tejidos normales: Antiproliferación y Antiadhesión”, SPARC fue primero descrita en células endoteliales donde se demostró que inhibía la progresión del ciclo celular mediante un mecanismo que supone la inhibición de la unión de PDGF a su receptor y la inhibición del efecto mitogénico inducido por VEGF (Hasselaar and Sage, 1992; Raines et al., 1992). Esto se demostró que ocurría además en neuroblastoma, sin embargo, es en el único caso tumoral donde se vio un efecto antiangiogénico producido por SPARC. En otros sistemas experimentales, la expresión de SPARC correlacionó directamente con progresión maligna y angiogénesis en carcinoma hepatocelulares (Lau et al., 2006). Por otro lado, células de melanoma sobreexpresando SPARC produjeron tumores en ratones nude que presentaron incrementada angiogénesis (Prada et al., 2007).

A pesar del hecho de que SPARC bloquea la unión de VEGF a su receptor, se demostró que VEGF incrementa los niveles de SPARC en células microendoteliales, sugiriendo una modulación recíproca entre las dos proteínas (Kato et al., 2001) que fue luego confirmada en un modelo de neovascularización cororidal luego de injuria (Nozaki et al., 2006).

Podría hipotetizarse que la interacción entre los diferentes factores angiogénicos, gobernaría el efecto pro o anti-angiogénico de SPARC dependiendo del contexto en el cual se encuentren las otras moléculas de señalización.

Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC: inflamación

El concepto de que la inflamación juega un importante rol en la progresión tumoral ha recibido una considerable atención en los últimos (Mantovani et al., 2008). Actualmente, se considera que existe una conexión entre inflamación crónica y cáncer. De acuerdo con esta hipótesis, las células inflamatorias reclutadas a un área de remodelación de tejidos, secretan proteasas y factores proangiogénicos que incrementarían el desarrollo tumoral. Quimioquinas y citoquinas producidas por las células inflamatorias han sido sugeridas como promotoras de un ambiente favorecedor para el crecimiento y diseminación

tumoral. Sin embargo, existe suficiente evidencia acerca de que células inflamatorias pueden ser inducidas a atacar el tumor y que SPARC podría inhibir este ataque .

Al respecto, el xenotransplante en ratones nude de células de melanoma con niveles disminuidos de expresión de SPARC por secuencias antisentido de ARN contra SPARC, condujo al rechazo del tumor por el huésped a través de un proceso dependiente de células polimorfonucleares (PMN) (Ledda et al., 1997a; Prada et al., 2007). En estos ensayos, las células de melanoma que presentaban una expresión disminuida de SPARC, indujeron el reclutamiento de células PMN y el consecuente rechazo del tumor a través de un mecanismo que involucra un incremento en la secreción de factores quimiotácticos como IL-8, GRO y leucotrienos, provenientes de células inflamatorias (Alvarez et al., 2005). Además se demostró que PMN humanos ejercieron un efecto lítico *in vitro* sobre células de melanoma en las que la expresión de SPARC fue inhibida, y este efecto lítico fue a su vez inhibido en presencia de SPARC (Alvarez et al., 2005; Prada et al., 2007). La hipótesis de que SPARC podía jugar un rol en inflamación se demostró además en un modelo de ratones SP $-/-$ donde se observó un mayor reclutamientos de PMN en los pulmones comparado con ratones *wild type* luego de la administración intratraqueal del agente antineoplásico bleomicina (Savani et al., 2000).

Efectivamente, la evidencia de que SPARC modula la respuesta inmune antitumoral no se limita a melanoma dado que se demostró en células tumorales mamarias inyectadas en ratones SP $-/-$ un crecimiento tumoral disminuido; esta inhibición del crecimiento fue acompañada por un masivo infiltrado de células inflamatorias, principalmente PMN y macrófagos (Sangaletti et al., 2003) .Aunque la evidencia obtenida mediante el uso de modelos de ratones null para SPARC SP $-/-$ debe ser tomada con precaución debido a que estos ratones presentan un desarrollo alterado de su sistema inmune (Rempel et al., 2007), la evidencia general indica que SPARC podría tener un rol clave en la regulación de la respuesta inflamatoria y por lo tanto en evitar el ataque anti-tumoral mediado por células inflamatorias, especialmente PMN. Una posibilidad es que SPARC podría regular la vía de apoptosis en células PMN, la cual es necesario que ocurra para el reclutamiento de nuevas olas de células inflamatorias, un proceso que involucra la acción de FasL (Alvarez et al., 2005). Al respecto se mostró que en presencia de SPARC secretada por las células tumorales o por el estroma tumoral, las células PMN no entran en apoptosis y de esta manera abortan la capacidad de “reclutar” a nuevas oleadas de células.

Es importante mencionar en este punto que SPARC no es la única proteína de matriz extracelular que influencia la respuesta pro o anti tumorigénica mediada por el sistema inmune. Como se describiera anteriormente, los tumores se caracterizan por sobreproducir proteínas matricelulares que se cree que juegan un importante rol en la progresión tumoral (Dvorak, 1986; Podhajcer et al., 2008). Dado que los tumores se asemejan a cicatrices que no sanan, y que el proceso de cicatrización de heridas induce la expresión de proteínas matricelulares que favorecen el remodelado de los tejidos, hemos hipotetizado que las proteínas matricelulares, entre ellas SPARC, podrían estar entre las primeras proteínas producidas

anormalmente por las células tumorales ayudándolas a “despegarse” de las células vecinas, proliferar e invadir tejidos circundantes, mientras que en pasos más avanzados de la progresión tumoral podrían estar involucradas en la angiogénesis inducida por el tumor y el reclutamiento de células inflamatorias (Llera et al., 2010) (**Figura 9**).

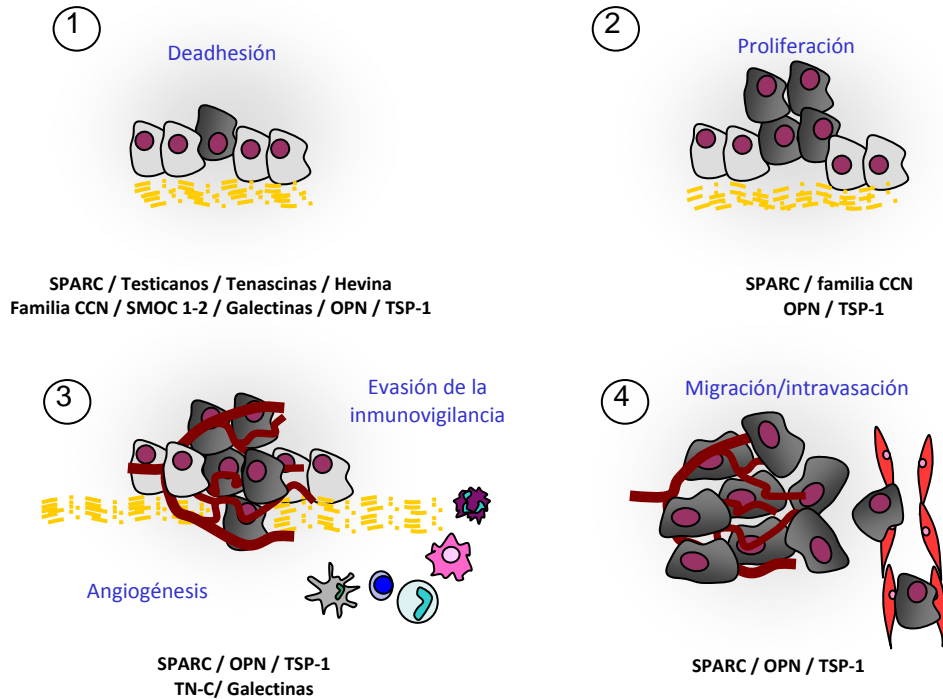


Figura 9. Proteínas matricelulares involucradas en la progresión tumoral. Varias proteínas matricelulares juegan roles clave en los diferentes pasos del crecimiento tumoral, desde la deadhesión de las células de la matriz que las contiene, la proliferación celular, el reclutamientos de vasos y la intravasación a la circulación para la diseminación.

Evidencias del rol molecular protumoral de SPARC:

Transición Epitelio-Mesenquimal

El proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT), es un proceso importante durante el desarrollo normal en el cual las células epiteliales pierden su polaridad y desarrollan un fenotipo mesenquimal. Desde hace algunos años, se ha propuesto que un proceso similar a la EMT podría ocurrir en las células tumorales con el objetivo de adquirir un fenotipo invasivo y metastático (Thiery, 2002). La EMT está caracterizada por la pérdida de adhesión intercelular mediada por el cambio del perfil de expresión de caderinas, donde la célula deja de expresarse E-caderina (caderina epitelial) y comienza a expresar N-caderina (caderina neural). Además, durante la EMT ocurre una disminución de la expresión de marcadores epiteliales como las citoqueratinas y un aumento de marcadores mesenquimales como la vimentina, lo cual conlleva a la adquisición de un fenotipo fibroblastoide móvil e invasivo . El factor de

transcripción Snail y otros miembros de la familia, han sido implicados en la promoción de la EMT, actuando como represores epiteliales y activadores de genes mesenquimales (Cano et al., 2000; De Craene et al., 2005; Moreno-Bueno et al., 2006).

Uno de los puntos más importantes respecto a este proceso es que la expresión de SPARC en melanoma ha sido asociada con varias características involucradas en EMT; de hecho, SPARC ha disminuido la expresión de E-caderina e incrementado vimentina a través de la fosforilación de FAK y/o la inducción del factor de transcripción Snail (Robert et al., 2006b; Smit et al., 2007). Estas evidencias, sugieren que SPARC podría regular el “switch” o cambio de expresión E-caderina a N-caderina en células de melanoma con el consecuente aumento de la migración y capacidad invasiva. Recientemente, se ha demostrado en un estudio de perfiles transcripcionales en muestras de melanoma en crecimiento de fase vertical con y sin nodos metastásicos, que SPARC y N-caderina estaban conjuntamente aumentadas en melanoma metastático, comparado con sus contrapartes no metastásicas (Alonso et al., 2007). En otro estudio de perfiles genéticos, se demostró que la sobreexpresión de Snail en líneas celulares de cáncer de mama indujo una disminución de la expresión de E-caderina con un concomitante aumento de la expresión de SPARC y vimentina (Lien et al., 2007). La **Figura 10** esquematiza los eventos que favorecen la progresión tumoral y en los cuales se ha demostrado que SPARC participa. Como vemos, SPARC es capaz de afectar la progresión tumoral a diferentes niveles. Durante el estadio temprano del desarrollo SPARC está aparentemente implicada en la transformación maligna. SPARC parece jugar además un papel importante en el proceso de transición epitelio-mesenquimal. Mas tarde en la progresión tumoral, SPARC producida por las propias células tumorales o por las células del estroma (endotelio, células inmunes y fibroblastos) está involucrada en el escape tumoral inhibiendo la acción del sistema inmune sobre el tumor y promoviendo la angiogénesis. Finalmente, SPARC está involucrada en el proceso metastático favoreciendo la invasión y la transvasación.

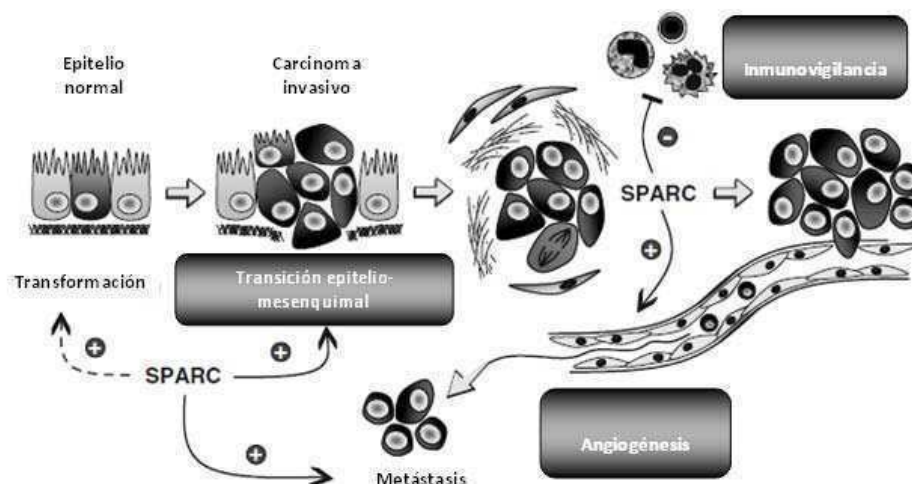


Figura 10. SPARC en la progresión tumoral: una visión integradora

Proteómica: una herramienta con alto rendimiento

Qué es la proteómica?

Los rápidos avances de la tecnología del ADN están permitiendo la secuenciación sistemática de los genomas de diversos organismos. En particular, la secuenciación del genoma humano publicada en la revista *Science* en el 2001, representa un hito en la historia de la ciencia. Todos los proyectos de secuenciación proporcionan una cantidad de secuencias de ADN difícil de manejar, y todavía se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes identificados. Es por ello que el consiguiente paso en la era post-genómica debe ser el estudio funcional de todos estos genes. La proteómica es uno de los campos que puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico. El término “proteoma” fue usado por primera vez en 1995 para describir el conjunto de PROTEÍNAS de un genOMA, proveniente de una célula o tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma, dio lugar a una nueva disciplina: la proteómica.

La definición más aceptada para esta disciplina es la del “estudio a gran escala de proteínas pertenecientes a un sistema biológico, mediante el uso de métodos bioquímicos adaptados para análisis a gran escala, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares”. En otras palabras, el estudio a nivel proteómico de un sistema biológico multiproteico se enfoca en la determinación del comportamiento de ese sistema más que en la interpretación del comportamiento de cada integrante. Esta es la base que diferencia a la proteómica de la bioquímica clásica de proteínas donde se busca el estudio de la función y estructura de una proteína aislada.

Cabe mencionarse que la definición de proteómica ha sido modificada en los últimos años teniendo en cuenta que no sólo incluye la expresión de proteínas como productos génicos, sino también incluye las modificaciones de las proteínas como un mecanismo natural de regulación celular (Aebersold and Mann, 2003; Marko-Varga and Fehniger, 2004).

El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de proteínas. En los años noventa, la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era.

Para caracterizar el proteoma de una célula, es importante tener en cuenta que el proteoma es **dinámico** y que es el reflejo del medio ambiente en el que es estudiado. Como respuesta a estímulos externos e internos las proteínas pueden ser modificadas postraduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas, por lo que obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado bajo una condición biológica determinada. Considerando todas las proteínas sufren y que impactan en su función biológica, podríamos decir que un genoma puede dar lugar un número infinito de proteomas. A lo largo de esta tesis se verán reflejados los resultados obtenidos de estudios realizados fundamentalmente aplicando proteómica de expresión.

Actualmente, la investigación en proteómica segrega a esta disciplina en tres campos principales: la proteómica de expresión, la proteómica funcional y la proteómica estructural.

La **proteómica de expresión** es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. Esto incluye la aplicación de técnicas fundamentales para separar y cuantificar proteínas como HPLC multidimensional, electroforesis bidimensional y electroforesis capilar, entre otros. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad etc.

La **proteómica funcional** es el estudio de la función de las proteínas dentro de un sistema biológico y la regulación de su expresión dentro de ese sistema. Luego de ser traducidas, las proteínas sufren modificaciones postraduccionales como adiciones de carbohidratos o fosforilaciones los cuales afectan tanto la estructura como la función. La proteómica funcional incluye también el estudio de la afinidad entre la interacción ligando- receptor.

La **proteómica estructural** involucra la determinación y el análisis de estructuras tridimensionales de proteínas las cuales contribuyen a su función y su identidad molecular con otras proteínas. La información acerca de la estructura 3D de una proteína es central para el diseño de pequeños compuestos que se unan a grupos funcionales, generando por ejemplo cambios en el sitio activo de una proteína. Actualmente, la industria es quien empuja al desarrollo de la proteómica estructural centrada en el descubrimiento de nuevos blancos de drogas.

Esquema general de trabajo en proteómica

Para llevar a cabo cualquiera de los estudios proteómicos mencionados anteriormente (expresión, funcional o estructural) en primer lugar es necesario la **separación** de las proteínas presentes en una muestra de un determinado proteoma. Posteriormente es necesario, en aquellos casos de proteómica de expresión donde se quiere comparar cuantitativamente los niveles de expresión de las proteínas entre dos muestras, realizar la **cuantificación** de las muestras en estudio. Además, es necesaria la **identificación**

de las proteínas estudiadas dado que generalmente se querrá luego estudiar su función biológica en el sistema estudiado.

Estos pasos básicos que involucran cualquier método de estudio en proteómica, son los que determinan las herramientas asociadas a separación, cuantificación e identificación de proteínas.

Así entonces podemos clasificar las técnicas de proteómica en:

- Técnicas de Separación:
 - Electroforesis unidimensional (1DE)
 - Electroforesis bidimensional (2DE)
 - Cromatografía líquida (LC)
 - Cromatografía de afinidad (TAP) (*Tandem affinity purification*)
- Técnicas de Cuantificación:
 - Electroforesis mono o bidimensional seguida de tinciones: Plata, Sypro Ruby, Coomassie Blue Coloidal.
 - Marcación previa a la separación analítica: DIGE (*Two-dimensional difference gel electrophoresis*), iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*), SILAC (*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), o ICAT (*isotope-code affinity tagging*).
- Técnicas de Identificación:
 - Método de la huella peptídica con o sin datos de fragmentación de péptidos utilizando espectrometría de masas simple (MS) o en tandem (MS/MS o MSⁿ).
 - Secuenciación de novo

Se describirán a continuación los alcances de las técnicas aplicadas esta tesis: la electroforesis bidimensional con marcaje fluorescente previo de las proteínas por DIGE (*differential in gel electrophoresis*, marcaje iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) previo a separación por cromatografía líquida y finalmente espectrometría de masas para la identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF y Orbitrap.

Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es una de las tecnologías más utilizadas para la separación de proteínas. Fue introducida hace 35 años por O'Farrell (O'Farrell, 1975). La separación se basa en dos propiedades fisicoquímicas independientes de las proteínas que son su punto isoeléctrico (pI) y su peso molecular (PM). La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, en el que las proteínas son separadas eléctricamente en un gradiente de pH hasta alcanzar la posición en

la que su carga neta es cero, es decir, el punto isoeléctrico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas por peso molecular mediante electroforesis en presencia de SDS.

En la isoelectroforesis se establece un gradiente de pH formado por la distribución de anfólitos, esto es, moléculas anfotéricas pequeñas, solubles, con una alta capacidad buffer cerca de su pI. Estos anfólitos se encuentran co-polimerizados con una matriz de acrilamida inmovilizada en una tira, permitiendo una alta resolución y reproducibilidad de los geles.

La segunda dimensión separa las proteínas de acuerdo a su peso molecular en un gel con SDS. La tira utilizada en el isoelectroenfoco o primera dimensión, es luego aplicada en forma transversal sobre este gel, que puede presentar distintos porcentajes de acrilamida, y la electroforesis se realiza normalmente sobre esa muestra que ya fue previamente separada por punto isoeléctrico. El SDS enmascara la carga propia de las proteínas, formando complejos aniónicos con una carga negativa estable por unidad de masa. El SDS también contribuye a la ruptura de uniones puente de hidrógeno y bloquea interacciones hidrofóbicas, ayudando así al desplegamiento de las proteínas. Además del SDS, las proteínas son sometidas a la acción de un agente desnaturalizante, por ejemplo urea, y de un agente reductor como el DTT. De esta manera los péptidos se solubilizan en estado desnaturalizado. En la **Figura 11** se representan esquemáticamente los pasos involucrados en la electroforesis bidimensional.

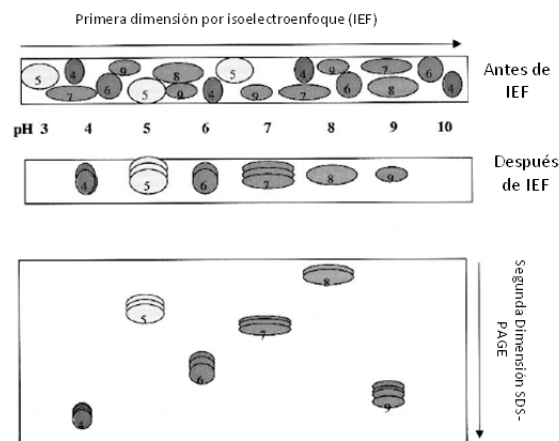


Figura 11. En la figura se esquematiza la distribución de las proteínas luego de la primera y segunda dimensión. El resultado son spots circulares de las proteínas separadas por punto isoeléctrico y peso molecular.

Existen parámetros que se pueden modificar con el objetivo de incrementar al máximo la separación de proteínas, por ejemplo: longitud de la tira de IEF (normalmente desde 7 cm a 24 cm), rango de pH de la tira de IEF (rangos de pH de 1 unidad o hasta 12), dimensiones del gel de la segunda dimensión (desde 7cm x 7cm hasta 24cm x 24cm) y porcentajes de poli(acrilamida) (desde 6% hasta 15%). A mayor longitud de la tira de pH, o menor rango de pH, o mayor longitud del gel de la segunda dimensión o mayor % de acrilamida, mejor separación.

Una vez finalizada la corrida electroforética se deben revelar las manchas correspondientes a las proteínas separadas. Existen para esto varios métodos de tinción que difieren principalmente en la sensibilidad (límite de detección), rango dinámico para la cuantificación y la compatibilidad con el posterior procesamiento para la identificación por espectrometría de masas.

La tinción con Coomassie Brilliant Blue coloidal posee una baja sensibilidad y un estrecho rango dinámico, pero es muy reproducible y de excelente compatibilidad con espectrometría de masas (MS). La tinción con plata es de muy buena sensibilidad, pero de corto rango dinámico (2 ordenes de magnitud), con baja reproducibilidad dado que la tinción no presenta punto final y además con baja compatibilidad con posterior uso en MS. La tinción con colorante fluorescente como el Sypro Ruby tienen un mayor rango dinámico (3 ordenes de magnitud), buena sensibilidad y compatibilidad con MS, pero es dificultosa la extracción de los spots diferenciales así como es costoso el escáner necesario para su lectura.

Aún teniendo en cuenta los distintos parámetros que definen a cada una de estas tinciones post-electroforesis, todas comparten la desventaja de que es necesario realizar un gel independiente para cada muestra en estudio (control vs. tratado). Esto genera una baja reproducibilidad gel a gel debido a variaciones técnicas que puedan ocurrir durante las dos dimensiones (diferencias de polimerización en geles de poliacrilamida, fluctuaciones térmicas, concentración de sales, variaciones de pH o campo eléctrico, variaciones en la tinción) lo cual hace muy dificultosa la posterior comparación entre geles en la búsqueda de proteínas expresadas diferencialmente.

En el año 1997 Ünlu y colaboradores (Unlu et al., 1997) desarrollaron la técnica **DIGE (difference gel electrophoresis)** que representó un gran avance en el campo de la proteómica de expresión dado que solucionó muchas de las limitaciones técnicas de las tinciones post electroforesis. La técnica se basa en el marcaje de las proteínas con fluoróforos previo a su separación por electroforesis bidimensional. Cada muestra (control vs. tratado) se marca con un fluoróforo diferente (esto es: Cy3 y Cy5) así como también se marca un estándar interno proveniente del pool de muestras a procesar con el fluoróforo Cy2. Luego las muestras control, tratado y estándar, son mezcladas y corridas en un mismo gel. Posteriormente se cuantifica el aporte de las 3 muestras por separado usando un escaner de tres láseres lo cual permite la detección de diferencias en la abundancia relativa de las proteínas entre las muestras mediante el uso de un software específico. Esta técnica permite que las muestras puedan ser corridas en un mismo gel en ambas dimensiones. De esta manera son sometidas a las mismas condiciones y ambientes a través del experimento.

Mediante colaboraciones científicas constituidas entre nuestro laboratorio y las Unidades de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) y el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) ambos en Madrid, pudimos aplicar esta tecnología para nuestros estudios de proteómica de expresión, por lo que los principios de esta metodología se detallan a continuación.

DIGE (*difference gel electrophoresis*)

Como fuera descripto anteriormente, el gran aporte de la tecnología DIGE en el área de la proteómica en comparación con las técnicas de tinción post-electroforesis, radica en la capacidad de la técnica de separar 3 muestras en un mismo gel eliminando de esta manera la variabilidad experimental inter-gel. Por otro lado, podemos detectar diferencias en la abundancia de las proteínas en un rango mucho más amplio dado que la detección basada en fluorescencia tiene un mayor rango dinámico, de 5 ordenes de magnitud, mientras que con tinción con plata por ejemplo sólo podemos ver diferencias en un orden de magnitud. Esto significa que podemos cuantificar diferencias entre proteínas que representan entre un 0.001% y un 10% del total. Asimismo, la linealidad, sensibilidad y especificidad de la técnica son considerablemente mejores convirtiendo a la tecnología DIGE en una de las mejores tecnologías para la detección de diferencias cuantitativas entre proteínas existente hasta el momento.

El flujo de trabajo para un experimento aplicando la tecnología DIGE se esquematiza en la **Figura 12**. Allí puede observarse que las muestras proteicas a ser comparadas (control vs. tratado) son marcadas con Cy3 o Cy5, mientras que el colorante Cy2 es utilizado para marcar el estándar interno que consiste en un pool que contiene igual cantidad de proteínas proveniente de todas las muestras presentes en el experimento. Por ejemplo: si el experimento consta de 6 réplicas biológicas habrá 6 muestras control y 6 muestras tratadas, por lo que el estándar interno consistirá de 12 partes equitativas de las muestras que forman parte del experimento. El estándar interno asegura que todas las proteínas presentes en el experimento estén representadas permitiendo posteriormente poder hacer una comparación intra-gel o inter-gel. Las variaciones en los volúmenes de spot debido a variaciones específicas de gel como por ejemplo la entrada de la muestra a la segunda dimensión o el proceso de electroforesis en la primera o segunda dimensión, será la misma para cada proteína dentro del mismo gel. Por lo tanto, la cantidad relativa de proteína en un gel en una muestra comparada con otra no será afectada (Lilley and Friedman, 2004).

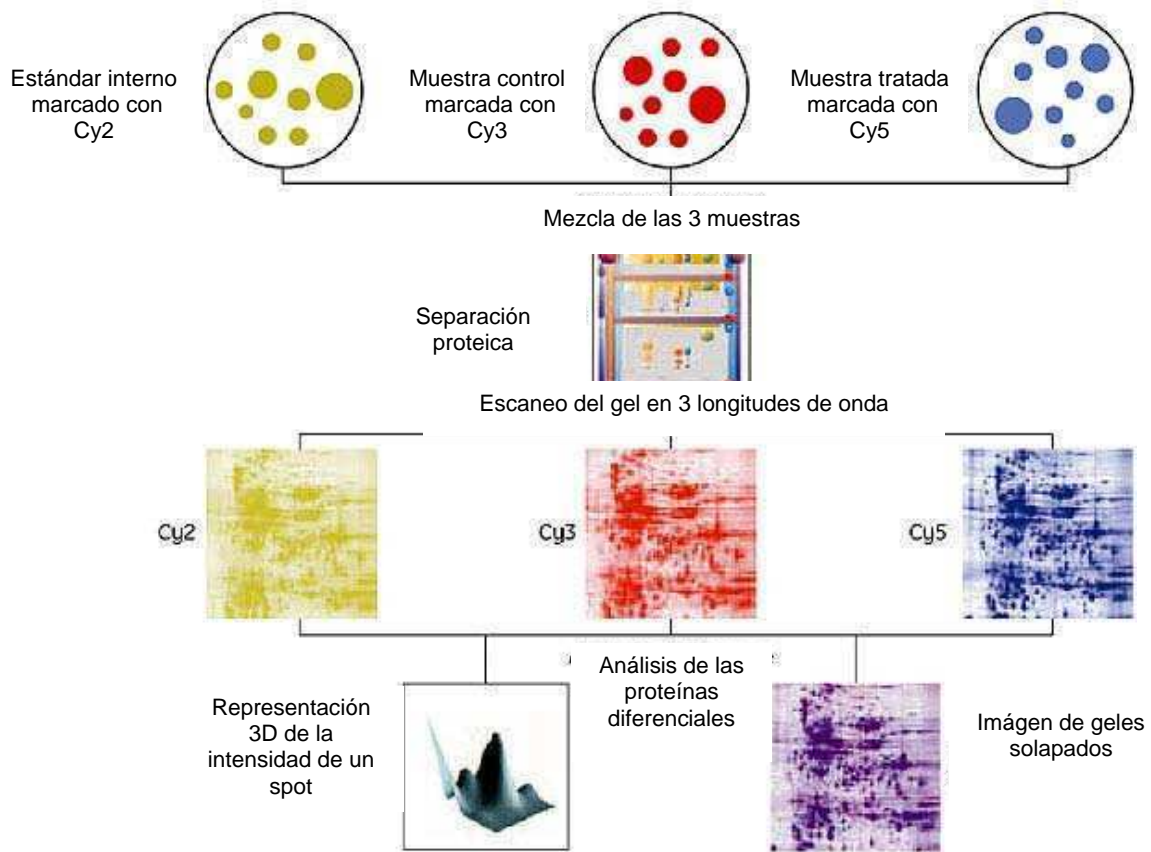


Figura 12. Esquema general del flujo de trabajo en la técnica DIGE. Las proteínas pertenecientes a cada muestra biológica son premarcadas con colorantes fluorescentes Cy2, Cy3 y Cy5 de acuerdo a un diseño experimental adecuado. Luego del marcaje se mezclan las muestras proteicas y se corren electroforéticamente en un mismo gel en dos dimensiones. Luego se escanea cada gel en 3 longitudes de onda y se obtienen las imágenes para cada muestra. El análisis de la expresión diferencial se realiza mediante el uso de un software comercial llamado DeCyder.

Luego de la corrida electroforética los gels son escaneados en tres longitudes de onda independientes (una para cada colorante) (**Figura 13**) y las imágenes son analizadas con un software comercial. Mediante este software los valores de intensidad de fluorescencia para cada spot se miden y expresan como volúmenes de spot, los cuales son normalizados para cada gel. La cuantificación relativa de cada spot es obtenida aplicando un algoritmo que relaciona los volúmenes de cada spot en la muestra frente al gel referencia (Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2) y luego al comparar estos cocientes entre control y tratado se obtiene el dato de si un spot está aumentado o disminuido en una determinada condición.

Cy2(estándar interno)

Cy3 (LBLAST)

Cy5 (L2F6)

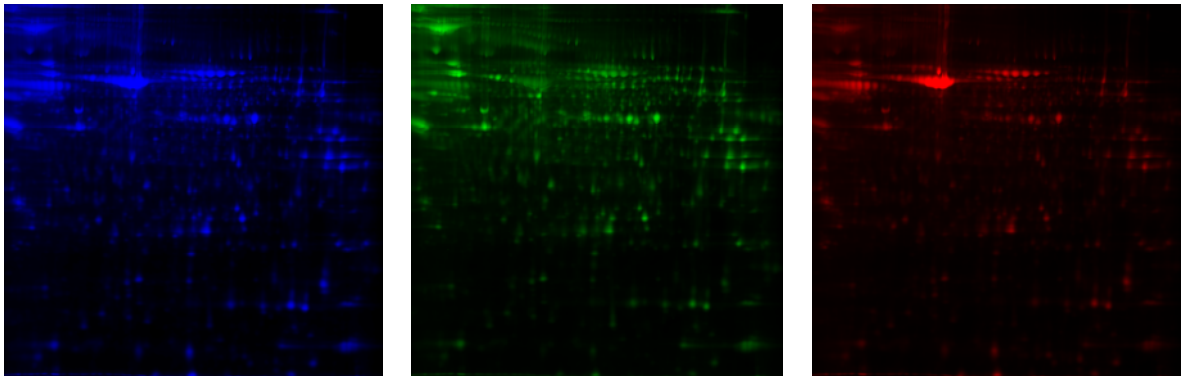


Figura 13. Imágenes de geles en rango de pH 3-11 de dos muestras proteicas de líneas celulares de melanoma (LBLAST y L2F6). Se muestran a modo de ejemplo las imágenes de un gel escaneado en tres longitudes de onda, una para cada colorante.

En cualquier experimento que involucre la aplicación de esta metodología, el diseño experimental es un punto crucial. Es necesario que el número de réplicas biológicas para controlar la variación normal y las réplicas técnicas para controlar la variación en la preparación de la muestra, tengan validez luego al momento de establecer las diferencias estadísticamente significativas. También es necesario tener en cuenta el posible efecto de tinción diferencial por marcaje preferencial de un colorante respecto a otro por lo que es necesario realizar un diseño experimental en el que las muestras control y tratado se encuentren marcadas con Cy3 o Cy5 en forma randomizada.

Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

Como se describiera anteriormente, en los estudios de proteómica de expresión la identificación de proteínas es esencial dado que es el primer paso para estudios posteriores que suponen en última instancia la caracterización funcional. Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal y la detección con anticuerpos específicos. Todos estos métodos generalmente son lentos y onerosos y por lo tanto no resultan apropiados para su utilización como estrategias a gran escala.

Debido a su rapidez, simpleza y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas a gran escala. También permite la caracterización de modificaciones postraduccionales que presentan relevancia fisiológica como la glicosilación y fosforilación.

Si bien esta metodología ha sido utilizada desde hace más de 100 años para el análisis de moléculas pequeñas, recién a principios de los 90' logró reemplazar a la degradación de Edman como método de

elección para la identificación y secuenciación de péptidos y proteínas. Esto fue posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suaves para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa.

La espectrometría de masas se basa entonces en la producción de iones en fase gaseosa de una mezcla de biomoléculas y la separación de los mismos en un analizador de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Los iones así separados son detectados en función de su abundancia.

Para lograr la formación, separación y detección de estos iones, los espectrómetros de masas poseen cuatro elementos:

Fuente de ionización: convierte al analito presente en fase líquida o sólida a iones en fase gaseosa. Dependiendo del tipo de ionización se obtienen iones con carga positiva o negativa y con una única carga o múltiples cargas. En nuestro trabajo, hemos aplicado la fuente de ionización tipo UV-MALDI. En ella los iones son generados por excitación con un láser pulsante (Karas and Hillenkamp, 1988). La muestra se cocrystaliza con un exceso de un compuesto orgánico denominado matriz, que contiene grupos químicos con alta capacidad de absorber luz UV. La matriz absorbe fotones emitidos por el láser y pasa a un estado electrónicamente excitado desde el que transfiere energía a las biomoléculas, las cuales se ionizan con una carga simple y pasan a la fase gaseosa.

Analizador de masas: separa a los iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación individual m/z . Entre los diferentes tipos de analizadores disponibles, uno de los más utilizados en combinación con la ionización tipo MALDI es el denominado tiempo de vuelo o TOF (time of flight). Este consiste en un tubo de una longitud fija sometido a una diferencia de voltaje tal que los iones vuelan a través de él según su relación m/z . A mayor m/z los iones vuelan más rápido y llegan antes al detector

Detector: a él llegan los iones separados según su tiempo de vuelo en el caso de provenir del TOF. La magnitud de la corriente producida por la llegada de las cargas al detector en función del tiempo es usada para determinar la intensidad (abundancia) y el valor m/z del ión.

Procesador: registra los resultados. El espectro de masas resultante es un gráfico de la abundancia de cada ion vs. su relación m/z .

Una configuración especial de la espectrometría de masas es la espectrometría de masas en tandem (MS/MS). Esta consiste en acoplar dos analizadores sucesivos separados por una cámara de fragmentación. En el primer analizador se selecciona un ion precursor de acuerdo a su masa (generalmente el más abundante) y ese ion es luego fragmentado en la cámara de fragmentación por distintas metodologías, por ejemplo: colisión con un gas inerte (ej. nitrógeno, argón o helio) generando varios productos iónicos con valores de m/z diferentes al precursor. Los m/z son analizados en el segundo analizador. Uno de los equipamientos más comúnmente utilizados para este tipo de análisis y que fue

utilizado en nuestros estudios de proteómica de expresión es el MALDI-TOF/TOF, donde el segundo analizador TOF analiza los iones resultantes luego de la fragmentación del péptido.

La fragmentación más común ocurre en las uniones peptídicas, resultando en fragmentos de longitud decreciente (por pérdida sucesiva de un aminoácido) que conservan el extremo amino- o el carboxilo terminal del péptido, denominados *b* o *y* respectivamente. Analizando los tamaños de los iones resultantes, es posible determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido (secuenciación *de novo*), ya que al solapar la serie de iones *y* con los de la serie *b* se obtiene información redundante que es altamente específica de un péptido individual (Steen and Mann, 2004).

En la **Figura 14** se esquematiza un diagrama de un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. En general, estos aparatos se caracterizan por un arreglo colineal de dos analizadores de masas tipo TOF. En el TOF 1 los iones analito son separados, luego una cámara de fragmentación selecciona y fragmenta los iones precursores elegidos para fragmentar. Los fragmentos pasan al TOF 2 donde son también acelerados y analizados.

Mediante la aplicación de esta metodología de identificación de proteínas se logra identificar más del 80% de los spots diferenciales seleccionados de un gel 2D; esto se debe a la mayor información obtenida cuando se acoplan los espectros de huella peptídica más los de fragmentación de iones, como se introducirá en el siguiente apartado.

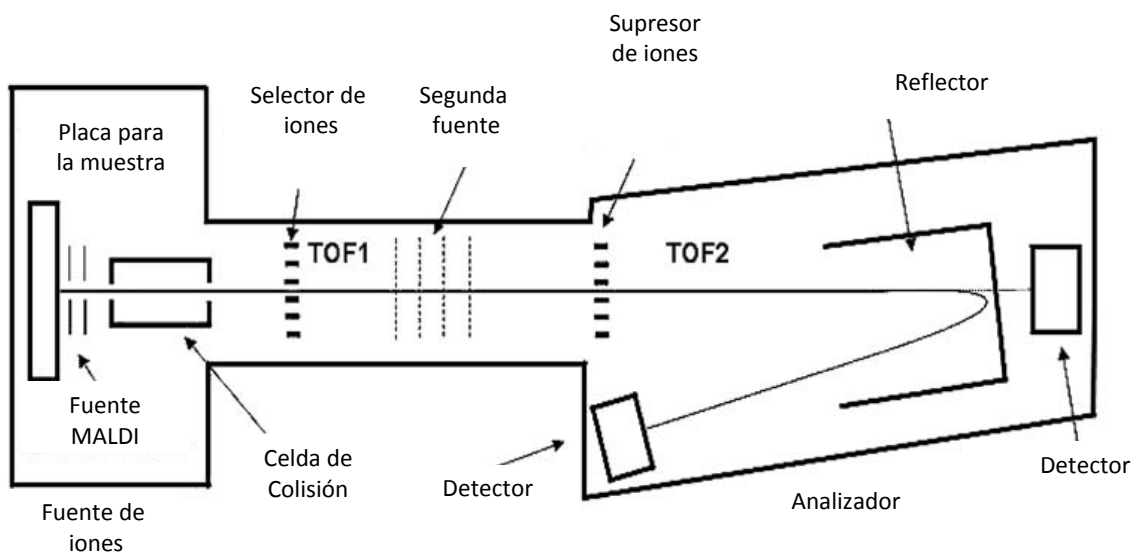


Figura 14. Diagrama esquemático de un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF. Adaptado de Suckau et al. (Suckau et al., 2003).

Identificación de las proteínas por huella peptídica

El mapeo de péptidos o huella peptídica es una de las técnicas más utilizadas para la identificación de proteínas que fueron separadas previamente por técnicas de electroforesis bidimensional. En esta aproximación, las proteínas se digieren con una enzima, normalmente la tripsina que corta en forma específica en el extremo carboxi terminal luego de residuos lisina o arginina si no están estas unidas a prolina. De esta manera se obtiene un mapa de masas peptídicas único para cada proteína denominado **huella peptídica**. Dado que la tripsina cliva a la proteína en sitios específicos, es posible crear un mapa peptídico teórico a partir una secuencia proteica conocida. El análisis de esta mezcla peptídica puede realizarse en diferentes espectrómetros de masa, en este trabajo utilizamos el MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF.

Para la identificación por huella peptídica, luego de la proteína fue digerida, la muestra peptídica es incorporada a una placa metálica de un espectrómetro de masas junto con una matriz que absorberá radiación UV proveniente de un láser y la transmitirá a los péptidos favoreciendo su pasaje al estado gaseoso.

Luego de que la muestra fue analizada y procesada en el espectrómetro de masas, el resultados es un espectro con la información m/z de los péptidos que forman parte de esa proteína. Esa información, que es fácilmente transformada a masas peptídicas experimentales, es comparada con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en bases de datos (EMBL, NCBI, Genbank, Swiss Prot). Para ello se han desarrollado diversos softwares o motores de búsqueda como el MASCOT. Para la identificación correcta de la proteína se requiere que las masas de un número significativo de péptidos coincidan con las masas teóricas de los péptidos de la proteína candidata y que cubran al menos parte de la secuencia de dicha proteína. Además para realizar la búsqueda es necesario tener en cuenta parámetros específicos como número de sitios de clivaje perdidos, tipo de masa molecular ingresada, modificaciones químicas en los péptidos conocidas (por ej. las introducidas por procedimientos experimentales como la alquilación de residuos de cisteína por iodoacetamida).

La identificación a través de motores de búsqueda es una identificación probabilística que da como resultado una proteína identificada con un determinado score de probabilidad. Una forma de aumentar la probabilidad de identificar una proteína es aportando más información a la búsqueda como por ejemplo el espectro de fragmentación de uno o mas péptidos que forman parte de la huella peptídica. En este caso, para obtener el espectro de fragmentación, es necesario aplicar espectrometría de masas en tándem, como la descrita anteriormente y que fue aplicada en este trabajo.

La metodología iTRAQ para la cuantificación e identificación por espectrometría de masas basada en LC-TQ Orbitrap

Las metodologías de detección basadas en tinciones o aquellas que involucran el marcaje previo de las proteínas como la tecnología DIGE, entre otras, se basan en la electroforesis bidimensional como primer paso para la separación de proteínas en una mezcla compleja. Normalmente, la identificación posterior por espectrometría de masas se basa en identificar aquellas proteínas cuya expresión resultó ser diferencial entre la condición tratada vs. control, permaneciendo desconocidas aquellas proteínas que forman parte de la muestra en estudio pero cuya expresión no se alteró por el tratamiento. Esto representa a veces una limitación a la hora de interpretar los datos en el contexto biológico en el cual se encuentran.

Hace pocos años un gran avance en el campo de la proteómica permitió desarrollar una nueva tecnología independiente de geles bidimensionales que se basa en el marcaje previo de las proteínas con etiquetas isobáricas para la cuantificación absoluta y relativa: iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*) (Ross et al., 2004)

Esta metodología permite utilizar 4 u 8 etiquetas o *tags* de masas diferentes para marcar péptidos y analizarlos específicamente en una mezcla de 4 a 8 muestras diferentes. Cuando los péptidos marcados son secuenciados por espectrometría de masas MS/MS, las marcas o etiquetas dan lugar a iones de distinta masa correspondientes a fragmentos peptídicos los cuales pueden ser cuantificados.

La gran ventaja de este sistema no solo radica en la posibilidad de analizar 4 muestras biológicas en el mismo experimento, lo cual disminuye la variabilidad entre muestras, sino que al marcarse todos los péptidos presentes en la muestra biológica éstos pueden ser analizados y cuantificados en el espectrómetro de masas generando como resultado, mediante búsqueda en simultáneo en bases de datos, una lista de todas las proteínas identificadas presentes en la muestra y sus valores de cuantificación. De esta manera no sólo puede conocer qué proteínas se expresan diferencialmente sino también catalogar las proteínas presentes en la muestra analizada.

En la **Figura 15** se encuentran representadas las etiquetas isobáricas involucradas en la metodología iTRAQ. Como vemos, los isóbaros poseen todos la misma masa de 145 Da y están constituidos por 3 partes: un grupo reportero de entre 114 a 117 Da, un grupo balance de entre 28 a 32 Da y un grupo amino reactivo que es quien reaccionará con los péptidos. Los grupos reporteros, que se generan durante la fragmentación de los péptidos precursores, son los que serán cuantificados en el espectrómetro de masas por lo que la tecnología de 4 etiquetas genera 4 fragmentos de pesos 114, 115, 116 y 117. De esta manera, un mismo péptido proveniente de muestras distintas correrá igual durante la separación y el primer detector del espectrómetro de masas, pero al ser fragmentado dirá cuanto estaba representado en la muestra original.

Normalmente, el procedimiento de rutina implica la digestión trípica de las muestras proteicas involucradas en el experimento y el posterior marcaje de los péptidos resultantes con las etiquetas isobáricas. Luego, las muestras peptídicas etiquetadas son inyectadas en un equipo de cromatografía líquida de dos dimensiones en donde se separan en una primera dimensión en una columna de intercambio iónico acoplado a una segunda columna de tipo fase reversa. Esta columna inyecta en modo “online” los péptidos eluidos en el espectrómetro de masa a través de un ionizador de tipo electrospray (ESI).

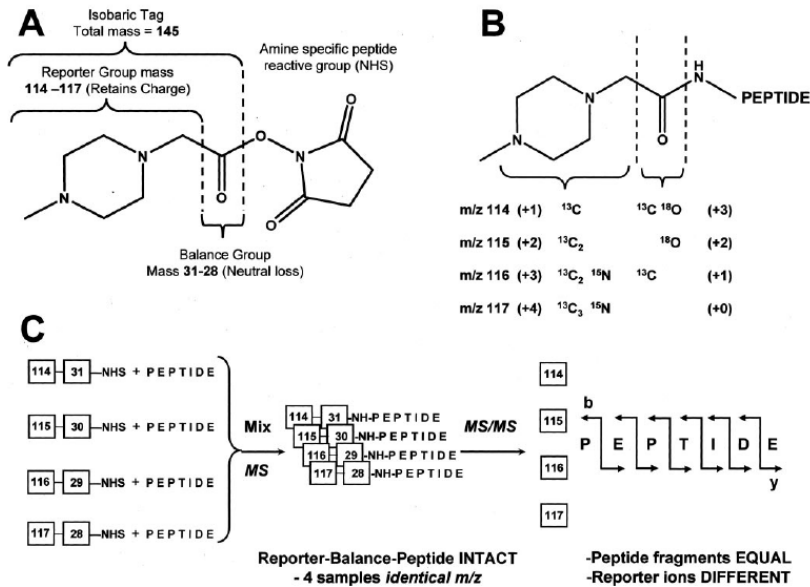
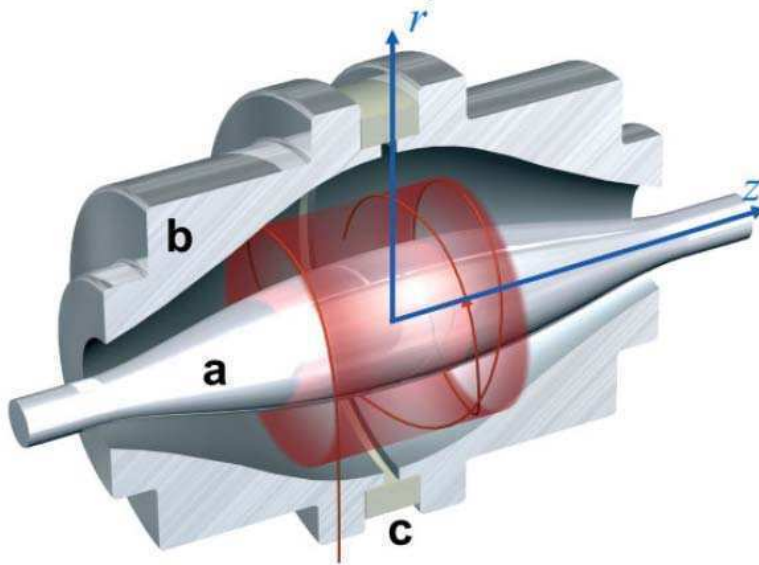


Figura 15. Tecnología de marcaje ITRAQ. A) Las etiquetas con las que son marcadas los péptidos presentan todas el mismo peso pero varían en el peso del grupo reportero que se libera sólo después de la fragmentación MS-MS. B) La fórmula molecular diferente en los distintos grupos reporteros determina el peso de los mismos. C) Los péptidos correspondientes a distintas muestras biológicas pueden ser analizados en un mismo experimento luego del marcaje diferencial. Se mezclan y se siembran en un equipo de HPLC para ser separados y analizados en el espectrómetro de masa.

El mejor espectrómetro de masas MS/MS para realizar la cuantificación de péptidos de baja relación m/z (masa/carga) se ha introducido al mercado recientemente bajo el nombre de Orbitrap. El mismo consta de una celda de colisión de 8 polos que permite la generación de “alta energía de disociación inducida por colisión” o HCD (del inglés *higher energy collision-induced dissociation*) pudiéndose variar la energía de colisión para generar fragmentos iónicos de masa alta o baja. Tal como su nombre lo indica es una trampa de iones pero su estructura no es convencional dado que no existe una fuerza magnética que mantenga los iones dentro del dispositivo. En cambio, los iones (péptidos) son atrapados mediante un campo eléctrico. En un orbitrap (**Figura 16**) los péptidos son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos del analizador y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es balanceada por fuerzas centrífugas.

Así los iones dan vueltas en espiral alrededor del electrodo central. Adicionalmente los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. De esta manera, los iones con una específica relación masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central.

La frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z).



$$U(r, z) = \frac{k}{2} \cdot \left\{ z^2 - r^2 / 2 + R_m^2 \cdot \ln(r / R_m) \right\}$$

Figura 16. Representación esquemática de un corte transversal del analizador de masas Orbitrap. Los iones se mueven en espiral alrededor del electrodo central (a). Un electrodo externo (b) está dividido en dos partes por un anillo de cerámica (c) aislante. La corriente inducida por los iones en movimiento es detectada por un amplificador diferencial entre las dos mitades del electrodo externo. Los iones con diferente m/z en el Orbitrap pueden ser determinados a partir de sus frecuencias de oscilación luego de una Transformada de Fourier.

Como vemos, los alcances de la espectrometría de masas son muy amplios y el uso de un determinado aparato va intrínsecamente asociado a la técnica proteómica aplicada y al diseño experimental realizado. Como se presentará en la sección Resultados, los datos obtenidos de ambas herramientas de espectrometría de masas confirman las diferencias de expresión en algunas proteínas relacionadas con progresión tumoral.

Hipótesis de trabajo

Nuestro laboratorio se encuentra enfocado en el estudio del rol SPARC como proteína protumorigénica. El particular interés que se le ha dado a esta proteína surge de la observación de que se encuentra sobreexpresada en una amplia mayoría de tumores. El descubrimiento u observación más importante que ha publicado nuestro laboratorio demuestra que cuando la expresión de SPARC es disminuida en una línea celular de melanoma, estas no generan tumor al ser inyectadas en ratones atímicos en comparación con la línea control que presenta altos niveles de SPARC. La hipótesis que se postula luego de esta observación y otras presentes en la literatura, es que el establecimiento del tumor y la progresión tumoral en melanoma son procesos regulados por SPARC a través de la modulación de la expresión de proteínas involucradas en procesos de carcinogénesis.

Objetivo General

El objetivo principal de esta tesis de doctorado es la identificación de los intermediarios moleculares de la acción protumoral de SPARC con el objetivo de esclarecer las vías moleculares por las cuales SPARC lleva a la progresión tumoral. El enfoque experimental sobre el que se basó el trabajo fue la aplicación de técnicas de proteómica de expresión para la búsqueda y posterior validación de las proteínas que están correguladas junto por SPARC.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el perfil diferencial de proteínas secretadas al medio extracelular por las líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC, mediante electroforesis bidimensional o iTRAQ e identificación de proteínas por espectrometría de masa.
2. Evaluar el perfil diferencial de proteínas de extractos celulares en las líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC, mediante electroforesis bidimensional e identificación de proteínas por espectrometría de masa.

3. A partir del análisis de los resultados de los objetivos 1 y 2, definir un subgrupo de proteínas cuya relevancia biológica sea de nuestro interés con el objeto de iniciar la segunda etapa de los estudios tendientes a la validación técnica, biológica y funcional, mediante técnicas de biología molecular y celular y ensayos funcionales específicos para cada proteína.
4. Proponer un mecanismo por el cual SPARC puede ejercer su acción protumoral a través de los intermediarios moleculares encontrados.

Modelos de estudio

La línea de melanoma humano denominada IIB-MEL-LES fue establecida y caracterizada en nuestro instituto, presentando altos niveles de expresión de SPARC de acuerdo a evaluaciones a nivel de ARNm y proteína en comparación con melanocitos normales que no expresan SPARC (Ledda et al., 1997b). Se demostró que esta línea presenta mayor capacidad invasiva en ensayos invasión de matrigel con respecto a otras líneas de melanoma (5 a 10 veces mas) y la inyección de estas células en ratones nude provocó el desarrollo de tumores a los 34 días aproximadamente (Ledda et al., 1997a) mostrando mayor rapidez en la formación del tumor comparada con otras líneas evaluadas. Nuestro modelo de estudio se basa en la comparación por estrategias de proteómica de líneas celulares de melanoma con altos niveles de expresión de SPARC vs. esas mismas líneas con bajos niveles de expresión inducidos por ingeniería genética.

Utilizamos diferentes herramientas de regulación de la expresión de SPARC, ya sea para disminuir la expresión o para rescatar el fenotipo de células de melanoma con expresión disminuida. En la **Figura 17**, se esquematizan las líneas celulares y las herramientas utilizadas.

Como se describirá posteriormente en la sección Resultados, algunos modelos fueron utilizados para estudios de proteómica de expresión, mientras que otros fueron utilizados para la validación de las proteínas diferenciales encontradas por proteómica. El uso de diferentes herramientas de la regulación de SPARC tiene como objetivo evitar que las diferencias encontradas se deban a la herramienta utilizada para regular SPARC y de esta manera poder atribuir los efectos sólo a los niveles diferenciales de expresión de SPARC.

Además, se utilizó una nueva línea de melanoma humano con expresión de SPARC regulada, la A375N, que validó que los resultados alcanzados no son privativos de una única línea de melanoma.

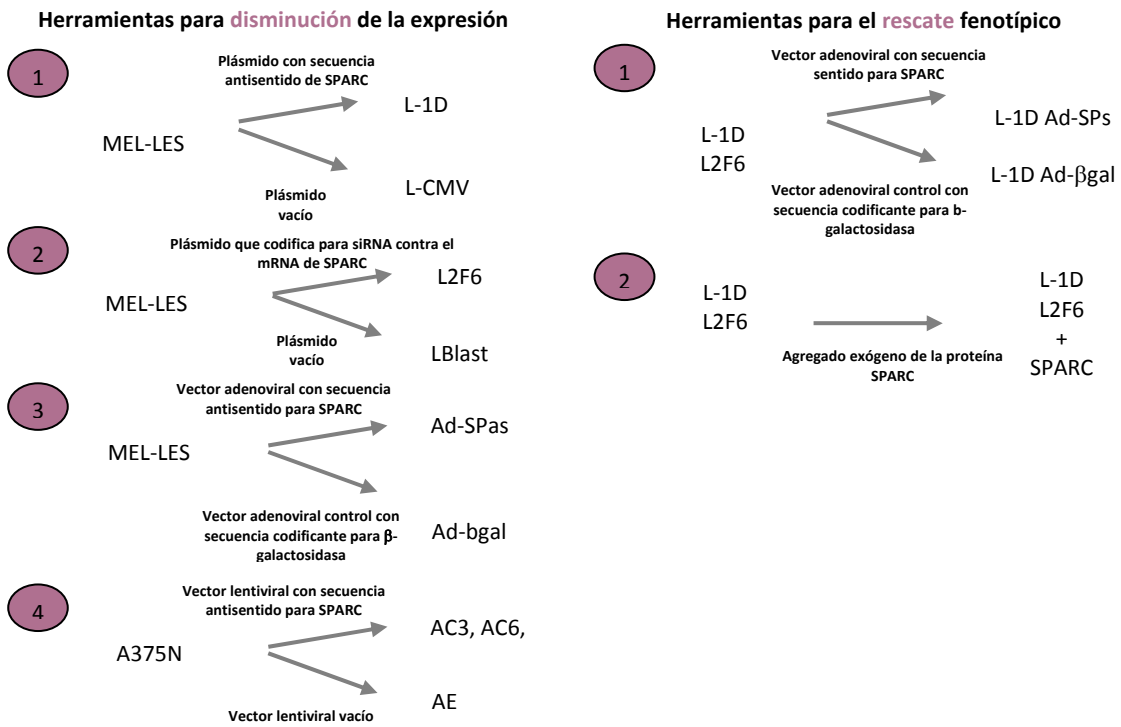


Figura 17. Herramientas aplicadas para regular la expresión de SPARC. Se utilizaron plásmidos con la secuencia antisentido de SPARC, plásmidos codificantes de ARN de interferencia contra el ARNm de SPARC, vectores adenovirales con la secuencia antisentido o sentido de SPARC, vectores lentivirales con microRNA contra SPARC, y SPARC humana exógena. En la sección Materiales y Métodos se describe la obtención de estas herramientas.

Resultados

CAPITULO I: Análisis proteómico del secretoma y extractos de líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC

Uso de la tecnología DIGE en la búsqueda de proteínas reguladas por SPARC

Como se comentara anteriormente, el objetivo principal de este trabajo de tesis de doctorado fue conocer los intermediarios moleculares por los cuales SPARC ejerce su efecto protumoral. Es por ello que se comenzó el estudio mediante el análisis proteómico del secretoma y de extractos de líneas celulares de melanoma con niveles regulados de SPARC utilizando la tecnología DIGE (descrita previamente en la Introducción). Cabe mencionar que el secretoma involucra a todas aquellas proteínas secretadas al medio extracelular tanto por vías clásicas de secreción como por vías alternativas.

Como antecedente previo a este estudio, en el laboratorio se había realizado un análisis proteómico del secretoma de las líneas de melanoma CMV (alto nivel de SPARC, genera tumores *in vivo*) y 1D (bajo nivel de SPARC, no genera tumor *in vivo*) descritas anteriormente en la sección “Modelos de estudio. Estos análisis fueron realizados mediante electroforesis bidimensional seguida de tinción con nitrato de plata, la cual presenta la limitación del estrecho rango dinámico de la técnica, la cual no se corresponde con el amplio rango dinámico de la expresión proteica, además de las limitaciones en cuanto a reproducibilidad (ver Introducción, sección “Electroforesis bidimensional”). En efecto, mediante estos estudios (Sosa et al., 2007) se lograron detectar tan solo 500 spots aproximadamente en el secretoma, de los cuales 23 resultaron ser proteínas expresadas diferencialmente.

Mediante colaboraciones científicas establecidas entre nuestro laboratorio y dos laboratorios de referencia en Madrid en el área de proteómica, pudimos aplicar la tecnología DIGE tanto para el análisis del secretoma como para extractos celulares. En ambos casos, las líneas de melanoma estudiadas fueron: LBLAST (alto nivel de SPARC, genera tumores *in vivo*) y L2F6 (bajo nivel de SPARC, no genera tumor *in vivo*).

vivo), que difieren respecto a las líneas de melanoma CMV y 1D en la herramienta de regulación de la expresión de SPARC.

-Para el análisis proteómico del secretoma se realizaron dos experimentos constituidos por 4 réplicas biológicas cada uno:

- EXPERIMENTO 1: rango de pH analizado 3-11 NL, longitud de la tira de 18 cm
- EXPERIMENTO 2: rango de pH analizado 4-7, longitud de la tira de 18 cm

-Para el análisis proteómico de extractos celulares se realizó 1 experimento constituido por 6 réplicas biológicas:

- EXPERIMENTO 3: rango de pH analizado 3-11 NL, longitud de la tira de 18 cm

Para la aplicación de la metodología DIGE, las proteínas pertenecientes a las 4 réplicas biológicas del secretoma, las 6 réplicas biológicas de los extractos celulares y los estándares internos respectivos, fueron marcados con los colorantes fluorescentes Cy2, Cy3 y Cy5 de acuerdo a como se indica en la sección Materiales y Métodos (**Tabla 9**).

La detección de spots mediante el software DeCyder reveló aproximadamente 1800 spots por gel en el secretoma analizado en rango de pH 4-7 (EXPERIMENTO 1), 2300 spots por gel en el secretoma analizado en rango de pH 3-11 NL (EXPERIMENTO 2) y cerca de 2200 spots en el análisis de los extractos celulares en rango de pH 3-11 NL (EXPERIMENTO 3), todos en el rango de 12-120 kDa. El análisis T-test de los volúmenes de spot fue realizado en aquellos spots presentes en al menos el 75% de las imágenes que forman parte del experimento y en aquellos cuya relación L2F6/LBLAST sea mayor de 1.5 o menor de -1.5. Aquellos spots con valor $P < 0,05$ derivado del T-test fueron considerados como expresados diferencialmente entre las dos condiciones en estudio.

Mediante una colaboración establecida entre nuestro laboratorio y el Intelligent Data Analysis Group, se desarrolló un modelo lineal de análisis mixto (Fernandez et al., 2008) el cual nos permitió analizar los datos en forma independiente al algoritmo de cálculo que aplica el software DeCyder. Mediante este análisis sobre los tres experimentos se obtuvo una lista de spots diferenciales que fue sumada a lista obtenida por el DeCyder. Posteriormente realizamos una edición manual de los resultados eliminando aquellos spots que en los geles eran artefactos.

Una vez obtenida la lista final de spots diferenciales, éstos fueron cortados automáticamente del gel de poliacrilamida mediante la ayuda de un *spot picker* y digeridos en el gel con tripsina de manera de obtener un digerido peptídico. Posteriormente, fueron identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y búsqueda en base de datos MASCOT, la cual se basó en la identificación de proteínas por huella peptídica en algunos casos o huella peptídica más fragmentación de péptidos en otros. En los experimentos 1, 2 y 3 se obtuvieron 64, 56 y 114 spots que cumplían con los criterios de estar diferencialmente expresados y que fueron identificados exitosamente por huella peptídica y/o fragmentación de péptidos. En la **Figura 18, panel superior**, se muestran las imágenes representativas de los estándares internos de tres geles bidimensionales correspondientes a cada experimento. Además, se observa en el panel inferior que como era de esperarse en estos análisis, los spots correspondientes a SPARC se encontraron disminuidos en L2F6.

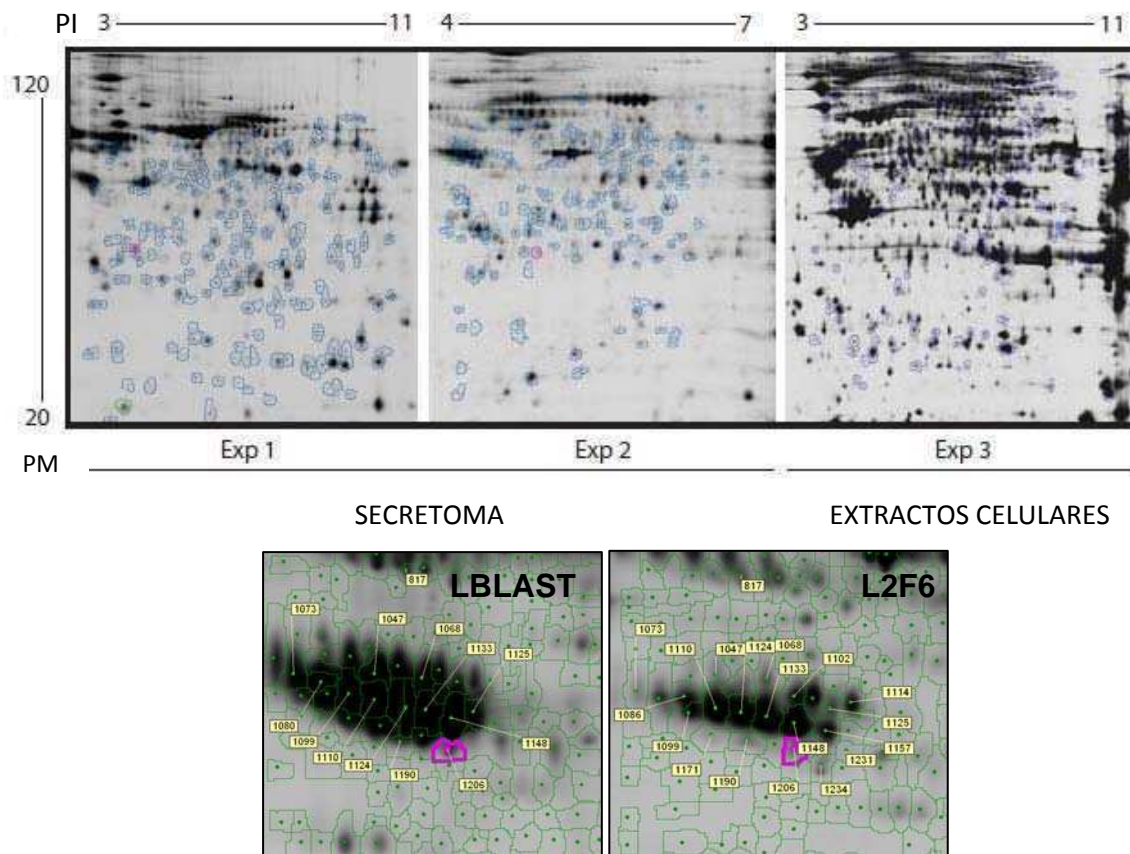


Figura 18. Panel superior: Imágenes representativas de geles bidimensionales de los tres experimentos realizados, dos en medios condicionados (Exp. 1 y 2) y uno en extractos celulares (Exp. 3). Los spots diferenciales (T-test $p < 0,05$ y Ratio L2F6/LBLAST > 1.5 o < -1.5) están remarcados en azul. **Panel inferior:** Imágenes de los spots correspondientes a SPARC en 1 gel correspondiente al experimento 2 en rango de pH 4-7. En el mismo gel se encuentran cargadas las proteínas provenientes del medio condicionado de las muestras LBLAST y L2F6 marcadas con un fluoróforo diferente. Se puede observar la diferencia en el nivel de expresión de SPARC, siendo mucho menor en L2F6. En amarillo se encuentran indicados los números de spots correspondientes a SPARC en el análisis del gel bidimensional. Las diferentes isoformas de SPARC observadas surgirían de distintos estados de glicosilación y se evidencian en el gel como si fueran un “rosario” de manchas.

En la tabla presentada en el ANEXO I, se listan las proteínas diferenciales identificadas en los experimentos realizados en esta tesis. Tanto para el secretoma como para las muestras de extractos celulares, el análisis de clustering o agrupamiento jerárquico no supervisado de las proteínas diferenciales mostró que las muestras LBLAST y L2F6 fueron eficientemente discriminadas en función de las diferencias de expresión de proteínas (**Figura 19**).

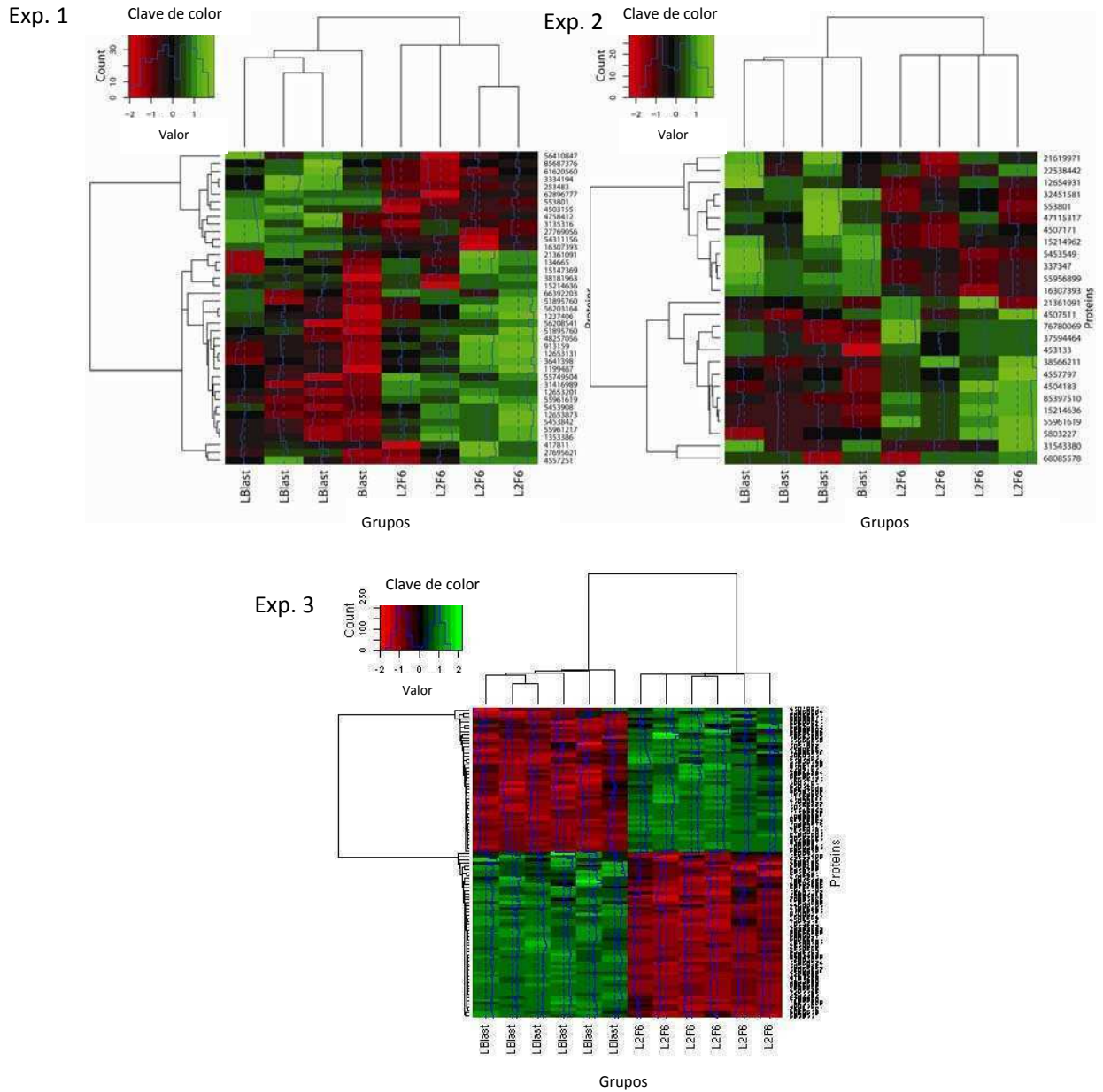


Figura 19. Mapas de color que muestran la agrupación por análisis jerárquico no supervisado de las proteínas con expresión diferencial identificadas por MALDI en el 100% de los geles para cada experimento DIGE. Las columnas representan las imágenes de las réplicas los geles analizados en cada experimento y las proteínas diferenciales están representadas en filas . A la derecha está indicado su número de acceso en la base de datos NCBI. En la parte superior izquierda de cada mapa está indicado la clave de color de acuerdo a su relación de expresión L2F6/LBLAST y las líneas azules representan el nivel de resion de dicha proteína en un gel particular con respecto al valor medio expresion de todas las proteínas diferenciales en dicho gel.

En los estudios de proteómica que se realizaron previamente en el laboratorio utilizando como modelo experimental las células CMV vs. 1D y aplicando la tecnología de proteómica basada en electroforesis bidimensional y seguida de tinción con plata, se encontraron 23 proteínas diferenciales de un total de 500 spots. De esas 23 proteínas, 12 fueron identificadas exitosamente por espectrometría de masas MALDI-TOF (Sosa et al., 2007). En este nuevo estudio utilizando otra herramienta de regulación de SPARC, se observó que 3 de las 12 proteínas identificadas en el primer análisis volvieron a salir como diferenciales, estas son: N-caderina, renina y colágeno V (ver ANEXO I). Además, otras proteínas que han sido asociadas con los efectos biológicos de SPARC se detectaron expresadas diferencialmente y correlacionaron con la expresión de SPARC en este modelo: colágeno I cadena $\alpha 2$ y trombospondina I se encontraron disminuidas en L2F6 donde SPARC está también disminuida.

Caracterización del secretoma por iTRAQ y espectrometría de masas basada en LC-TQ Orbitrap

Los resultados anteriormente descriptos, demuestran claramente la superioridad de la tecnología DIGE comparada con otras técnicas que se basan en la tinción de los geles posterior a la corrida electroforética. Además, el amplio rango dinámico de esta metodología permitió detectar un número mayor de proteínas diferenciales en el secretoma en comparación con aquellas obtenidas mediante tinción con plata.

Sin embargo, y como comentáramos en la introducción de esta tesis, las metodologías de detección basadas en tinciones como la tecnología DIGE utilizan la electroforesis bidimensional como primer paso para la separación de proteínas en una mezcla compleja. Normalmente, la identificación posterior por espectrometría de masas se basa en identificar aquellas proteínas cuya expresión resultó ser diferencial entre la condición tratada vs. control, permaneciendo desconocidas aquellas proteínas que forman parte del secretoma pero cuya expresión no se alteró por el tratamiento. Esto representa una limitación a la hora de interpretar los datos en el contexto biológico en el cual se encuentran. Es por eso que decidimos aplicar la metodología iTRAQ con el objetivo de confirmar las diferencias en los niveles de expresión de proteínas encontradas por DIGE y además, para caracterizar las proteínas pertenecientes al secretoma de nuestras muestras de melanoma.

Hasta el momento el equipamiento necesario para llevar a cabo estos experimentos no se encuentra disponible en la Argentina. Debido a una colaboración científica establecida entre nuestro laboratorio y la Unidad de Proteómica del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) en Madrid y gracias a una beca (Boehringer Ingelheim Fonds) que financió una estadía en el laboratorio, pudimos analizar el secretoma de nuestras células de melanoma LBLAST y L2F6 con el objetivo de ahondar en

el conocimiento de las proteínas que constituyen el secretoma además de conocer las diferencias en los niveles de expresión.

La **Tabla 7** muestra el diseño experimental que realizamos aplicando la herramienta 4-plex o de 4 etiquetas. Como se puede observar en la figura, nuestro diseño experimental se basó en 2 experimentos separados que comprendían el análisis de 4 réplicas biológicas cada una de ellas involucrando una muestra de secretoma LBLAST y otra de L2F6. Las muestras proteicas se digirieron con tripsina y se marcaron los péptidos resultantes con el kit de iTRAQ 4-plex. De esta manera se analizaron 2 réplicas biológicas en cada experimento, de acuerdo a lo indicado en la **Tabla 7**.

Las muestras peptídicas etiquetadas fueron inyectadas en un equipo de cromatografía líquida en dos dimensiones y los eluidos fueron analizados en un espectrómetro de masas Orbitrap. Los resultados obtenidos se analizaron con un software que estableció relaciones de abundancia 114/115 y 116/117 (LBLAST/L2F6) y los resultados se expresaron como valores superiores a 1 en el caso de estar aumentada su expresión en LBLAST y menores a 1 en el caso de estar disminuida su expresión.

Los resultados demostraron que más de 3000 proteínas forman parte del secretoma y entre las diferenciales se volvieron a repetir las encontradas por la metodología DIGE además de otras que esta técnica revela. Dada la gran cantidad de datos obtenidos, resulta complejo representarlos en una única tabla por lo que la **Tabla 8** es una parte de una lista de algunas de las proteínas diferenciales y se destacan algunas de las que se repiten en la metodología DIGE como colágeno tipo I, trombospondina, clusterin, entre otras.

Diseño experimental en SECRETOMA	
EXP 1	114: LBLAST 1
	115: L2F6 1
	116: LBLAST 2
	117: L2F6 2
EXP 2	117: LBLAST 3
	116: L2F6 3
	115: LBLAST 4
	114: L2F6 4

Tabla 7. Nuestro diseño experimental involucró 2 experimentos con 2 réplicas biológicas cada uno de ellos, dado que aplicamos el marcaje basado en 4 etiquetas (4 plex). Las relaciones 114/115 y 116/117 (LBLAST/L2F6) se muestran en la Tabla 8.

Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description	114/115	116/117
20,04	97	2330	212,81	fibronectin 1 isoform 4 preproprotein [Homo sapiens]	1,517	1,383
42,70	52	466	103,18	vimentin [Homo sapiens]	1,091	1,185
22,82	61	609	102,65	albumin precursor [Homo sapiens]	1,382	1,575
33,07	41	375	95,88	beta actin [Homo sapiens]	1,856	1,206
22,05	41	1170	83,34	thrombospondin 1 precursor [Homo sapiens]	1,775	2,370
22,57	40	1028	83,08	collagen, type VI, alpha 1 precursor [Homo sapiens]	1,676	1,490
45,16	45	434	76,40	enolase 1 [Homo sapiens]	1,268	1,391
5,96	256	33423	68,98	titin isoform N2-A [Homo sapiens]	1,323	1,461
25,70	33	646	62,68	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 [Homo sapiens]	1,318	1,261
24,20	29	376	61,17	actin, gamma 2 propeptide [Homo sapiens]	1,317	1,120
52,86	24	140	59,77	profilin 1 [Homo sapiens]	1,078	1,356
33,90	37	531	57,54	pyruvate kinase 3 isoform 1 [Homo sapiens]	1,362	1,241
43,64	31	165	56,06	peptidylprolyl isomerase A isoform 1 [Homo sapiens]	0,892	0,886
22,27	26	449	55,77	clusterin isoform 2 [Homo sapiens]	1,543	1,446
5,59	211	27118	53,29	titin isoform novex-2 [Homo sapiens]	1,538	1,584
11,61	41	603	52,69	hypothetical protein LOC84190 [Homo sapiens]	0,897	1,568
17,82	26	724	51,75	heat shock 90kDa protein 1, beta [Homo sapiens]	1,625	1,229
6,00	58	1801	51,71	InaD-like protein isoform 1 [Homo sapiens]	1,305	1,551
22,32	26	654	50,16	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) [Homo sapiens]	1,505	1,643
21,28	24	376	49,01	hypothetical protein LOC345651 [Homo sapiens]	1,682	1,025
16,75	32	585	47,51	galectin 3 binding protein [Homo sapiens]	1,451	1,390
14,52	25	854	46,92	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 isoform 1 [Homo sapiens]	1,319	1,352
10,07	46	149	46,32	hypothetical LOC403340 [Homo sapiens]	0,901	1,504
6,26	80	1517	46,18	zinc finger homeobox 2 [Homo sapiens]	0,901	1,504
1,83	37	601	45,16	beta isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 isoform a [Homo sapiens]	0,864	1,524
29,25	18	335	42,82	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	1,455	1,423
8,14	35	172	41,40	SP140 nuclear body protein isoform 2 [Homo sapiens]	0,895	1,567
25,48	32	683	41,22	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa [Homo sapiens]	1,580	2,108
10,28	16	282	40,21	insulin-like growth factor binding protein 7 [Homo sapiens]	2,054	2,560
17,82	30	303	38,91	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) [Homo sapiens]	1,637	1,828
11,71	51	299	38,60	regucalcin [Homo sapiens]	0,876	1,559
37,04	24	135	38,01	beta-galactoside-binding lectin precursor [Homo sapiens]	1,035	1,005
18,28	33	279	37,38	GSK-3 binding protein FRAT1 [Homo sapiens]	0,933	1,493
7,25	18	952	37,34	PREDICTED: similar to protein expressed in prostate, ovary, testis, and placenta 15 isoform 6 [Homo sapiens]		
30,42	22	332	36,15	lactate dehydrogenase A [Homo sapiens]	1,373	1,360
38,46	21	156	35,99	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor [Homo sapiens]	1,806	1,876
72,93	21	229	35,99	ubiquitin B precursor [Homo sapiens]	1,082	2,148

Tabla 8. Algunas de las proteínas del secretoma marcadas por metodología iTRAQ. Se identificaron mas de 3000 proteínas presentes en el secretoma, algunas de ellas se encuentran representadas aquí. Asimismo, las señaladas en rojo son aquellas que surgieron como diferenciales en el experimento DIGE, entre ellas, SPARC colágeno tipo IV y vimentina.

Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar la expresión diferencial de algunas proteínas identificadas previamente mediante electroforesis bidimensional. Además, como parte de la colaboración científica establecida entre nuestro laboratorio, la unidad de proteómica del CNIC y el grupo de análisis de datos de la Universidad Católica de Córdoba, los datos obtenidos en este experimento continúan siendo analizados con el objetivo de aplicar nuevas estrategias de análisis ontológico comparando el perfil de proteínas diferenciales contra el grupo total de proteínas presentes en la muestra.

Análisis ontológico de los resultados obtenidos por proteómica

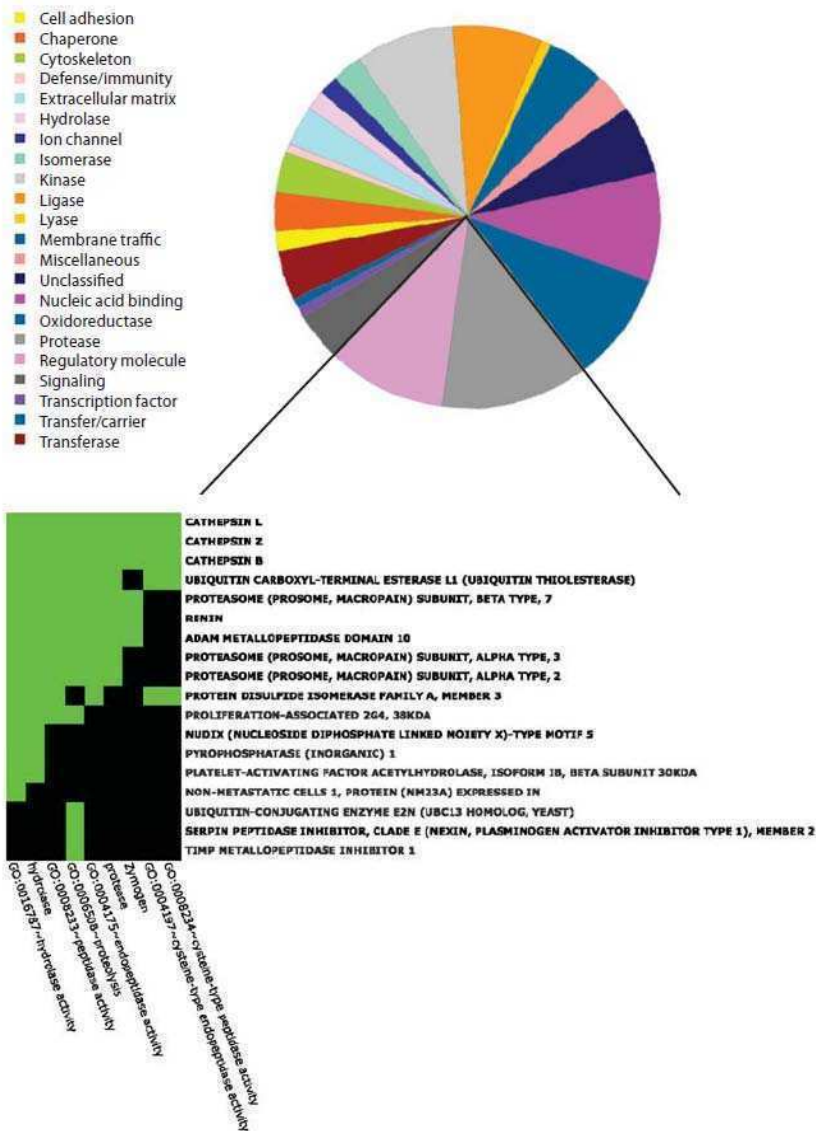
Las técnicas experimentales de alto rendimiento como la genómica y la proteómica estudian un sistema biológico en su totalidad dando como resultado una lista de genes/proteínas diferenciales compuesta generalmente por cientos de datos. El análisis ontológico de estos resultados permite una mejor interpretación del fenómeno en estudio y es de fundamental importancia al momento de determinar qué procesos o mecanismos biológicos están siendo modificados en el sistema. En nuestro caso, la diferencia entre la muestra control vs. tratada es la expresión de SPARC y las variables dependientes de esa variación son las proteínas diferenciales determinadas por nuestro análisis proteómico.

Con el objetivo de ahondar en el conocimiento de los cambios biológicos que existen en nuestro sistema biológico, realizamos dos análisis ontológicos independientes sobre los resultados de proteínas diferenciales del secretoma y de extractos celulares mediante la tecnología DIGE. Para esto aplicamos las herramientas DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery) (Huang da et al., 2007) y PANTHER (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships) (Thomas et al., 2003a; Thomas et al., 2003b).

Mediante la aplicación de la herramienta PANTHER, analizamos las proteínas diferenciales obtenidas en secretoma y extractos celulares las cuales fueron clasificadas en familias y subfamilias de proteínas de función compartida. Mediante la herramienta DAVID vimos las relaciones funcionales enriquecidas de las proteínas diferenciales del secretoma de acuerdo a su GeneID y fueron clasificadas de acuerdo a las categorías Procesos Biológicos, Función Molecular y Componentes Celulares.

La **Figura 20 a** muestra que la clasificación de proteínas diferenciales del secretoma por grupos ontológicos (*gene ontology* (GO)) de la categoría función molecular demostró que el grupo mas abundante en los niveles de proteínas reguladas por SPARC es el grupo de las proteasas. Cuando esas mismas proteínas diferenciales del secretoma (Exp 1. y Exp 2.) fueron analizadas mediante la herramienta DAVID, se corroboró que el grupo ontológico mas enriquecido fue el de las proteínas involucradas en la proteólisis formando parte de este grupo principalmente las catepsinas.

A) ANALISIS ONTOLOGICO DEL SECRETOMA



B) ANALISIS ONTOLOGICO DE LOS EXTRACTOS CELULARES

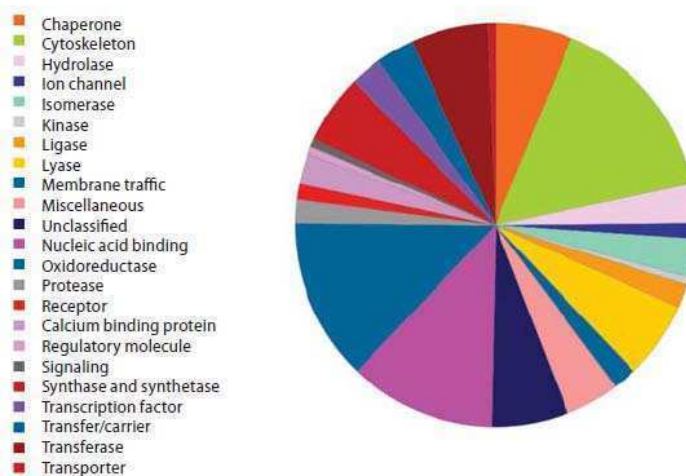


Figura 20 a) Análisis ontológico de las proteínas diferenciales del secretoma mediante uso de la herramienta PANTHER y DAVID. Se muestra en el panel superior un gráfico de torta con las diferentes categorías (listadas en la columna de la izquierda) a las que corresponden las 108 proteínas diferenciales del secretoma (Exp 1 y Exp 2). El grupo más abundante de proteínas pertenece a la categoría proteólisis. En el panel inferior se detallan las proteínas que componen el grupo enriquecido de proteólisis según el análisis de Gene Ontology Clustering realizado con la herramienta DAVID. Las filas representan proteínas, las columnas son los grupos ontológicos que están enriquecidos dentro del cluster proteólisis. El color verde indica que la proteína en cuestión forma parte de uno de los grupos GO enriquecidos.

b) Análisis ontológico de las proteínas diferenciales en los extractos celulares mediante uso de la herramienta PANTHER. Se muestra un gráfico de torta con las diferentes categorías (listadas en la columna de la izquierda) a las que corresponden las 126 proteínas diferenciales de los extractos celulares (Exp.3). El grupo más abundante de proteínas pertenece a la categoría citoesqueleto.

Es llamativo el hecho de encontrar proteínas diferenciales correspondientes a compartimentos intracelulares en el secretoma. Muchas de estas proteínas no presentan péptido señal de secreción pero sin embargo, es común encontrarlas en el medio extracelular. Las vías no clásicas de secreción de proteínas describen formas de liberación de proteínas al medio extracelular que pueden explicar la aparición de estas proteínas sin tener que atribuirle su existencia a ruptura celular o muerte celular. Estos datos serán discutidos posteriormente en la Sección Discusión.

Por otra parte, el análisis de los extractos celulares mostró que el mayor porcentaje de proteínas que varían junto con SPARC son aquellas pertenecientes al citoesqueleto (**Figura 20 b**).

CAPITULO II: Validaciones técnicas y biológicas de las proteínas diferenciales seleccionadas

Criterio de selección de los resultados obtenidos por proteómica para su validación posterior

Existen tres tipos de validaciones a realizar con datos provenientes de técnicas de alto rendimiento o “*high throughput*” como la genómica o la proteómica: la validación técnica, es decir, aquella que busca corroborar las diferencias encontradas mediante la aplicación de otras técnicas cuantitativas, la validación biológica que intenta confirmar las relaciones moleculares encontradas, y la validación funcional, que intenta relacionar las proteínas encontradas con las funciones relevantes que llevan a cabo.

La elección de proteínas candidatas a ser validadas no es un tema menor en las técnicas de alto rendimiento dado que existen diferentes criterios de selección de proteínas/genes para su posterior validación. En algunos casos el criterio de selección se basa en los datos estadísticos de los resultados, por ejemplo, comenzar la validación de los candidatos que más aumenten o que más disminuyan su expresión en la muestra tratada, o comenzar validando aquellos que tengan el menor valor P del test estadístico que se haya aplicado en el análisis. Otros criterios de selección se basan en comenzar con aquellos candidatos diferenciales que sean más interesantes en términos biológicos o comenzar con aquellos candidatos que los estudios ontológicos postulen como mas enriquecidos respecto a alguna función celular.

En nuestro caso, la selección de los candidatos para validación se basó por un lado en los análisis ontológicos que demostraron que el grupo funcional que mas varía en el secretoma corresponde a las proteasas (las catepsinas particularmente). Por otro lado, la sobreexpresión de SPARC en la línea control se correlacionó con una sobreexpresión de proteínas que son sellos característicos de la Transición Epitelio- Mesenquimal (EMT) (Zeisberg and Neilson, 2009) como por ejemplo colágeno I, vimentina y N-caderina que junto con el grupo de proteasas sugieren fuertemente que SPARC está involucrada en la EMT.

Por esta razón, seleccionamos a N-caderina y catepsina B para un estudio en profundidad de su relación con la progresión tumoral en melanoma dado que a nuestro criterio eran los dos actores mas representativos en este proceso. El significado de esta selección resulta obvio teniendo en cuenta que ambas proteínas están fuertemente involucradas con la capacidad del tumor de invadir y diseminarse,

una consecuencia clave de la EMT (Kalluri and Weinberg, 2009) y probablemente responsable de la relación de SPARC con la progresión tumoral.

Validación técnica de las proteínas seleccionadas

La validación técnica de las proteínas seleccionadas catepsina B y N-caderina, además de otras proteínas protumorales como FAM3C, catepsina L, catepsina X, colágeno I y vimentina se realizó por técnicas de reconocimiento de proteínas basadas en la unión antígeno-anticuerpo como por ejemplo western blot, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y citometría de flujo. Los resultados que se presentan en la **Figura 21** aplicando la técnica de western blot, concuerdan con las diferencias de expresión observadas en los experimentos de proteómica validando así el *approach* o enfoque experimental elegido.

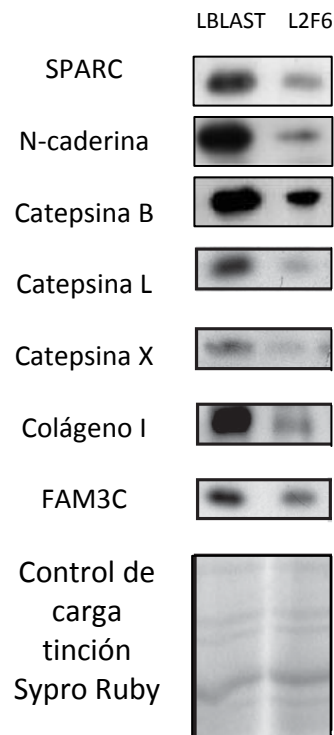


Figura 21. Validación técnica por western blot de las proteínas diferenciales seleccionadas en medios condicionados a partir de los resultados obtenidos por proteómica. Se observa una disminución de la expresión de SPARC junto con los niveles de las proteínas protumorales N-caderina, catepsina B, catepsina L, catepsina X, colágeno tipo I y FAM3C en los medios condicionados de L2F6 respecto a LBLAST. La imagen es representativa de al menos 3 réplicas biológicas independientes realizadas para cada proteína.

Otras metodologías como la inmunocitoquímica o la inmunohistoquímica, aplicadas para la validación técnica de las proteínas N-caderina y catepsina B serán descritas a continuación en el contexto del análisis de las formas moleculares expresadas diferencialmente de las mencionadas proteínas.

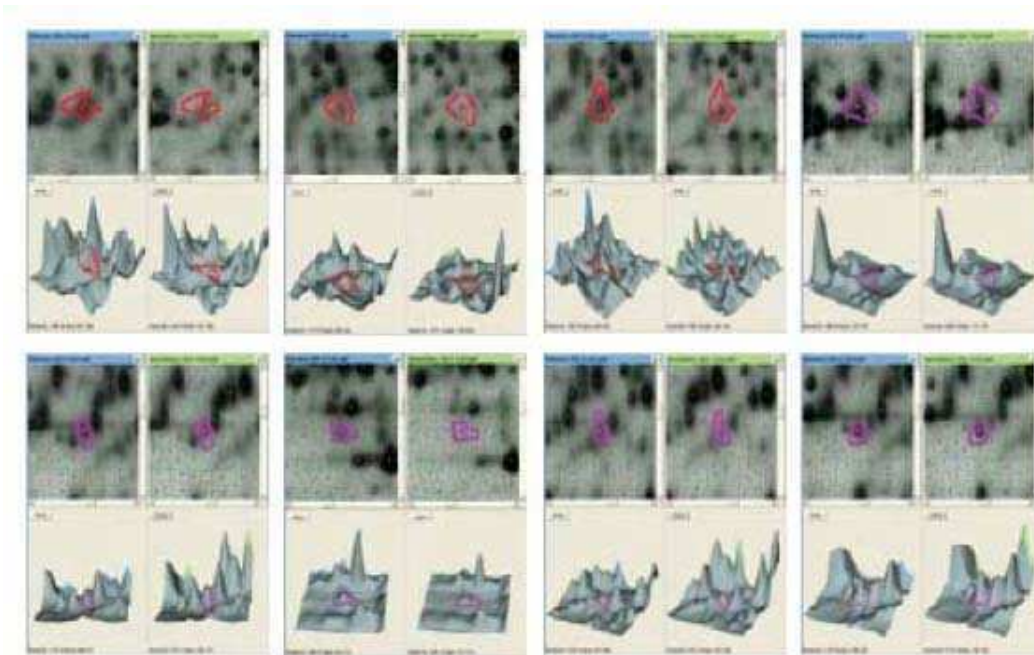
Análisis de las formas moleculares expresadas diferencialmente de catepsina B

Es importante correlacionar la biología de las proteínas catepsina B y N-caderina con los resultados obtenidos por proteómica y con los resultados obtenidos en las validaciones técnicas aplicando diferentes metodologías. Esto implica tener en cuenta las formas moleculares encontradas expresadas diferencialmente en medios condicionados o células.

Catepsina B es una cisteína-proteasa lisosomal, sintetizada en forma de pro-enzima denominada procatepsina B y es cotraduccionalmente glicosilada en el retículo endoplasmático rugoso. El carbohidrato es modificado y fosforilado en el Golgi generando un carbohidrato de reconocimiento para los receptores manosa 6-fosfato (MPRs) (Mort and Buttle, 1997). La vía de MPRs es el mecanismo principal para el tráfico intracelular de procatepsina B, una enzima inactiva de 46- 48 kDa dependiendo del grado de glicosilación. En células normales menos del 5% de la procatepsina B puede ser secretada y la procatepsina B remanente (aproximadamente un 95%) se envía a lisosomas a través de endosomas tardíos donde se disocia de los MPRs y es procesada a una forma activa de 31 kDa (Mach et al., 1992) y a una doble cadena consistente de una cadena pesada de 25 kDa y una cadena liviana de 5 kDa. Esto representa la vía clásica de maduración y activación de la pro-enzima a enzima activa. Como se discute posteriormente, la expresión de catepsina B aumenta considerablemente en tumores encontrándose en el medio extracelular tanto las formas maduras como las inmaduras.

En el medio condicionado de las líneas de melanoma correspondientes a nuestro modelo experimental, se encontraron mediante el análisis proteómico por metodología DIGE 8 spots expresados diferencialmente que correspondían, de acuerdo a la identificación por espectrometría de masas, a la proteína procatepsina B (ver Anexo I). Las imágenes de los 8 spots en el gel bidimensional junto con el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína que indica que se trata de procatepsina B se muestran en la **Figura 22**. Allí están indicados los péptidos que fueron utilizados para la identificación por huella peptídica junto el péptido que corresponde a la procatepsina B y que está ausente en la proteína madura. Estos resultados obtenidos por espectrometría de masas junto con los resultados obtenidos por western blot (**Figura 21**) donde se observa una banda que corresponde a aproximadamente 48 kDa de peso molecular cuando se compara con un marcador, confirmaron que la proteína diferencial en el medio condicionado es la procatepsina B. Asimismo, la posición en los geles bidimensionales de los spots expresados diferencialmente en el medio condicionado, corresponden a un peso molecular estimado de 48 kDa.

SPOTS correspondientes a la expresión diferencial de PROCATEPSINA B



PORCENTAJE DE COBERTURA POR HUELLA PEPTÍDICA del spot 1151 correspondiente a la PROCATEPSINA B

1 MWQLWASLCC LLVLANARSR PSFHPVSDDEL VNYVVKRNTT WQAGHNFYNV
 51 DMSYLKRLCG TFLGGPKPPQ RVMFTEDLKL PASFDAREQW PQCPTIKEIR
 101 DQGS CGSCWA FGAVEAISDR ICIHTNAHVS VEVS AEDLLT CCGSMCGDGC
 151 NGGYPAEAWN FWTRKGLVSG GLYESHVGCR PYSIPPCEHH VNGSRPPCTG
 201 EGDTPKSKI CEPGYSPTYK QDKHYGNSY SVSNSEKDIM AEIYKNGPVE
 251 GAFSVYSDFL LYKSGVYQHV TGEMMGGHAI RILGWGVENG TPYWLVANSW
 301 NTDWGDNGFF KILRGQDHCG IESEVVAGIP RTDQYWEKI

Figura 22. Secuencia aminoacídica de la proteína identificada en el medio condicionado de las líneas de melanoma LBLAST y L2F6. La procatepsina B es una proteína de 339 aminoácidos mientras que la forma madura posee 195 aminoácidos. En la secuencia de la procatepsina B se encuentra contenida e indicada en azul la secuencia de la catepsina B madura. Nuestra identificación por MASCOT se basa en los dos péptidos indicados en rojo, estando el primero de ellos contenido solamente en la secuencia de la procatepsina B, este péptido fue además fragmentado lo cual brinda información de secuencia coherente con la identificación.

Por otro lado, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica sobre cortes de tumores de LBLAST y L2F6 generados en ratones nude, luego de 24 hs de inyección de las células. Este ensayo mostró que también existían menores niveles de expresión de catepsina B en el citoplasma de las células con bajos niveles de expresión de SPARC, las L2F6. **(Figura 23 A)**. El anticuerpo que se utilizó para el reconocimiento de la expresión de catepsina B en tejidos es policlonal y reconoce tanto las formas

maduras como las inmaduras de la proteína, por lo que no podíamos asegurar que sea la procatepsina B la que también se encontraba diferencial dentro de la célula. Es por eso que realizamos un análisis por western blot en extractos celulares para evaluar las formas intracelulares de la proteína y observamos que la forma madura y activa de 30 kDa de peso molecular es la que se encuentra disminuida en el interior de la célula como lo muestra la **Figura 23 B**.

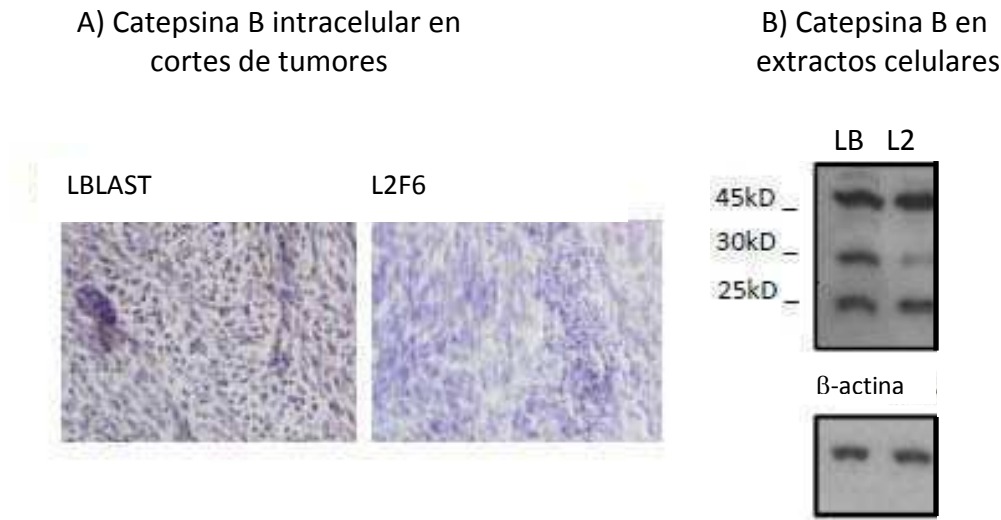


Figura 23. Niveles de expresión de las diferentes isoformas de catepsina B en células. A) Inmunohistoquímica sobre cortes de tumores embebidos en parafina de células LBLAST y L2F6 obtenidos luego de 24 hs de inyección subcutánea de las células en ratones *nude*. Se observa que cuando disminuye la expresión de SPARC en L2F6, disminuye la expresión de catepsina B. B) Extractos celulares de las líneas de melanoma LBLAST y L2F6 (LB y L2, respectivamente). Se observa que la forma madura de catepsina B de 30 kDa está disminuída en L2F6 mientras que la procatepsina B (48 kDa) y la catepsina B madura de 25 kDa tienen niveles similares de expresión en ambas líneas celulares. El control de carga fue realizado mediante western blot de β -actina. La imagen es representativa de al menos 3 réplicas biológicas estudiadas.

Nuestros resultados indicarían que la forma molecular inmadura de 48 kDa de catepsina B se secreta diferencialmente al medio extracelular (discutido mas adelante). A menos que se indique lo contrario, se hará referencia en esta tesis a catepsina B haciendo alusión a la forma de 48 kDa que fue encontrada expresada en forma diferencial en el medio condicionado.

Análisis de las formas moleculares expresadas diferencialmente de N-caderina

N-caderina es una glicoproteína transmembranal de 130 kDa que actúa en uniones homotípicas célula-célula. Se ha demostrado que además presenta una forma soluble de 90 kDa que surge del clivaje del dominio extracelular de la proteína mediado por la proteína ADAM-10 (Paradies and Grunwald, 1993; Reiss et al., 2005). Se ha probado que este fragmento soluble presenta actividad

biológica propia como la de disminuir la inestabilidad de la placa aterosclerótica o promover la angiogénesis (Derycke et al., 2006; Lyon et al., 2009). En nuestros estudios de validación técnica presentados anteriormente, se observa que es este fragmento de 90 kDa el que resulta diferencial entre LBLAST y L2F6 por western blot (**Figura 21**). Por otro lado, en el gel bidimensional se observa un fragmento de un peso molecular estimado de 20 kDa que probablemente deriva de la degradación proteolítica que puede ocurrir ya sea naturalmente o durante la preparación de la muestra. Es importante tener en cuenta que los geles bidimensionales utilizados en nuestros experimentos comprenden el rango de peso molecular de 12 a 120 kDa pero logran resolver correctamente el rango de de 15 kDa a 70 kDa aproximadamente, por lo que es esperable que el fragmento de 90 kDa no se vea diferencial.

La validación técnica de N-caderina comprendió además un estudio de sus niveles de expresión a nivel de la membrana plasmática mediante western blot, citometría de flujo e inmunocitoquímica (**Figura 24**). Nuestros resultados demuestran que la disminución en los niveles de secreción del fragmento soluble de N-caderina cuando las células son deficientes en SPARC, se correlaciona con un menor nivel de expresión de la proteína de membrana de 130 kDa. Las consecuencias funcionales de esta disminución serán presentadas en la Capítulo IIIb de esta tesis.

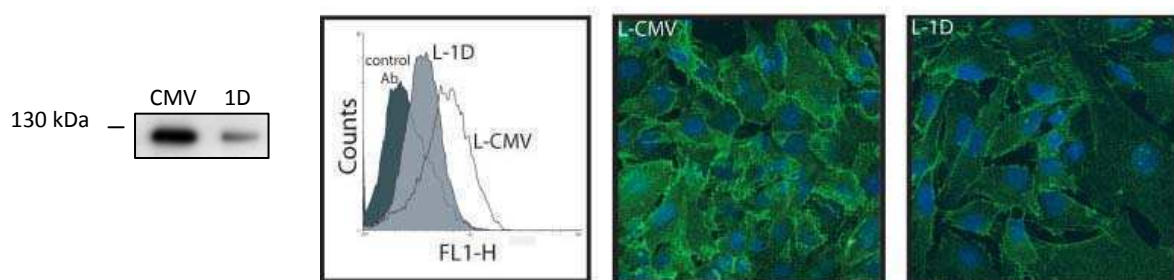


Figura 24. Expresión de N-caderina en la membrana en el modelo de células de melanoma con expresión regulada de SPARC mediante plásmido con secuencia antisentido. El ensayo por western blot realizado sobre extractos celulares presentado a la izquierda, muestra que la proteína N-caderina de 130 kDa (proteína de membrana) se encuentra disminuida en la línea 1D donde SPARC se encuentra también disminuida, en comparación con la línea control CMV quien expresa altos niveles de ambas proteínas. La imagen es representativa de al menos 3 réplicas biológicas estudiadas. Los resultados se corroboraron por citometría de flujo (centro) y por inmunocitoquímica (izquierda).

Validación biológica de catepsina B

Los resultados presentados en las **Figuras 21, 22, 23 y 24** demuestran que se confirmó la disminución de la expresión de las formas inmadura de catepsina B en el medio condicionado y de la forma madura intracelular en extractos de células en la línea de melanoma L2F6, donde SPARC se encuentra también disminuida mediante un ARN de interferencia.

Con estos resultados quisimos corroborar que efectivamente SPARC regula los niveles de expresión de catepsina B, por lo que reestablecimos los niveles de SPARC en la línea celular L2F6 mediante el agregado exógeno de 1µg/ml de la proteína durante 24 hs y posteriormente colectamos el medio condicionado donde evaluamos los niveles de secreción de catepsina B (48 kDa) mediante Western blot (**Figura 25**). La selección de la concentración de 1µg/ml de SPARC exógena se basó en estudios previos del laboratorio donde se observaba que esa concentración generaba una reversión en el comportamiento celular como migración e invasión en otros tipos celulares (López Haber et al., 2007).

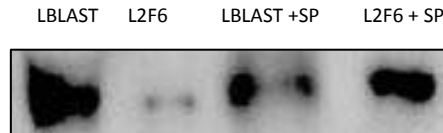


Figura 25. SPARC regula la secreción de catepsina B (48 kDa). La restitución de los niveles exógenos de SPARC (1µg/ml) en la línea L2F6 con niveles disminuidos de SPARC, restituye a su vez la secreción de catepsina B.

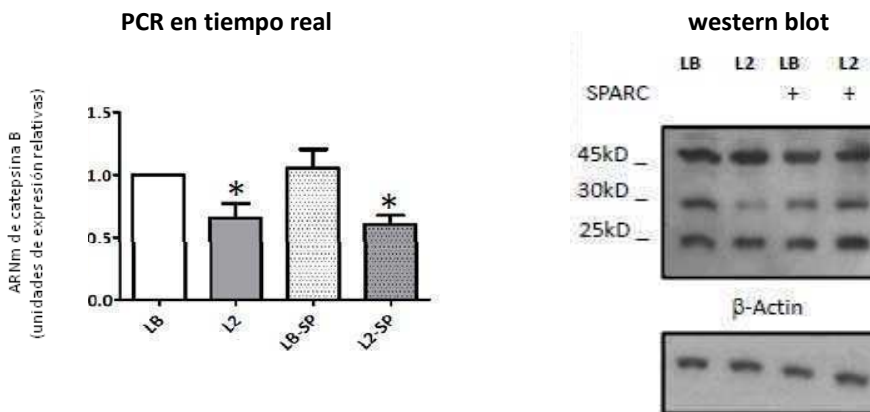


Figura 26. PCR en tiempo real y western blot de extractos celulares de LBLAST y L2F6 (LB y L2, respectivamente), en presencia o ausencia de SPARC. A) SPARC exógena (SP) no induce la transcripción del gen de catepsina B de acuerdo a los resultados obtenidos por PCR en tiempo real.

*P<0.05 (Student T-test) respecto a LBLAST (LB).

Los resultados presentados provienen de 3 muestras biológicas independientes.

B) Se observa que el nivel de la proteína madura de 30 kDa que se encuentra disminuido en L2F6, es restituido luego de la incubación en presencia de SPARC (SP) mientras que los niveles intracelulares de procatepsina B son similares en las dos líneas celulares en presencia o ausencia de SPARC.

La imagen representa el resultado obtenido en 3 extractos celulares independientes.

Del mismo modo, observamos que la adición exógena de SPARC a los cultivos de L2F6 durante 24 hs, restituyó los niveles endógenos de la isoforma madura de 30 kDa de catepsina B aunque no alteró los niveles de procatepsina B endógena ni la forma madura de 25 kDa (**Figura 26**). Cuando se evaluó por PCR en tiempo real si había un aumento de la transcripción del ARNm de catepsina B en las células L2F6 como consecuencia de la incubación con SPARC se observó que esto no ocurría, lo cual nos hizo

hipotetizar que SPARC alteraría las vías de secreción al medio extracelular de la proteína en lugar de inducir la transcripción del gen.

Posteriormente quisimos evaluar si la diferencia observada en la expresión de catepsina B en las líneas celulares LBLAST y L2F6 las cuales derivan de la línea de melanoma MEL-LES se encontraban también en otra línea de melanoma que sobreexpresa SPARC. Para esto, estudiamos la línea celular de melanoma A375 la cual expresa altos niveles de la proteína. Esta línea fue modificada genéticamente en nuestro laboratorio mediante infección de las células con un vector lentiviral con un ARN de interferencia contra SPARC de expresión inducible o un control sin inserto. De esta manera se obtuvieron la línea control AE y el clon celular A3 con 80% de disminución del mensajero de SPARC evaluado por PCR en tiempo real. Se comparó posteriormente el nivel de SPARC en los medios condicionados de la línea de melanoma wild type (A375), la línea transfectada con el vector lentiviral vacío (AE) y la línea transfectada con el vector con el micro RNA contra SPARC (A3) y se corroboró que la disminución del transcripto se correlacionaba con una disminución de aproximadamente el 80% de la secreción de la proteína.

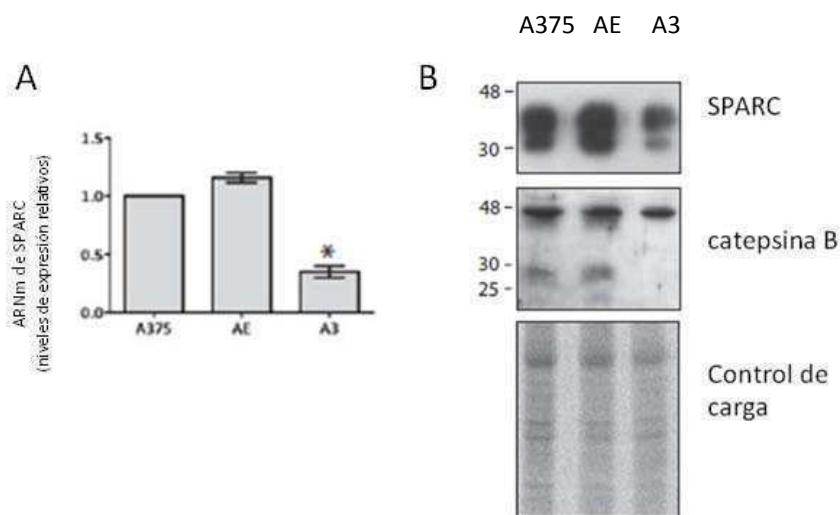


Figura 27. Diferencias en los niveles de expresión de catepsina B en la línea de melanoma A375. A) PCR en tiempo real de los niveles del ARNm de SPARC. La línea de melanoma modificada genéticamente mediante el uso de un vector lentiviral (A3) presenta menores niveles de ARNm de SPARC que las líneas control (AE) y wild type (A375). B) El nivel de secreción de catepsina B madura disminuye junto con la secreción de SPARC en la línea A3, respecto de AE y A375. (SPARC en estas líneas presenta dos isoformas en el medio condicionado).

Los resultados provienen del análisis de al menos 3 muestras biológicas independientes.

* $P < 0.05$ (Student T-test) A3 respecto a AE.

Sorpresivamente, se observó en el medio condicionado de las línea derivada de A375 que junto con la disminución de la expresión de SPARC había una disminución en el nivel de catepsina B madura de 30 kDa y 25 kDa, mientras que no se observan diferencias en los niveles de procatepsina B, la proteína que se encuentra diferencial en las líneas LBLAST y L2F6. Cabe destacar que en LBLAST y L2F6 no se

detectó catepsina B madura en el medio condicionado. Los resultados se muestran en la página anterior en la **Figura 27**.

Volviendo a las líneas LBLAST y L2F6 quisimos corroborar que los menores niveles de secreción de la catepsina B en L2F6, la línea con bajo nivel de expresión de SPARC, se correlacionen además con una menor actividad enzimática en medio condicionado. Para esto realizamos un ensayo de actividad enzimática específico utilizando un sustrato fluorogénico y midiendo los niveles de producto fluorescente (Linebaugh et al., 1999) en el medio condicionado de 3 réplicas biológicas independientes de las líneas LBLAST y L2F6. Los resultados se muestran en la **Figura 28** a continuación:

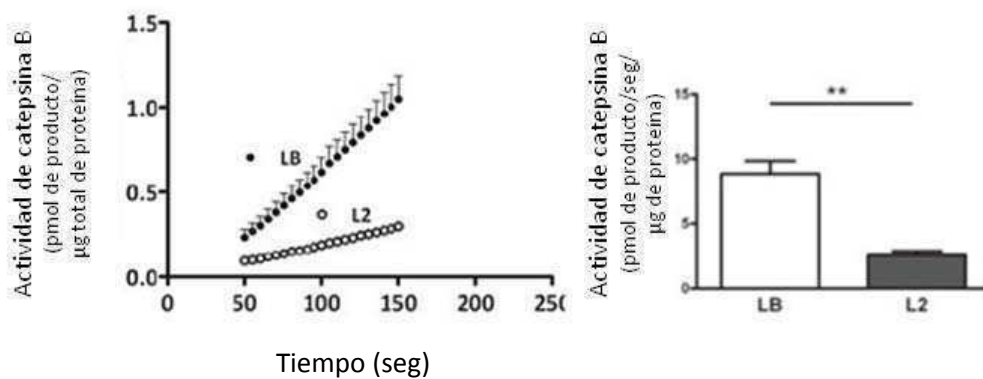


Figura 28. Ensayo enzimático de actividad de catepsina B en medios condicionados de LBLAST y L2F6. La procatepsina B fue activada en medio ácido y en presencia de pepsina. Posteriormente fue agregado el sustrato fluorogénico y se observó en tiempo real la menor aparición de producto fluorescente en el medio condicionado concentrado de L2F6.

** $P < 0,01$ (Student T-test) L2F6 (L2) respecto a LBLAST (LB).

El análisis estadístico demuestra que las diferencias son significativas en 3 réplicas biológicas independientes.

Si bien el sustrato empleado en el ensayo de actividad es específico de catepsina B quisimos corroborar que la diferencia en la actividad enzimática observada fuera debida exclusivamente a catepsina B dado que existen otras proteínas diferenciales en el medio condicionado como catepsina L o catepsina X/Y/Z. Es por esto que el mismo ensayo de medición de actividad enzimática fue llevado a cabo en presencia de un inhibidor específico sintético de catepsina B, el CA-074 (Murata et al., 1991; Towatari et al., 1991). Observamos que en presencia de este inhibidor, no hay actividad enzimática medible en la línea LBLAST con altos niveles de catepsina B extracelular como puede observarse en la **Figura 29**.

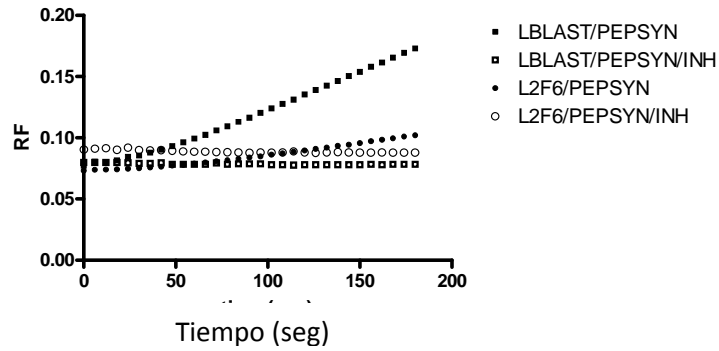


Figura 29. Análisis de actividad enzimática de catepsina en medios condicionados de las líneas de melanoma LBLAST y L2F6 en presencia o ausencia de un inhibidor específico de catepsina B. En el gráfico se observa en el eje Y los valores de unidades relativas de fluorescencia (RF) y en el eje X, el tiempo expresado en segundos. Corroboramos que la actividad enzimática, medida como aparición de producto fluorescente, es diferencial debido a catepsina B y no a otra enzima diferencial presente en el medio. PEPSYN= tratamiento con pepsina . INH= inhibidor específico CA-074.

De esta manera confirmamos que SPARC regula en la líneas de melanoma LBLAST, L2F6, AE y A3 la expresión de catepsina B, la cual disminuye cuando la expresión de SPARC así lo hace. Esta menor expresión y secreción de la proteína se correlaciona con una menor actividad enzimática.

Validación biológica de N-caderina

De la misma manera, quisimos corroborar que SPARC efectivamente regule la expresión de N-caderina en melanoma por lo que reestablecimos la expresión endógena de SPARC mediante transducción de la línea celular 1D (con 80% de disminución de la expresión de SPARC) con un vector adenoviral conteniendo la secuencia sentido de SPARC, que permitió la reexpresión de SPARC en forma transiente a las 72 hs post-infección. A partir de ese momento, colectamos el medio condicionado en las 24 hs posteriores y evaluamos allí los niveles de N-caderina (90 kDa). Los resultados se muestran en la **Figura 30**.

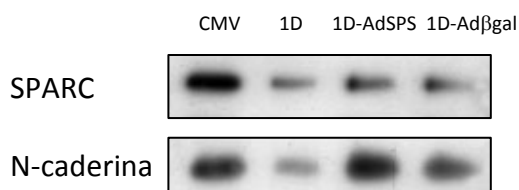


Figura 30. SPARC regula la secreción de N-caderina (90 kDa). La restitución de los niveles endógenos de SPARC en la línea 1D con niveles disminuidos de SPARC, restituye a su vez la secreción de N-caderina.

1D-AdSPS = clon celular 1D transducido con vector adenoviral portando la secuencia sentido de SPARC

1D-Adβgal = clon celular 1D transducido con vector adenoviral portando la secuencia de la β-galactosidasa.

Vemos que el nivel de secreción del fragmento soluble de 90 kDa de N-caderina aumentó en la línea 1D con niveles restituidos de SPARC, lo cual confirma que la regulación de N-caderina está bajo el control de SPARC.

Anteriormente mencionamos que N-caderina es una proteína transmembranal en donde ejerce su función en la adhesión celular manteniendo uniones homotípicas, es decir, con otras células que también expresen N-caderina. En el caso de las células de melanoma comentamos en la introducción de esta tesis que la expresión de N-caderina de membrana le da la posibilidad a las células de melanoma de interactuar con células endoteliales o fibroblastos, favoreciendo la migración de las células tumorales.

Es por esto que luego de la obtención los resultados en medios condicionados que muestran una diferencia de expresión en el fragmento soluble de 90 kDa de N-caderina entre las líneas CMV y 1D y sabiendo por inmunocitoquímica, western blot y citometría de flujo (**Figura 24**) que la disminución de la expresión del fragmento soluble se correlaciona con una disminución la expresión de la proteína de membrana, quisimos corroborar que efectivamente sea SPARC quien regule además del fragmento soluble, a la N-caderina de membrana de 130 kDa. Para esto, analizamos por citometría de flujo la expresión de N-caderina de membrana en las células LBLAST y las L2F6 en ausencia o presencia de 24 hs de incubación con SPARC exógena (1µg/ml). Los resultados se presentan en la **Figura 31**.

Los resultados demostraron que la línea con menos expresión de SPARC, L2F6, presenta bajos niveles de N-caderina de membrana en comparación con la línea control LBLAST quien expresa altos niveles de la proteína, tal como se había visto anteriormente en otra línea de melanoma tratada con otra herramienta de regulación de la expresión de SPARC. Sin embargo, luego de 24 hs de incubación de las células L2F6 con 1µg/ml de SPARC en el medio de cultivo, se restituyó la expresión de N-caderina de membrana de 130 kDa. Esto confirma que SPARC regula la expresión de esta proteína.

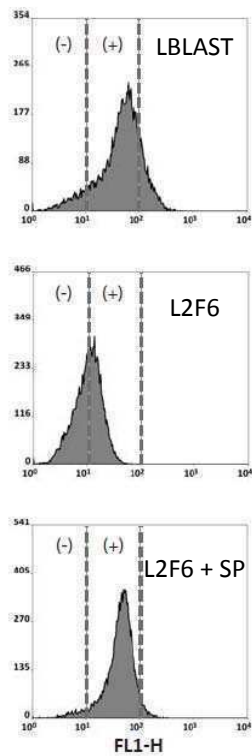


Figura 31. Citometría de flujo de las líneas celulares LBLAST y L2F6 en presencia o ausencia de SPARC exógena (SP). Se observa que la línea celular L2F6 presenta bajos niveles de expresión de N-caderina de membrana mientras que la línea control presenta altos niveles de expresión. Luego de 24 hs de incubación con SPARC exógena los niveles de N-caderina en L2F6 se hacen comparables a los de LBLAST.

(-) indica los valores entre los cuales se considera negativa la expresión respecto al control con anticuerpo inespecífico.

(+) indica los valores entre los cuales se considera positiva la expresión

CAPITULO IIIa: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas. Análisis del rol de catepsina B en la progresión tumoral mediada por SPARC.

Como se presentara anteriormente en Capítulos I y II, la catepsina B fue validada técnica y biológicamente quedando confirmada la regulación de la expresión mediada por SPARC. Luego de la obtención de estos datos, nos planteamos estudiar cuales eran las consecuencias funcionales para las células de melanoma que presentan un aumento de la expresión de catepsina B. Esta proteína es una cisteína proteasa que ha sido descrita en la literatura como un marcador de mal pronóstico en cáncer, presentándose sobreexpresada en una amplia variedad de tumores entre ellos melanoma, glioma, colon, mama, próstata, vejiga, ovario y pulmón.

Hasta el momento, un solo trabajo demostró muy recientemente que SPARC regula la expresión de catepsina B en un modelo de neuroblastoma (Bhoopathi et al., 2010) en el cual las células que expresan SPARC sufren autofagia y formación de cuerpos apoptóticos con un concomitante incremento de la expresión de catepsina B. Sin embargo, en nuestro modelo la expresión de SPARC promueve la progresión tumoral y nuestro objetivo fue determinar de que manera catepsina B contribuye a este proceso al estar sobreexpresada junto con SPARC en melanoma.

Para esto, utilizamos un ensayo funcional de invasión en Matrigel. El Matrigel es el nombre comercial de una mezcla de proteínas de membrana basal obtenidas del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) en ratones (Kleinman and Martin, 2005; Orkin et al., 1977), la cual a temperatura ambiente gelifica formando lo que se conoce como membrana basal reconstituida. El Matrigel es una mezcla compleja aunque está enriquecida en proteínas de la membrana basal como colágeno IV, laminina y entactina. Un análisis proteómico reciente reveló además que se encuentran mas de 1800 proteínas diferentes (Hughes et al., 2010) siendo las más abundantes las mencionadas anteriormente. Estas proteínas también son las que también forman parte de la membrana basal que subyace a los epitelios, por lo que para ensayos *in vitro* representa una opción idónea a la hora de investigar los mecanismos de invasión de las células tumorales, un paso clave en la cascada metastásica.

El ensayo de invasión en Matrigel consistió en evaluar la capacidad invasiva de las células de melanoma LBLAST y L2F6, cada una de ellas presentando alto y bajo nivel de catepsina B extracelular respectivamente. Si bien las células presentan otras proteasas que también contribuyen a la degradación de la matriz extracelular, quisimos evaluar el aporte de catepsina B al ser esta proteína la que se encuentra regulada diferencialmente por SPARC. Es por esto, que los ensayos de invasión se realizaron en presencia y ausencia de un inhibidor específico de catepsina B de manera de poder atribuirle los efectos a esta proteína.

Experimentalmente, el ensayo consistió en resuspender a las células en medio de cultivo sin suero en el pocillo superior de una cámara de Boyden modificada mientras que en el pocillo inferior se encontraba el quimioattractante constituido por 10% de FBS en medio de cultivo. Entre medio del pocillo superior e inferior, colocamos una membrana de nitrocelulosa con poros de 8µm de diámetro los cuales se encontraban completamente ocluidos por Matrigel, de manera tal que para poder pasar de un pocillo a otro atravesando la membrana, las células debían previamente degradar la matriz extracelular interpuesta entre los pocillos (**Figura 32 B**).

Como vemos en las **Figuras 32 A y C**, la línea celular de melanoma LBLAST que expresa altos niveles de SPARC y secreta altos niveles de catepsina B, presentó un mayor número de células que invaden a través del Matrigel en comparación con la línea L2F6 con bajo nivel de SPARC y bajo nivel de catepsina B extracelular. Esto evidenció que las dos líneas presentaban diferencias en su comportamiento invasivo que podía ser atribuible a su expresión diferencial de proteasas. Para evaluar el rol de catepsina B en esta invasividad diferencial, el ensayo se hizo en presencia de CA-074, un inhibidor específico de la catepsina B (Murata et al., 1991; Towatari et al., 1991). Los resultados demostraron que el nivel de invasión de la línea LBLAST disminuyó al menos un 50%, indicando que la catepsina B cumple un rol fundamental a la hora de degradar matriz extracelular para favorecer la invasión.

Con el objeto de confirmar si este comportamiento diferencial era regulado por SPARC, se realizaron experimentos que apuntaron a restituir los niveles de expresión de la proteína en las células que presentan una baja expresión y por otro lado a bloquear el efecto de la expresión de SPARC mediante el uso de anticuerpos neutralizantes. Para esto, se preincubaron las células con anticuerpos bloqueantes de la función biológica de SPARC y posteriormente fueron crecidas en presencia o ausencia de SPARC en el medio de cultivo mediante el agregado exógeno de la proteína en concentración 1 µg/ml, en ambas líneas celulares durante 24 hs. Finalmente, fue evaluado el nivel de invasión. La concentración de SPARC seleccionada surge de estudios previos en el laboratorio donde se observó que SPARC revertía el comportamiento celular en esa concentración (López Haber et al., 2007). De la misma forma, la concentración de anticuerpos bloqueantes de SPARC utilizados surge de estudios previos realizados con los mismos (Sweetwyne et al., 2004)

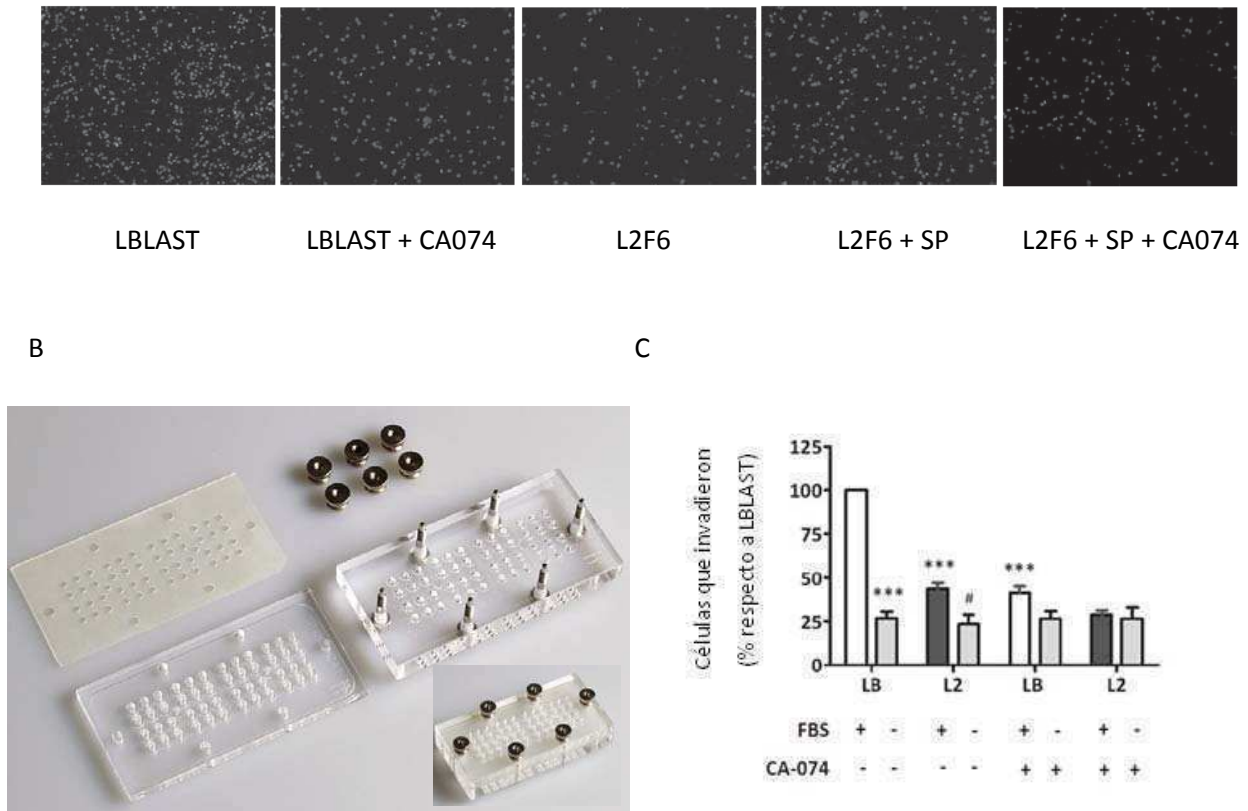


Figura 32. Ensayo de Invasión en Matrigel por células de melanoma LBLAST y L2F6. A) Luego de invadir el Matrigel y atravesar el poro, las células quedan adheridas al lado opuesto de la membrana. Los núcleos son teñidos y cuantificados por microscopía. Se muestran fotos representativas de las condiciones evaluadas. B) Cámara de Boyden modificada donde se llevaron a cabo los experimentos de invasión. C) Niveles de invasión de las células de melanoma. Se confirma que la diferencia en los niveles de invasión entre LBLAST y L2F6 es estadísticamente significativa como así también lo es la inhibición con un inhibidor específico de catepsina B, el CA-074. Como control se muestra que la ausencia de FBS como quimioattractante no promueve la invasión. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

*** p<0.001 respecto a LBLAST

p<0.05 respecto a L2F6

En la **Figura 33 A**, observamos que se revierte el bajo nivel de invasividad de la línea L2F6 mediante la restitución de los niveles exógenos de SPARC, presentando niveles similares a la línea control LBLAST. Cuando este ensayo se realizó en presencia de CA-074, se observó que nuevamente se obtenían bajos niveles de invasión lo cual confirma que SPARC modula la invasividad celular a través de la regulación de la secreción de catepsina B. Asimismo, evaluamos si la reversión de la expresión endógena de la proteína generaba el mismo efecto en la reversión del nivel de invasividad de las células. Para esto, ambas líneas celulares fueron transducidas con un adenovector que porta la secuencia del gen de SPARC y luego de 72 hs se observó que el nivel de SPARC en el medio condicionado de L2F6 era similar al de LBLAST por lo que a ese tiempo se realizó en el ensayo de invasión. Los resultados

presentados en la **figura 33 B**, demuestran que la reversión de la expresión endógena también aumenta el nivel de invasividad de la línea celular L2F6.

Nuevamente, cuando este ensayo se realizó en presencia de CA-074, se observó que se inhibían los niveles de invasión lo cual confirma que SPARC modula la invasividad celular a través de la regulación de la secreción de catepsina B.

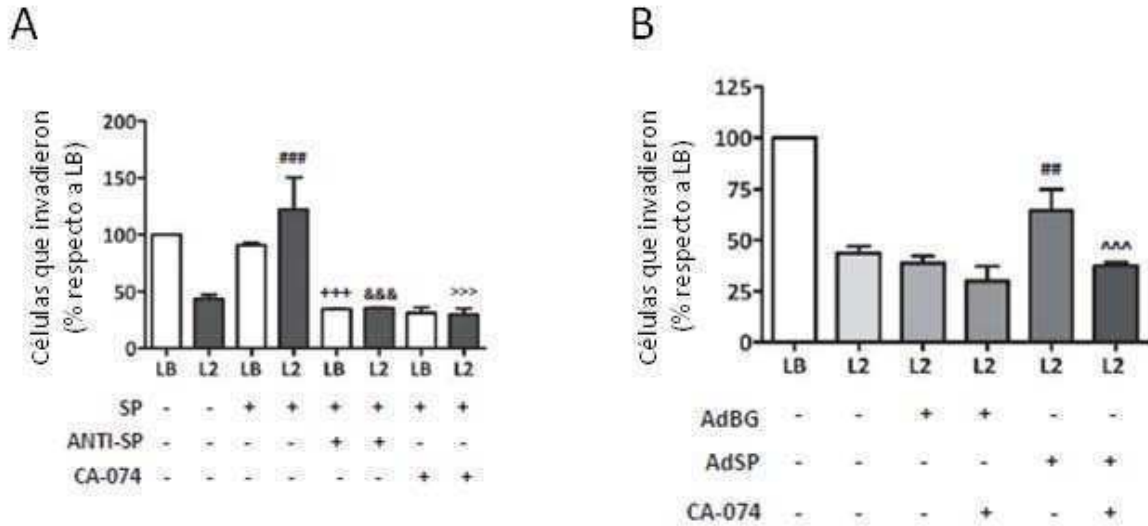


Figura 33. Ensayo de Invasión en Matrigel por células de melanoma LBLAST y L2F6 con niveles restituidos de la expresión de SPARC A) Luego de cultivar las células durante 24 hs con anticuerpos bloqueantes de la función biológica de SPARC o el anticuerpo control, y posterior crecimiento de las células en presencia o ausencia de SPARC exógena 1µg/ml, se evaluó el nivel de invasividad. Se observó que disminuyó en más de un 50% el número de células LBLAST que invadieron por acción del anticuerpo bloqueante de SPARC. Además, se vió que se revertía en L2F6 el nivel de invasividad por el agregado exógeno de la proteína lo cual era inhibido por anticuerpos bloquantes de SPARC. Además, el ensayo llevado a cabo en presencia del inhibidor específico de catepsina B volvió a disminuir la invasividad confirmando que SPARC modula los niveles de secreción de la proteína. B) Del mismo modo, la restitución de la expresión endógena de SPARC mediante transducción adenoviral aumentó la invasividad en L2F6 cuando se comparó con el control (L2F6+AdBG). Nuevamente, el CA-074 revirtió este efecto. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

p<0.01 respecto a L2F6

p<0.05 respecto a L2F6

^^^ p<0.001 respecto a L2-AdSP

&&& p<0.001 respecto a L2-SP

>>> p<0.001 respecto a L2-SP

Con los resultados obtenidos quedaba claro el rol de SPARC en el control de la secreción de catepsina B y la concomitante invasividad de las células en un ensayo *in vitro*. Dado que los resultados fueron obtenidos únicamente mediante el estudio de las líneas LBLAST y L2F6 que, a su vez, derivan de la línea parental IIB-MEL-LES, quisimos estudiar si los resultados eran reproducibles en otra línea de melanoma con alta expresión de SPARC. Decidimos entonces analizar el comportamiento de la línea

A375 dado que también expresa altos niveles de la proteína. Como ya se mencionó anteriormente, esta línea fue manipulada en nuestro laboratorio mediante transducción con un vector lentiviral dando como producto el clon celular A3, con un 60% de disminución de la expresión de SPARC respecto a la línea control AE, evaluado por western blot de medios condicionados. En dichos medios condicionados analizamos por western blot los niveles de secreción de catepsina B y encontramos que estaban disminuidos en A3, la línea con bajos niveles de SPARC (**Figura 27**). Con estos resultados quisimos ver si esta disminución de la secreción de catepsina B se correlacionaba con un menor nivel de invasividad por lo que realizamos un ensayo de invasión en Matrigel en presencia y ausencia del inhibidor específico CA-074. Observamos que efectivamente los menores niveles de catepsina B correlacionan con menor nivel de invasión en el clon A3. Asimismo, la invasión es dependiente de catepsina B dado que en la línea control AE se inhibe la alta invasividad en presencia del inhibidor CA-074. Los resultados se muestran a continuación en la **Figura 34**.

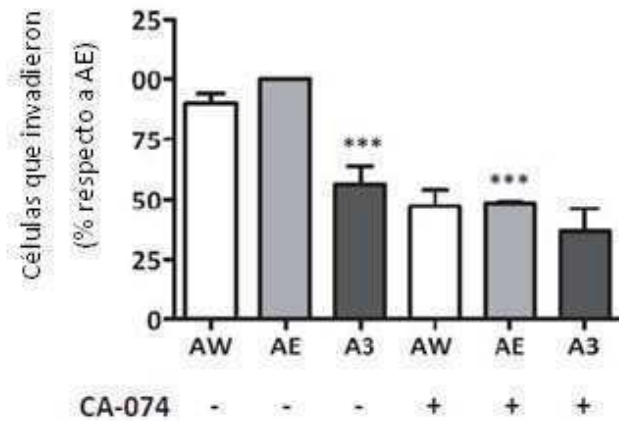


Figura 34. La disminución de la expresión de catepsina B en el clon celular con baja expresión de SPARC (A3) se correlacionó con un menor nivel de invasión en Matrigel. Nuevamente el nivel de invasión fue dependiente de catepsina B ya que la presencia de un inhibidor específico de la proteína (CA-074 +) disminuyó la invasividad en las líneas *wild-type* y control (AW y AE). Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

*** $p < 0.001$ respecto a AE

Estos resultados confirman en otra línea de melanoma que la disminución de la expresión de SPARC correlaciona con una menor secreción de catepsina B y esto a su vez con un menor nivel de invasión.

Rol del colágeno tipo I en la regulación de la secreción de catepsina B

Como fuera detallado en la introducción de esta tesis, la interacción de las células con componentes de la matriz extracelular (ECM) juega un rol importante en regular la expresión de proteasas degradadoras de matriz. Luego de la obtención de los resultados presentados anteriormente, tuvimos en cuenta la información que demostraba que el contacto de células de melanoma altamente invasivas con colágeno tipo I induce la secreción de catepsina B madura al medio extracelular (Klose et al., 2006). Asimismo, Koblinski y colaboradores demostraron que la interacción de fibroblastos humanos de mama con colágeno tipo I incrementa la secreción de procatepsina B (Koblinski et al., 2002), lo cual se encuentra en línea con nuestros resultados. Por otro lado, se ha demostrado la unión de SPARC a colágeno tipo I (Brekken and Sage, 2000), además de que se demostró que SPARC regula la expresión y deposición del colágeno I en células mesangiales (Francki et al., 1999).

En congruencia con la información presente en la literatura, nuestro análisis proteómico del secretoma reveló que 3 spots diferenciales (1764, 1532 y 1592) en el secretoma, que fueron identificados por espectrometría de masas como cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I (ver ANEXO I), se encontraban disminuidos en su expresión en el clon celular L2F6 con bajos niveles de SPARC. Esta diferencia en los niveles de expresión fue corroborada por Western blot (ver **Figura 21**), confirmando que efectivamente cuando baja la expresión de SPARC baja también la expresión de la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I.

Con esta información quisimos chequear si el control de la secreción de la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I era mediado por SPARC a nivel transcripcional, por lo que evaluamos por PCR en tiempo real el nivel de ARNm en las líneas LBLAST y L2F6 en presencia o ausencia de SPARC exógena durante 24 hs en concentración 1 μ g/ml. Los resultados indican que el clon celular L2F6 presenta menor nivel de ARNm de la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I en comparación con LBLAST, y el agregado exógeno de SPARC revierte esos niveles haciéndolos comparables al control (**Figura 35 A**). Estos resultados confirmaron en nuestro modelo que SPARC regula los niveles de colágeno tipo I a nivel transcripcional.

Nos propusimos ver entonces si el colágeno tipo I en nuestro modelo podía ser el mediador de la secreción de catepsina B inducida por SPARC. Para evaluar esto, decidimos plaquear durante 24 hs a las células LBLAST y L2F6 (con bajos niveles de SPARC, colágeno tipo I y catepsina B extracelular), sobre placas que contenían una cobertura de colágeno tipo I monomérico adherida al plástico. Posteriormente, las células fueron levantadas de las placas y puestas a invadir en un ensayo de invasión en Matrigel.

Los resultados demuestran que el plaqueo de las células sobre colágeno tipo I restituyó completamente en las células L2F6 la capacidad invasiva haciéndola comparable a la de la línea

control LBLAST (**Figura 35 B**). Esta capacidad invasiva restituida en L2F6 fue acompañada de un aumento de la secreción de catepsina B al medio condicionado tal como se observa en la **Figura 35 C**. Al igual que lo observado con el agregado exógeno de SPARC, la restitución de la capacidad invasiva debida al cultivo de las células sobre placas cubiertas de colágeno I monomérico, fue completamente inhibida cuando el ensayo se realizó en presencia del inhibidor específico CA-074, lo cual evidencia que el efecto del colágeno tipo I sobre la invasión de células de melanoma es mediado por catepsina B (**Figura 35 B**). Los niveles de catepsina B y la invasividad de las células LBLAST, por otro lado, no fueron afectados por el cultivo sobre placas cubiertas de colágeno tipo I, sugiriendo que LBLAST, que secreta altos niveles de SPARC, es refractaria a la estimulación con colágeno tipo I.

La morfología celular observada al microscopio diferencia claramente a las células LBLAST y L2F6, presentando las primeras una morfología de tipo fibroblastoide, característica de células malignas siendo las células ahusadas y estiradas, mientras que las células L2F6 con baja expresión de SPARC presentan una formato más epitelial, siendo las células mas cortas y redondeadas. Esta morfología cambió luego de 24 hs de cultivo en placas con cobertura de colágeno como puede observarse en la **Figura 35 D**. Las células L2F6 presentaron una morfología ahusada similar a la de LBLAST, mientras que la morfología de LBLAST no cambió. Este cambio en L2F6 a una morfología maligna mediado por colágeno, se acompaña de un mayor nivel de invasividad tal como se observa en la **figura 35 B**.

Con el objeto de corroborar la especificidad del efecto de colágeno tipo I sobre la invasividad de células L2F6, decidimos plaqurear las células durante 24hs sobre placas con cobertura de fibronectina (5µg/ml), otra proteína mayoritaria de la matriz extracelular. Este tratamiento no afectó el potencial invasivo de las células L2F6, confirmando la especificidad del efecto observado con colágeno tipo I (**Figura 35 B**).

Finalmente, no observamos un efecto aditivo en la capacidad invasiva de L2F6 cuando las células fueron cultivadas 24 hs en placas con cobertura de colágeno y además en presencia de 1µg/ml de SPARC exógena, lo cual sugeriría que estas proteínas convergen en una vía de señalización común que está siendo estimulada al máximo por colágeno tipo I. (**Figura 35 B**).

De los resultados obtenidos en los experimentos antes mencionados, quedaba claro que la expresión y secreción al medio extracelular de colágeno tipo I estaba siendo regulada por SPARC y que el colágeno tipo I a su vez estaba actuando como molécula reguladora/intermediaria de la secreción de catepsina B. Es por eso que con esta información empezamos a preguntarnos de qué modo colágeno I señala estos cambios.

Las integrinas son una gran familia de receptores de la superficie celular que se unen a componentes de la ECM, organizan el citoesqueleto y activan vías de señalización intracelular (Guo and Giancotti, 2004). El colágeno tipo I interacciona principalmente con los receptores de integrinas $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$ (Gullberg et al., 1992). Dado que la interacción de colágeno tipo I con el receptor $\alpha2\beta1$ había sido

previamente demostrada como promotora de la secreción de catepsina B (Klose et al., 2006; Koblinski et al., 2002), decidimos estudiar si las integrinas $\alpha 2\beta 1$ podían estar mediando los efectos de SPARC y colágeno I sobre los niveles secretados de catepsina B y la invasividad de las células de melanoma.

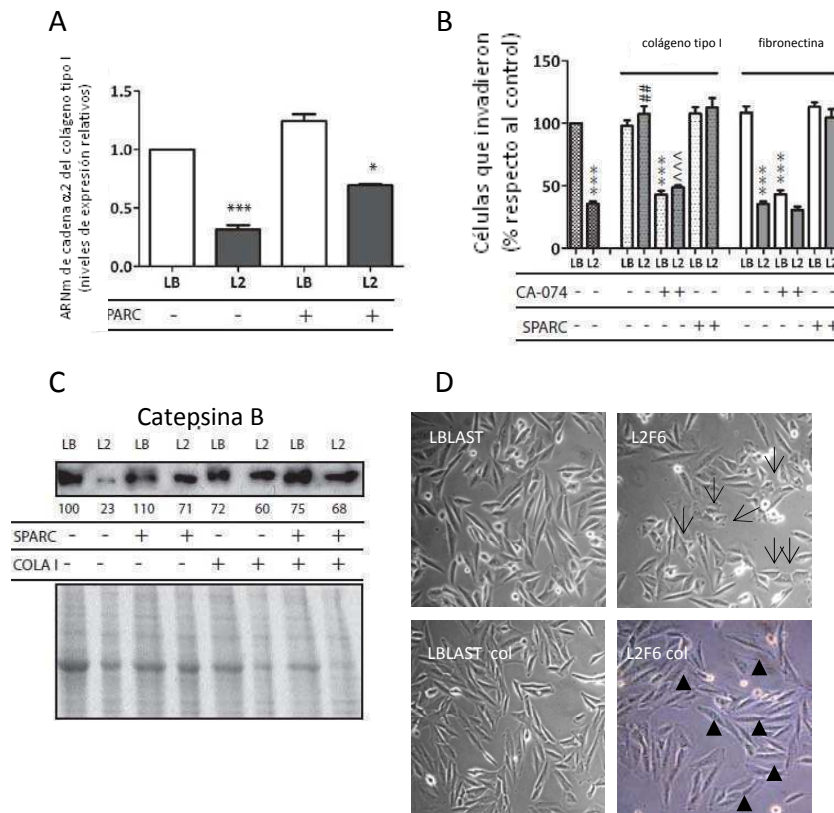


Figura 35. Efecto del plaqueo celular sobre colágeno tipo I en la secreción de catepsina B y la invasividad celular. A) PCR en tiempo real donde se observa que los niveles de ARNm de la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I son menores en L2F6 y esto es reversible por el agregado de SPARC exógena. B) El plaqueo de las células L2F6 sobre colágeno tipo I revierte la capacidad invasiva a expensas de catepsina B debido a que es un efecto inhibible por el inhibidor CA-074. El efecto observado es específico de colágeno tipo I dado que fibronectina no genera ningún efecto sobre la invasión. El agregado exógeno de SPARC no presentó un efecto aditivo sobre la reversión de la invasión mediada por colágeno tipo I. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

* $p < 0,05$ respecto a LBLAST

*** $p < 0.001$ respecto a LBLAST (en plástico, colágeno tipo I o fibronectina, según corresponda)

$p < 0.01$ respecto a L2F6

^^^ $p < 0.001$ respecto a L2F6-SPARC

C) El plaqueo de las células sobre colágeno o el agregado exógeno de SPARC en L2F6 aumentan la secreción de catepsina B al medio extracelular sin observarse un efecto aditivo. Los números representan la intensidad relativa de las bandas respecto a la cantidad cuantificada por densitometría para la muestra LBLAST (que se considero 100). D) La morfología celular de L2F6, normalmente epitelioides, cambia a un fenotipo maligno cuando las células son cultivadas sobre colágeno tipo I durante 24 hs. Se observa una morfología similar a la de LBLAST, de tipo fibroblastoide ahusado. Las flechas indican las células de apariencia epitelioides y las puntas de flecha indican las de apariencia fibroblastoide.

Para esto, comenzamos realizando experimentos con anticuerpos bloqueantes de la función biológica de las cadenas $\alpha 2$ y $\beta 1$ del receptor $\alpha 2\beta 1$. Los anticuerpos, agregados en forma independiente o conjunta, fueron adicionados al cultivo de manera de preincubar a las células durante 24 hs en cultivo en placas con o sin cobertura de colágeno. Luego, fue evaluada la capacidad invasiva mediante ensayos de invasión en Matrigel.

En el primer grupo de experimentos, la capacidad invasiva de LBLAST fue inhibida en aproximadamente un 50% debido a la preincubación con anticuerpos neutralizantes de integrinas, ya sea $\alpha 2$, $\beta 1$ o la combinación de ambos $\alpha 2\beta 1$. Por otro lado, la restitución de la capacidad invasiva de L2F6 mediada por el agregado exógeno de SPARC observada anteriormente (**Figura 33 A**) o por el crecimiento de las células en placas con colágeno (**Figura 35 B**), fue también inhibida por la presencia de los anticuerpos neutralizantes de integrinas, ya sea $\alpha 2$, $\beta 1$ o la combinación de ambos $\alpha 2\beta 1$. Los anticuerpos no generaron ningún efecto sobre las células L2F6 en ausencia de estimulación mediada por SPARC y colágeno. De los resultados obtenidos, es aparente que el agregado del inhibidor específico CA-074, durante el ensayo de invasión no indujo a una inhibición de la capacidad invasiva mayor que la generada por los anticuerpos neutralizantes de integrinas. Esto indicaría que el efecto de promoción de la invasión dependiente de catepsina B estaría explicado prácticamente en su totalidad por la vía de señalización de integrinas $\alpha 2\beta 1$.

Los resultados se grafican a continuación en la **Figura 36**:

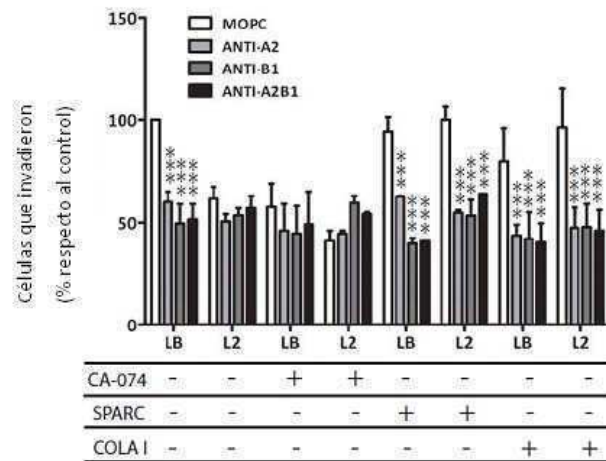


Figura 36. Análisis de la capacidad invasiva en presencia de colágeno tipo I, SPARC y anticuerpos bloqueantes de integrinas. Las células LBLAST y L2F6 (LB y L2, respectivamente) fueron preincubadas por 24 hs con anticuerpos bloqueantes anti- $\alpha 2$ y/o anti- $\beta 1$ integrina o MOPC (control de isotipo IgG), en presencia o ausencia de SPARC $1\mu\text{g/ml}$ o sobre placas con y sin cobertura de colágeno tipo I. Luego del tratamiento, se evaluó la capacidad invasiva en presencia o ausencia del inhibidor de catepsina B, CA-074. Se observó que la inhibición de la señalización vía integrinas impide que la capacidad invasiva de L2F6 aumente en presencia de SPARC o de colágeno tipo I.

Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

*** $p < 0.001$ respecto al control MOPC correspondiente a cada línea.

Rol del TGF β en la regulación de la secreción de catepsina B

La señalización celular mediada por TGF β 1 regula diferentes aspectos de la iniciación del tumor, la progresión y la metástasis de una manera dependiente del tipo celular y del contexto en el cual se exprese (Bierie and Moses, 2006). En particular, TGF β 1 es un importante efector de la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) (Heldin et al., 2009). Como se comentara en la introducción de esta tesis, una retroalimentación positiva se ha demostrado para la relación SPARC y TGF- β 1, dado que SPARC induce la expresión de TGF- β 1 y viceversa (Bassuk et al., 2000b; Ford et al., 1993; Francki et al., 1999; Francki et al., 2004a; Pavasant et al., 2003; Reed et al., 1994; Schieman et al., 2003b; Shiba et al., 2001; Wrana et al., 1991). Es por esto que decidimos investigar si SPARC podía estar ejerciendo alguno de sus efectos proinvasivos relacionados con la EMT a través de TGF β 1.

Para esto, primero chequeamos en nuestro modelo de melanoma si los niveles de TGF β 1 estaban modificados por SPARC. Los análisis por PCR en tiempo real demostraron una disminución pequeña en los niveles de ARNm de TGF β 1 en el clon celular L2F6 comparado con el control LBLAST. Observamos además que el tratamiento con SPARC exógena durante 24 hs incrementó los niveles del ARNm de TGF β 1 tanto en la línea celular LBLAST como en el clon celular L2F6, sugiriendo que SPARC regula a nivel transcripcional la expresión de TGF β 1 en melanoma humano (**Figura 37**).

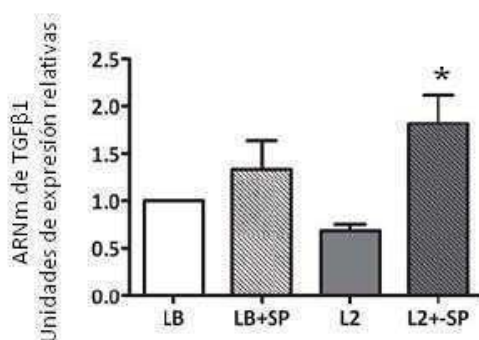


Figura 37. Análisis de los niveles de ARNm de TGF β 1 por PCR en tiempo real. Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de 1 μ g/ml de SPARC exógena durante 24 hs y posteriormente se evaluó el nivel de ARNm de TGF β 1. El análisis estadístico de un juego de datos de 3 réplicas independientes fue realizado por ANOVA. * p<0.05 respecto a L2F6.

Además de estos datos, contábamos con la evidencia publicada por Reisenauer y colaboradores quienes demostraron que luego de incubar diferentes líneas tumorales mieloides con TGF β 1 exógeno, se observaba un aumento de la expresión de catepsina B acompañada de un aumento de la capacidad invasiva (Reisenauer et al., 2007).

Teniendo en cuenta esta información nos preguntamos si el TGF β 1 endógeno, es decir el expresado por las células, converge en la vía de señalización SPARC/ colágeno tipo I/ catepsina B que observamos y demostramos anteriormente como moduladora de la invasividad celular.

Para contestar esta pregunta realizamos una serie de ensayos de invasión en Matrigel utilizando anticuerpos bloqueantes de TGFβ1, de manera de bloquear la actividad biológica del TGFβ1 endógeno expresado y secretado por las células o alternativamente, un inhibidor específico, el SB431542, que bloquea la capacidad de TGFβ1 de unirse a su receptor de tipo I (Inman et al., 2002). Observamos que la actividad neutralizante del anticuerpo anti-TGFβ1 inhibió no sólo la capacidad invasiva de LBLAST en un poco mas de un 40% sino también la capacidad invasiva reestablecida en las células L2F6 luego de la incubación con SPARC exógena (**Figura 38 A**). Llamativamente, el anticuerpo bloqueante de TGFβ1 fue incapaz de inhibir la capacidad restituida de las células L2F6 de invadir luego de la incubación sobre placas con cobertura de colágeno tipo I indicando que el estímulo del plaqueo sobre colágeno I saltea el efecto del TGFβ1.

De la misma forma, el inhibidor del receptor de tipo I del TGFβ1, el SB431542, inhibió parcialmente la capacidad invasiva de las células LBLAST y redujo además la capacidad reestablecida de las células deficientes en SPARC (las L2F6) de invadir luego de la incubación por 24 hs con SPARC (**Figura 38 B**). También en este caso el inhibidor no fue capaz de inhibir la invasividad inducida por colágeno tipo I, indicando que la vía de señalización mediada por colágeno estaría aguas abajo de la de TGFβ1.

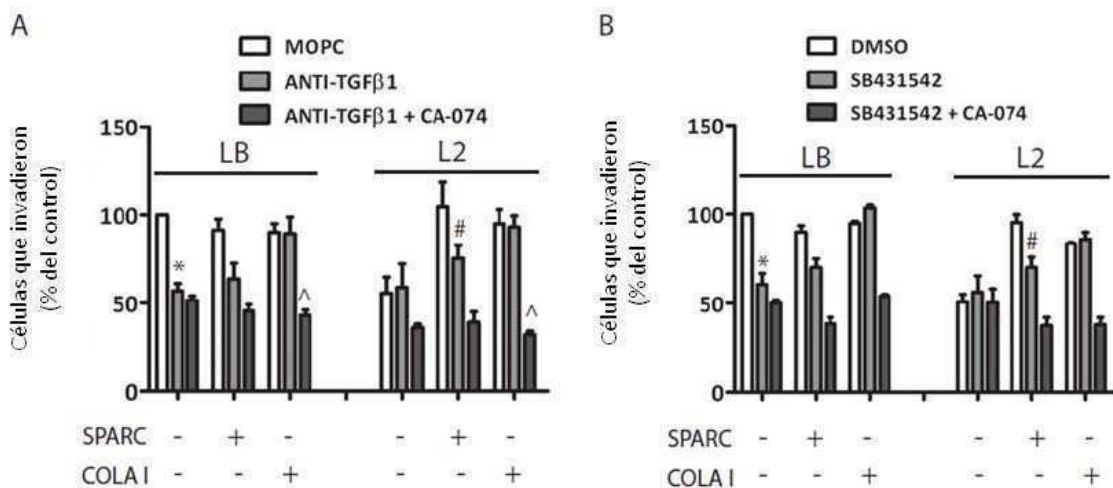


Figura 38. Análisis de la capacidad invasiva de células de melanoma en presencia de colágeno tipo I, SPARC y anticuerpos bloqueantes de TGFβ1 o de un inhibidor del receptor de TGFβ1. A) Las células fueron preincubadas con el control de isotipo MOPC o anticuerpo neutralizante anti TGFβ1 y posteriormente cultivadas en presencia o ausencia de SPARC exógena o placas con cobertura de colágeno. Posteriormente se evaluó la capacidad invasiva en presencia o ausencia de CA-074. B) Las células LBLAST y L2F6 fueron preincubadas o no con el inhibidor SB431542 que bloquea la unión de TGFβ1 a los receptores de tipo I o alternativamente con DMSO como control. Luego, se evaluó la capacidad invasiva en presencia o ausencia de CA-074. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

* p<0.05 respecto a LBLAST

p<0.05 respecto a L2F6-SPARC

^ p<0.05 respecto a la línea correspondiente plaqueada sobre colágeno tipo I.

Los resultados vistos, tomados en conjunto, sugieren que el efecto de inhibición tanto del anticuerpo anti TGFβ1 como del inhibidor del receptor de TGFβ1 no es completo, y que por tanto el TGFβ1 es sólo parcialmente responsable de la inducción de la invasión dependiente de catepsina B estimulada por SPARC. En otras palabras, existiría una parte del efecto de SPARC sobre invasión que sería independiente de TGFβ1 (**Fig 38 A y B**). Llamativamente, cuando se agrega TGFβ1 exógenamente a las células deficientes en SPARC (L2F6), se observa que las mismas aumentan su capacidad invasiva dependiente de catepsina B a niveles comparables con los de la línea control LBLAST (**Figura 39 A**).

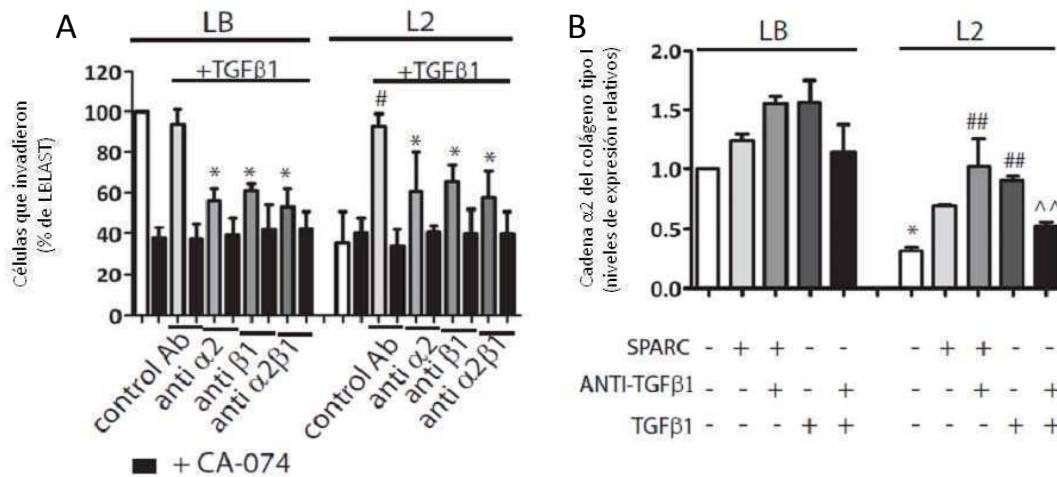


Figura 39. Análisis de la capacidad invasiva de células de melanoma en presencia de TGFβ1 y anticuerpos bloqueantes de integrinas y análisis de los niveles de ARNm de cadena α2 del colágeno tipo I inducidos por SPARC o TGFβ1 exógenos.

A) El efecto de la adición del TGFβ1 exógeno sobre la invasividad celular fue evaluado en células preincubadas con anticuerpos anti integrinas o MOPC como control de isotipo y cultivadas en presencia o ausencia de la proteína recombinante TGFβ1 (0,1ng/μl). Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos. *p<0.05 respecto al correspondiente control MOPC.

B) Análisis de los niveles de ARNm por PCR en tiempo real de la cadena α2 del colágeno tipo I en células de melanoma preincubadas o no con anticuerpo anti-TGFβ1 o MOPC como control de isotipo y cultivadas 24 horas en presencia o ausencia de TGFβ1 recombinante (0,1ng/μl) o SPARC humana (1μg/ml).

Todas las barras representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes y la estadística resultante mediante ANOVA de 1 factor.

* p<0.05 respecto a LBLAST
 ## p<0.01 respecto a L2F6
 ^^ p<0.01 respecto a L2F6+TGFβ1

Seguidamente, nos preguntamos si este efecto del TGFβ1 agregado al medio de cultivo (exógeno) se debía a la estimulación, aguas abajo, de la vía de inducción de colágeno. Para testear esta posibilidad en primer lugar chequeamos si el tratamiento con TGFβ1 modificaba los niveles de transcripción de colágeno I, y comprobamos que efectivamente la incubación de las células L2F6 con TGFβ1

aumentaba los niveles de la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I (**Figura 39 B**) y que dicho aumento era inhibible por un anticuerpo neutralizante de TGF β 1. Sin embargo, es llamativo que este efecto parece ser privativo de la estimulación de TGF β 1 agregado en el medio de cultivo y no del expresado por la propia célula, ya que el anticuerpo anti- TGF β 1 no es capaz de bloquear el aumento de colágeno I inducido bajo estímulo con SPARC (**Figura 39 B**).

En segunda instancia, decidimos inhibir la señalización vía colágeno I mediante el uso de anticuerpos anti integrinas $\alpha 2$ y/o $\beta 1$ en las células tratadas con TGF β 1. Estos anticuerpos lograron inhibir significativamente (aunque no totalmente) la invasión inducida por TGF β 1 en células L2F6 deficientes en SPARC (**Figura 39 A**). De esta manera, dedujimos que efectivamente el agregado de TGF β 1 al medio de cultivo aumenta la invasividad de células de melanoma en forma dependiente del eje colágeno I-catepsina B.

Estos resultados serían en principio coherentes con la posibilidad de que TGF β 1 esté ejerciendo este efecto a través de la regulación positiva de la expresión de SPARC, como está descrito en la literatura. Para testear esta posibilidad, decidimos evaluar los niveles de SPARC en respuesta a la estimulación exógena con TGF β 1. Lo hicimos mediante PCR en tiempo real y mediante western blotting, y los resultados se muestran en la (**Figura 40 A y B**). La PCR en tiempo real (**Figura 40 A**) indica que el TGF β 1 es capaz de inducir la expresión de SPARC en las células LBLAST y L2F6, aunque en esta última línea celular la presencia del ARN de interferencia contra SPARC enmascararía el aumento en los niveles del transcrito de SPARC. El efecto inductivo de TGF β 1 sobre la expresión de SPARC se observa mejor en el western blot de medios condicionados de las células de melanoma crecidas en presencia del agregado exógeno de la proteína durante 24 hs, donde queda en evidencia el aumento de SPARC concomitante con el tratamiento con TGF β 1 (**Figura 40 B**). Estos resultados refuerzan la idea de que un estímulo exógeno de TGF β 1 estaría promoviendo la invasión mediada por catepsina B a través de la inducción del eje SPARC-colágeno I-catepsina B.

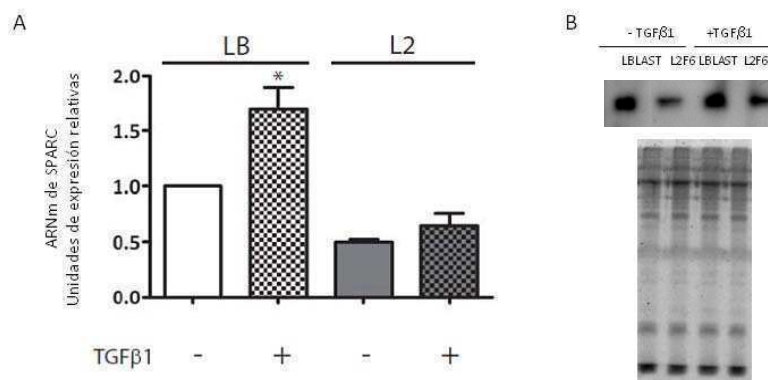


Figura 40. PCR en tiempo real y Western blot de SPARC en líneas celulares de melanoma luego del agregado exógeno de TGF β 1. A) El agregado exógeno de TGF β 1 0,5 ng/ml durante 24 hs al medio de cultivo de las células de melanoma LBLAST y L2F6 evidencia que en ambos casos existe una inducción del transcrito de SPARC, aunque en la línea L2F6 se ve como una

tendencia que no logra ser estadísticamente significativa, probablemente debido al efecto de ARN de interferencia contra SPARC. B) Western blot de SPARC en medios condicionados de las células tratadas con TGFβ1 durante 24 hs 0,5 ng/ml, se observa un aumento de la secreción de SPARC en la línea L2F6.

* p<0,05 (Student T-test) LBLAST + TGFβ1 respecto a LBLAST - TGFβ1

Sin embargo, los resultados de la inhibición parcial obtenida con anticuerpos anti-integrina (**Figura 39 A**) sugieren que también podría haber un efecto de TGFβ1 sobre la invasión que fuera independiente de la vía de colágeno I inducida por SPARC. Para dirimir esta cuestión, decidimos probar si el efecto proinvasivo del TGFβ1 exógeno era inhibible por anticuerpos anti-SPARC. En la **Figura 41** se muestran los resultados de los experimentos de invasión en donde se evalúa el efecto de SPARC o TGFβ1 exógeno en presencia de una combinación de anticuerpos anti-SPARC. Los resultados indican que los anticuerpos anti-SPARC inhiben por completo el efecto proinvasivo no sólo de SPARC sino también de TGFβ1 exógeno, lo cual sigue apoyando la teoría de que TGFβ1 estaría actuando sobre la invasión a través de la inducción del eje SPARC-colágeno I-catepsina B.

Es llamativo, sin embargo, que al comparar estos resultados con los de la **Figura 39 A** vemos que el efecto de los anticuerpos anti-integrinas sobre el estímulo del TGFβ1 exógeno contradicen en cierta manera la idea de que todo el efecto de TGFβ1 se lleve a cabo vía señalización mediada por colágeno. Quedaría pendiente definir si la inducción de SPARC mediada por TGFβ1 efectivamente puede estar actuando sobre la invasión dependiente de catepsina B, en una pequeña proporción, sin pasar por el eje colágeno I-integrinas.

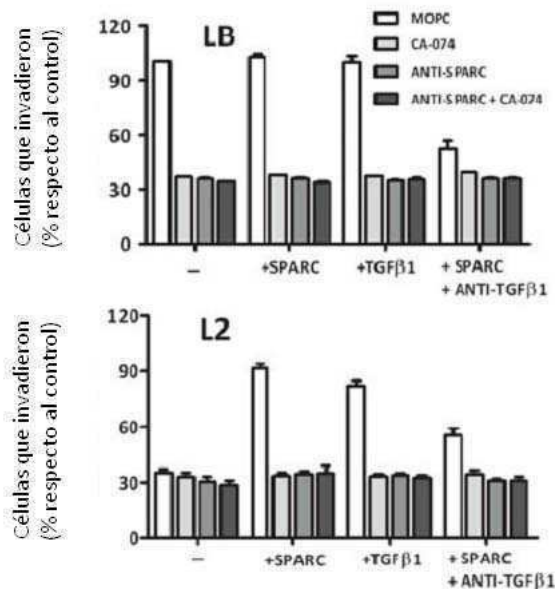


Figura 41. Análisis de la capacidad invasiva de células de melanoma en presencia de TGFβ1 o SPARC y anticuerpos bloqueantes de SPARC o de TGFβ1. Se observa que los anticuerpos bloqueantes de SPARC inhiben la invasión inducida por SPARC o por TGFβ1 a los mismos niveles que el agregado del inhibidor específico de catepsina B indicando que SPARC controla por completo la invasión dependiente de catepsina B. Por otro lado, la reversión de la invasión inducida por TGFβ1,

se bloquea por completo por acción de los anticuerpos bloqueantes de SPARC indicando que el efecto de esta proteína sería dependiente en su totalidad de SPARC.

También es interesante observar que cuando se comparan los efectos del anticuerpo neutralizante anti- TGFβ1 y de los anticuerpos bloqueantes de SPARC sobre las células LBLAST y L2F6 estimuladas con SPARC agregada al medio, se observa claramente, una vez más, que una pequeña parte del efecto proinvasivo de SPARC parece ser independiente de TGFβ1 secretado por las propias células tumorales **(Figura 41)**.

Los resultados evidencian la complejidad de la regulación mediada por SPARC y TGFβ1 sobre la invasión dependiente de catepsina B en células de melanoma. Es por eso que la **Figura 42** intenta representar esquemáticamente las moléculas involucradas en la regulación de la invasión dependiente de catepsina B y las figuras presentadas en esta tesis que sustentan esta representación.

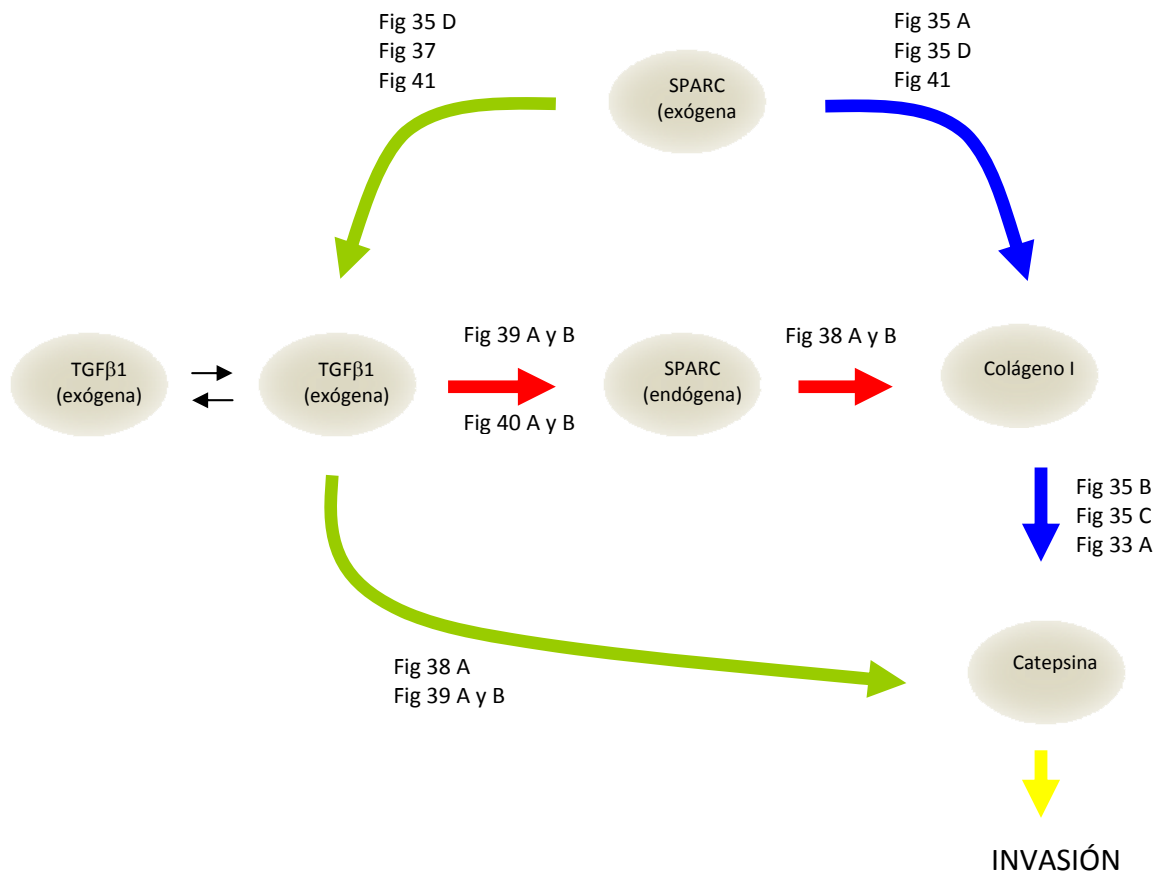


Figura 42. Secuencia de la regulación molecular de la invasión celular dependiente de catepsina B en células de melanoma. La figura indica las vías por las cuales SPARC y TGFβ1 (exógenos o endógenos) actúan regulando la invasión dependiente de catepsina B (ver texto).

CAPITULO IIIb: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas. Análisis del rol de N-caderina en la progresión tumoral mediada por SPARC.

El rol de N-caderina en la progresión tumoral ha sido ampliamente reportado en la literatura científica demostrando particularmente en melanoma que es una proteína de fundamental importancia para favorecer la liberación de los melanocitos transformados de su entorno celular y permitirles establecer nuevas conexiones intercelulares que favorezcan la diseminación a sitios distantes del tumor primario.

Nuestros resultados obtenidos en las validaciones técnica y biológica de N-caderina indicaban que la regulación de la expresión de la proteína en nuestro modelo de estudio estaba bajo el control de SPARC, dado que cuando disminuye la expresión de SPARC disminuye también la expresión de N-caderina y que cuando se restituyen los niveles de SPARC al cultivo, aumentan los de N-caderina de membrana de 130 kDa y el fragmento de secreción de 90 kDa (**Figura 21**).

Como fuera planteado en la introducción de esta tesis, uno de los sellos característicos de la progresión del melanoma es el switch de caderinas, que involucra la disminución de la expresión de E-caderina en los melanocitos transformados y el aumento de la expresión de N-caderina (Li and Herlyn, 2000). Nos propusimos ver si en nuestro modelo este switch estaba presente dado que los resultados obtenidos por proteómica demostraban que N-caderina presenta una disminución en la expresión cuando baja la expresión de SPARC en la línea L2F6, mientras que Robert y colaboradores habían demostrado que SPARC inducía una disminución de la expresión de E-caderina (Robert et al., 2006a). Es por eso que realizamos un estudio de la expresión de E-caderina en nuestro modelo de melanoma por citometría de flujo de células cultivadas en presencia o ausencia de SPARC por 24hs.

Los resultados presentados en la **Figura 43** muestran que efectivamente el switch de caderinas estaría bajo el control de SPARC dado que las células LBLAST expresan altos niveles de SPARC y N-caderina y bajos niveles de E-caderina y cuando en L2F6 baja la expresión de SPARC, baja la expresión de N-caderina y aumenta la de E-caderina, lo cual concuerda con un fenotipo no tumoral *in vivo*. Además, el agregado exógeno de SPARC al clon celular L2F6 con baja expresión de SPARC revierte la expresión

de caderinas promoviendo un incremento de la expresión de N-caderina en L2F6 y una disminución de la expresión de E-caderina.

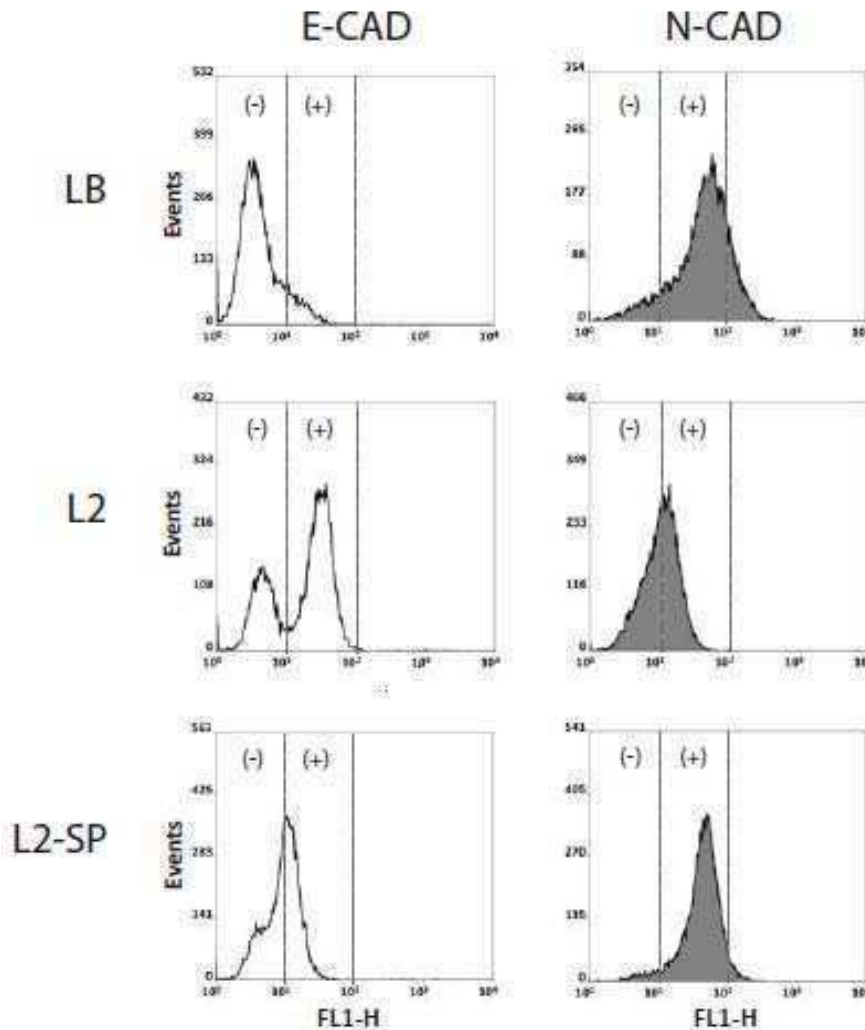


Figura 43. Análisis del perfil de expresión de caderinas de membrana en las células LBLAST y L2F6 por citometría de flujo luego de ser cultivadas en presencia o ausencia de 1µg/ml de SPARC humana. Las poblaciones celulares expresando altos (+) o bajos niveles (-) de expresión de las proteínas se encuentran indicados. Los paneles indicados con (-) corresponden a niveles de marcaje similares a los obtenidos con un anticuerpo primario control.

Con estos resultados quisimos validar funcionalmente el rol de N-caderina en nuestro modelo de melanoma. Comenzamos estudiando si la expresión diferencial de la N-caderina tenía consecuencias en la formación de esferoides. Los esferoides son una red tridimensional de células que forman las células tumorales cuando son cultivadas bajo ciertas condiciones *in vitro* donde las células establecen uniones célula-célula y célula-matriz. Su composición puede ser homogénea o heterogénea dependiendo de los tipos celulares que componen al esferoide. Un esferoide, aún el constituido por un solo tipo celular, consiste en grupos heterogéneos de células quiescentes, proliferantes y

necróticas representando un modelo tridimensional *in vitro* muy aceptado para el estudio de la biología de células malignas (Acker et al., 1987; Carlsson and Acker, 1988).

En nuestros estudios, el armado de los esferoides fue constituido únicamente por las células de melanoma LBLAST o L2F6 o las mismas preincubadas con un anticuerpo neutralizante (ACAM) de la función biológica de N-caderina. Las células fueron plaqueadas en igual número de células para ambos tipos y se siguió el crecimiento del esferoide durante 5 días. Los resultados muestran que a las 48 hs de cultivo SPARC ejerce su efecto antiadhesivo en las células LBLAST generando la formación de un esferoide laxo y poco compacto, mientras que la línea L2F6 que presenta menores niveles de expresión de SPARC, presenta esferoides compactos y densos. Esta diferencia se observa hasta el quinto día de cultivo. Observamos además que el bloqueo de la función biológica de N-caderina no afectó la formación del esferoide en LBLAST el cual se mantuvo en ambos casos, con anticuerpo bloqueante o sin el, laxo hasta el quinto día presentando un grado de compactación un poco mayor al día inicial. Los resultados se muestran en la **Figura 44** a continuación:

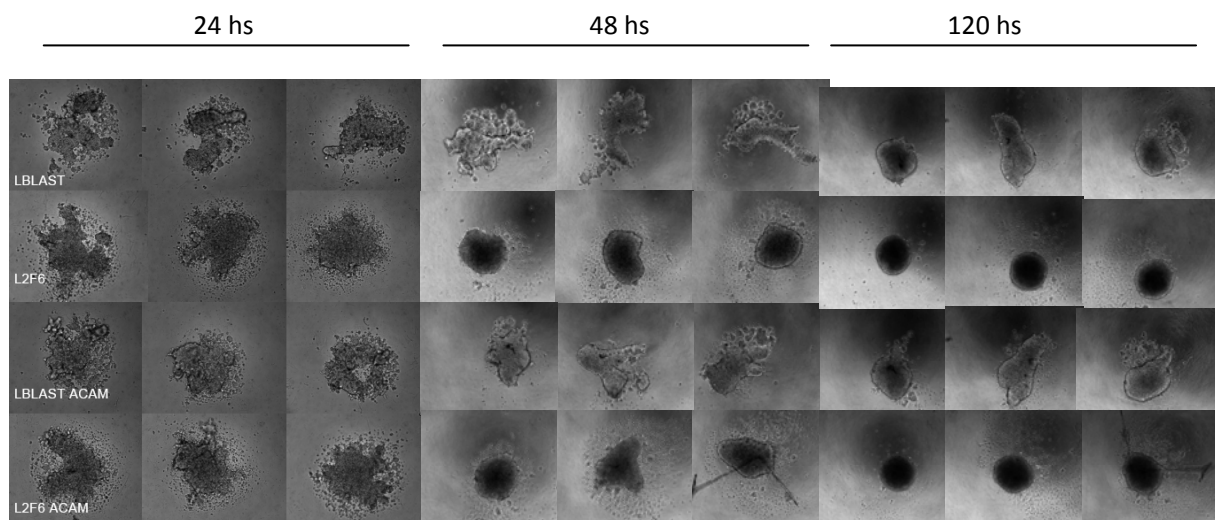


Figura 44. Estudio del rol de N-caderina en el crecimiento y formación de esferoides. Las células de melanoma LBLAST y L2F6 se crecieron en placas con fondo de agarosa durante 120 hs (5 días) en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal bloqueante de N-caderina. A las 48 hs post plaqueo se observaron las diferencias entre ambos tipos celulares y se observó que el bloqueo de la proteína no afectó la formación de los esferoides.

Estos resultados nos indicarían que el efecto antiadhesivo que se observa en las células con altos niveles de SPARC no estaría afectado por los niveles de expresión de N-caderina. Resta comprobar si la compactación vista en los esferoides de L2F6 es mediada por la expresión de E-caderina de dichas células. Este experimento no pudo llevarse a cabo por falta de un anticuerpo bloqueante de la función biológica de dicha proteína. Sin embargo, la poca compactación vista en los esferoides con baja

expresión de E-caderina estaría indicando que estas células, que expresan SPARC, estarían más preparadas para la migración e invasión de matriz que sus contrapartes con baja expresión de SPARC. Como se comentara anteriormente, el rol principal de la N-caderina en la progresión tumoral es la de favorecer las uniones célula de melanoma-fibroblasto y célula de melanoma-célula endotelial, favoreciendo la expansión e intravasación del tumor a sitios distantes. Es por eso que quisimos evaluar si la consecuencia de la expresión diferencial de N-caderina se veía reflejado en un ensayo *in vitro* que representa el proceso *in vivo* de intravasación. Este ensayo, denominado de migración transendotelial, se basa en evaluar la capacidad de las células de pasar a través de una monocapa de células endoteliales a expensas de su perfil de moléculas de adhesión. Como en este caso nos interesa el aporte de N-caderina a la migración a través de las células endoteliales (HMEC), realizamos el ensayo sobre las células LBLAST y L2F6 preincubadas o no con un anticuerpo bloqueante de N-caderina y en presencia o ausencia de 1 µg/ml de SPARC exógena. El experimento se llevó a cabo en placas multi-pocillo de 24 conteniendo insertos de plástico con una membrana de nitrocelulosa con poros de 8µm de diámetro. Sobre esa membrana se dejó establecer la monocapa de células endoteliales durante 24 hs y posteriormente se agregaron las células de melanoma premarcadas con un colorante supravital. Se permitió que pasen a través de la monocapa durante 6 hs y luego fueron fijadas y la monocapa removida.

Los imágenes presentadas en la **Figura 45** y su análisis estadístico en la **Figura 46**, demostraron claramente que la expresión de N-caderina en LBLAST favorece la migración a través de la monocapa de endoteliales. Por un lado, las células L2F6 que expresan un menor nivel de N-caderina presentan menor número de células transmigrantes. Por otro, el bloqueo de N-caderina con un anticuerpo neutralizante condujo a una disminución del número de células LBLAST que migran a través de la monocapa. Asimismo, demostramos que el agregado exógeno de SPARC regula la expresión de N-caderina dado que la incubación por 24 hs con SPARC exógena condujo a un aumento del número de células L2F6 que transmigran, aumento que es bloqueado por el uso de anticuerpos neutralizantes de N-caderina.

En ese momento nos preguntamos si la regulación de los niveles de expresión de N-caderina podía estar compartiendo también a los efectores colágeno tipo I y TGFβ1. Es por eso que decidimos evaluar en el ensayo de migración transendotelial, si el bloqueo de TGFβ1 o de los receptores de integrinas de colágeno tipo I afectaban el nivel de trans migración en las células de melanoma crecidas en presencia o ausencia de SPARC. Asimismo, evaluamos si existía un aporte de catepsina B al proceso de migración a través de una monocapa de células endoteliales B dado que fue demostrado que catepsina B contribuyó favoreciendo la migración de células tumorales *in vitro*. Es por eso que se realizó el experimento en presencia o ausencia del inhibidor específico CA-074.

Los resultados muestran que ninguno de estos tratamientos afectó la migración transendotelial, excepto el agregado exógeno de SPARC que, como habíamos mencionado anteriormente, aumentó el número de células L2F6 que transmigraron. Esto indicaría que la regulación de la expresión de N-caderina no se llevaría a cabo a través de los intermediarios TGFβ1, colágeno tipo I/α2β1 integrinas y/o catepsina B.

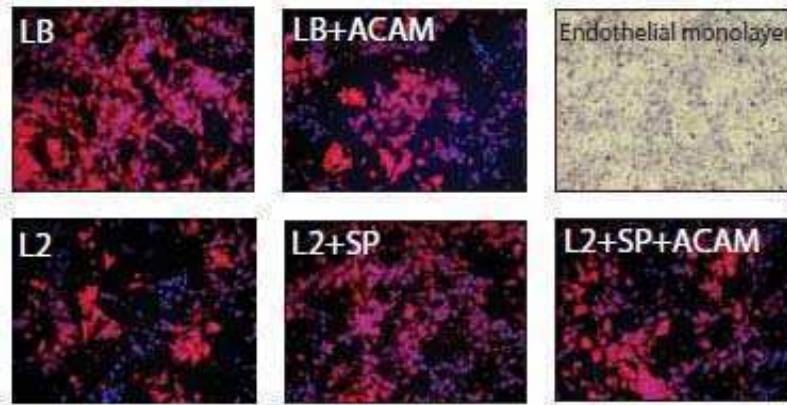


Figura 45. Imágenes representativas de las células que transmigraron. Las células de melanoma LBLAST y L2F6 fueron cultivadas 24 hs en presencia de un colorante fluorescente supravital llamado CM-Dil Cell Tracker Red confiriéndoles una coloración roja. Además, se cultivaron en presencia o ausencia de 1μg/ml de SPARC exógena humana. Las células fueron luego plaqueadas sobre una monocapa de células endoteliales HMEC (se observa la monocapa en el panel superior derecho) y se permitió que migren a través de esa monocapa. Las células migradas fueron fijadas luego de 6 horas de ensayo y los núcleos teñidos con colorante de Hoescht. La monocapa superior fue removida mecánicamente y 8 imágenes de cada inserto fueron tomadas para el conteo celular. Sólo las células rojas fueron contabilizadas como células de melanoma. El porcentaje de núcleos azules sin citoplasma rojo, que correspondería a células endoteliales que migraron, no superó el 10% en ninguna de las condiciones evaluadas.

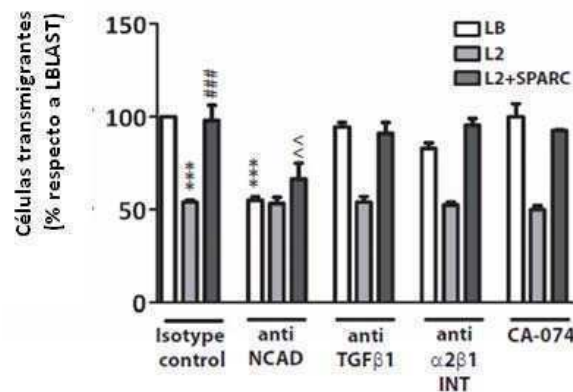


Figura 46. Efecto de la expresión de N-caderina sobre la migración transendotelial de células de melanoma. Las células fueron crecidas en presencia o ausencia de SPARC exógena (1μg/ml) y/o anticuerpo bloqueante de N-caderina (anti-NCAD). Las células fueron también pretratadas con un anticuerpo bloqueante de TGFβ1 y con la combinación de anticuerpos bloqueantes anti α2 y β1 integrinas o MOPC como control de isotipo. Se permitió que crezcan por 24 hs antes de llevar a cabo el experimento de trans migración. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes y el análisis estadístico se realizó aplicando modelos lineales mixtos.

***p<0.001 respecto a LBLAST; ### p<0.001 respecto a L2F6; ^^ p<0.01 respecto a L2F6-SPARC

Discusión

CAPITULO I: Análisis proteómico del secretoma y extractos de líneas celulares de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC

Interpretación de los datos obtenidos por proteómica en el secretoma

El análisis global de la expresión de genes, ya sea mediante el análisis del transcriptoma o del proteoma, representa en la actualidad una herramienta fundamental para el conocimiento y entendimiento de las redes moleculares que gobiernan el comportamiento celular. Cientos de publicaciones científicas han demostrado que las técnicas de genómica y proteómica presentan un fuerte impacto en el área de la salud por su potencialidad para detectar cambios simultáneos en la expresión de numerosas proteínas por parte de un tipo celular. Esta evaluación global de la dinámica del proteoma celular para una determinada condición biológica ha permitido no solo arrojar luz sobre vías de acción de proteínas, sino encarar métodos de diagnóstico y seguimiento de enfermedades más confiables y precisos, basados en perfiles de expresión de varias proteínas en lugar de marcadores individuales.

Si bien la literatura da cuenta de la gran cantidad de publicaciones enfocadas al análisis de diversos proteomas en modelos tumorales, pocos trabajos científicos han utilizado esta estrategia para ahondar en el conocimiento de las vías extracelulares que conducen a la adquisición de fenotipos agresivos en células malignas. Durante los últimos años, ha comenzado a tomar forma la idea de que el crecimiento tumoral es el resultado de la interacción de la célula tumoral con su entorno incluyendo tanto la matriz extracelular como las células asociadas (fibroblastos, células endoteliales e inflamatorias). Ese intercambio o *cross-talk* a través de asociaciones célula – célula y célula - matriz, le facilitan al tumor evadir la respuesta inmune y obtener los nutrientes para acelerar su desarrollo y diseminarse.

Como fuera presentado en la introducción de esta tesis, nuestro laboratorio se encuentra abocado desde hace varios años al estudio del rol de la proteína SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteines*) en los procesos de crecimiento e invasión tumoral. SPARC es una proteína no estructural de la matriz extracelular que ha demostrado estar involucrada en múltiples funciones relacionadas con

proliferación celular, adhesión e invasión, respuesta inmunológica antitumoral, además de angiogénesis. Por otra parte, se ha demostrado la sobreexpresión de SPARC en una amplia mayoría de tumores, como en melanoma (Alonso et al., 2004; Alonso et al., 2007; Ledda et al., 1997a; Ledda et al., 1997b) y en particular durante la expansión de los tumores de melanoma desde la fase de crecimiento radial (RGP) a la fase de crecimiento vertical (VGP) (Smit et al., 2007). Además, la expresión de SPARC se ha correlacionado con una disminución de la supervivencia (Ikuta et al., 2005; Massi et al., 1999) y con un aumento de la incidencia de metástasis distantes (Rumpler et al., 2003). Aunque las evidencias experimentales dan cuenta de la importancia de dicha proteína en el desarrollo tumoral, resulta aún difícil establecer el rol preciso de SPARC durante dicho proceso ya que se desconocen las vías moleculares que pueden mediar su efecto y las interacciones extracelulares en las cuales participa.

Este trabajo de tesis doctoral se enfocó en conocer los intermediarios moleculares por los cuales SPARC ejerce su efecto protumoral y para esto se realizó un estudio en profundidad de los mediadores que pueden actuar junto con SPARC en la progresión maligna.

El análisis global del secretoma de células de melanoma con niveles disminuidos de la expresión de SPARC se realizó sobre diferentes modelos experimentales y aplicando técnicas proteómicas cuantitativas como DIGE (geles bidimensionales) e iTRAQ (basada en el marcaje previo con isóbaros estables). Los resultados obtenidos por metodología DIGE, al ser analizados por ontología en forma grupal, demostraron que el grupo de las proteasas es uno de los principales grupos regulados por SPARC. Esto representó la primer evidencia que indicaba que SPARC regula una característica inherente a las células tumorales: la invasividad. Asimismo, otras proteínas cuyo rol ha sido ampliamente reportado en la literatura como favorecedoras de la progresión tumoral, resultaron ser expresadas diferencialmente: N-caderina, colágeno tipo I y vimentina. Interpretadas en conjunto y teniendo en cuenta las implicancias biológicas de estas proteínas, el grupo diferencialmente expresado y regulado por SPARC señalaba claramente a SPARC como una proteína involucrada en el proceso de Transición Epitelio-Mesenquimal, lo cual se discutirá en detalle posteriormente.

Es notorio el hecho de que en cualquiera de las técnicas proteómicas utilizadas, algunas de las proteínas encontradas como diferenciales como por ejemplo unidades de proteasoma, factores de elongación, proteínas de shock térmico y peroxirredoxinas, han sido señaladas como proteínas que surgen regularmente como diferenciales en listas de resultados de análisis proteómicos en diferentes estudios, independientemente del tipo celular o especie en estudio (Petra et al., 2008). Petra y colaboradores realizaron un meta-análisis de cientos de listas de resultados publicados en diferentes estudios proteómicos y elaboraron una lista de 15 proteínas que deben ser tenidas en cuenta al momento para evitar una sobreinterpretación de los resultados restándoles importancia biológica a su expresión diferencial. Cabe aclarar que ninguna de dichas proteínas fue utilizada en nuestros

estudios de validación. Una vez más, esto refleja la importancia de la correcta interpretación de los datos y la necesidad de valorar este tipo de información a la hora de seleccionar los candidatos para futuras validaciones.

Otro punto importante de discusión acerca de los resultados obtenidos en el análisis del secretoma es el hecho de encontrar proteínas con localización normalmente citosólica en el medio extracelular. Nuestro trabajo no es el primero en reportar proteínas intracelulares expresadas diferencialmente fuera de la célula (Mathias et al., 2009; Weng et al., 2008). La secreción no convencional de proteínas o exportación proteica no clásica o secreción independiente del RE/Golgi, es un proceso que ha sido descubierto hace más de 15 años y que puede explicar algunos de estos casos (Nickel, 2003).

Las vías alternativas de secreción postulan que las proteínas pueden alcanzar el espacio extracelular por 4 vías alternativas, entre ellas: secreción a través de proteínas transportadoras de membrana, invaginación-procesamiento en endosomas y posterior evaginación, flip-flop de proteínas que alcancen la membrana plasmática y finalmente secreción a través de exosomas. Este último punto posee una relevancia probada en cáncer dado que se ha demostrado que las galectinas pueden ser liberadas al medio extracelular a través de exosomas (Keryer-Bibens et al., 2006; Welton et al., 2010). En nuestros resultados hemos encontrado a la proteína galectina 1 diferencialmente expresada en el secretoma de las células de melanoma. Asimismo, se ha demostrado que las proteínas de shock térmico pueden ser secretadas por esta vía (Clayton et al., 2005) y nuestro análisis del secretoma refuerza este concepto. En efecto, varias proteínas HSPs (HSP-40 en el análisis DIGE y HSP-27 en el análisis por geles 2D teñidos con plata) resultaron diferenciales en el secretoma de las células de melanoma en estudio.

Uno de nuestros primeros experimentos enfocados en la validación de las proteínas se basó en estudiar los exosomas liberados por las células de melanoma con el objeto de evaluar si la expresión diferencial de algunas proteínas se debía a la carga selectiva de los exosomas. Las cantidades de exosomas recuperados de los medios condicionados en estudio fueron muy pobres y sugerían que esta vía no justificaba la cantidad de ciertas proteínas intracelulares encontradas en los medios condicionados, por lo cual esa hipótesis fue descartada, al menos como única contribuyente a las proteínas intracelulares encontradas fuera de la célula.

Los resultados obtenidos en cuanto al grupo de proteínas diferenciales encontradas en el análisis de extractos celulares de células de melanoma por estrategia DIGE se discutirán más adelante en el contexto de la catepsina B como proteína regulada por SPARC.

SPARC y el primer indicio de control sobre la transición epitelio-mesenquimal (EMT)

La interpretación biológica de los datos previa a la validación técnica, biológica y funcional de los candidatos nos llevó a un análisis exhaustivo de la literatura para ahondar en el rol de las proteínas diferenciales encontradas en el secretoma. Como ya comentáramos, el análisis ontológico de los datos arrojó como primer dato que el grupo de proteasas era el principal grupo de proteínas regulado por SPARC. Además, las proteínas N-caderina, colágeno tipo I y vimentina, terminaron de confirmar que SPARC regula la expresión y/o secreción de proteínas involucradas en características celulares de invasión y migración, dos procesos que forman parte de las habilidades adquiridas por células que sufren la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT). El incremento de la agresividad de ciertos tipos celulares de adenocarcinomas humanos ha sido recientemente asociado con la adquisición de características mesenquimales por las células malignas. La idea de que la transición epitelio-mesenquimal debe ocurrir para que las células tumorales adquieran propiedades que les permitan invadir y metastatizar fue documentada en muchos modelos celulares a pesar de que algunos autores señalen la falta de evidencia clínica acerca de este evento (Tarin et al., 2005; Thiery, 2002).

La relevancia del proceso de EMT en la biología tumoral se basa en fenómenos que ocurren a nivel embriológico y que caracterizan este proceso. Luego de la gastrulación, las células de la cresta neural sufren el proceso de EMT y comienzan a migrar lejos del tubo neural dando lugar a diferentes tipos celulares y estructuras que incluyen por ejemplo el sistema nervioso periférico (Thiery et al., 2009). La extrapolación de estos procesos conduce a la conceptualización de que los tumores humanos se vuelven más agresivos a través de un proceso que requiere la manifestación de características mesenquimales que involucran la pérdida de polaridad, el desprendimiento del control celular por células vecinas y la adquisición de capacidad migratoria e invasiva. Nuestros resultados demostraron que SPARC se correlaciona con la expresión de proteínas asociadas con la transformación mesenquimal

CAPITULO II: Validaciones técnicas y biológicas de las proteínas diferenciales seleccionadas

Por qué es necesario validar las proteínas?

Como vimos en las secciones de resultados Capítulo I y Capítulo II, los análisis proteómicos del secretoma tendientes a la búsqueda de intermediarios moleculares de SPARC revelaron que existe un grupo de proteínas relacionadas con la proteólisis que está diferencialmente expresado en nuestras líneas celulares de melanoma LBLAST y L2F6. De este grupo decidimos validar exhaustivamente a la proteína cathepsina B debido a la gran cantidad de evidencia presente en la literatura que relaciona a esta proteína con la progresión tumoral. Por otro lado, mediante dos análisis proteómicos del secretoma utilizando técnicas y líneas celulares diferentes, la proteína N-caderina resultó ser otra proteína regulada por SPARC cuya función biológica en la progresión tumoral ha sido ampliamente reportada y es por eso que también fue seleccionada para una validación integral.

Ahora bien, por qué es necesario validar a las proteínas? Los experimentos que resultan en una gran cantidad de datos, como los obtenidos por análisis proteómicos o genómicos, suelen tener limitaciones debidas a que usualmente la cantidad de réplicas que es posible estudiar es mucho menor que la cantidad de proteínas/genes que varían simultáneamente. Esto trae aparejado la deficiencia de los métodos estadísticos de dar verdadera confiabilidad a los resultados encontrados. En nuestros análisis establecimos un criterio arbitrario para definir que se consideren como diferenciales aquellos spots que varíen en mas de 1.5 veces (en valor absoluto) su expresión entre las muestras estudiadas. Aún así, es necesario confirmar las diferencias cuantitativas de expresión encontradas así como también la identidad de las proteínas que resulten diferenciales. Es por eso que la técnica de Western blot junto con la aplicación de un software para el análisis densitométrico de imágenes fueron elegidos para este fin. También, las técnicas de inmunocitoquímica o inmunohistoquímica fueron utilizadas para verificar las diferencias en los niveles de expresión. Estas técnicas seleccionadas se basan en la detección de proteínas mediante el uso de un anticuerpo específico y son apropiadas a la hora de confirmar la identidad y las diferencias de expresión de las proteínas.

Por otra parte, la validación biológica de los resultados involucra la necesidad de demostrar la independencia de los resultados obtenidos respecto a la técnica empleada para regular los niveles de expresión de SPARC. Los análisis proteómicos fueron llevados a cabo sobre las células LBLAST y L2F6 las cuales poseen un ARN de interferencia contra SPARC. Por ello, como parte de la validación biológica se emplearon células de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC

mediante el uso de otras herramientas como plásmidos, vectores lentivirales, vectores adenovirales o el agregado exógeno de la proteína purificada.

Finalmente, para comprobar la reproducibilidad de los resultados la validación incluyó el análisis de al menos 3 réplicas biológicas de cada condición estudiada lo cual significa la obtención de las muestras, medios condicionados o extractos celulares, en días independientes y a partir de lotes de cultivos diferentes.

Validación técnica y biológica de catepsina B

Como se mencionara anteriormente, catepsina B es una proteasa que tiene como blancos proteicos principales al colágeno IV y la laminina, dos de los constituyentes mayoritarios de la membrana basal. En células tumorales, se ha demostrado que la catepsina B se encuentra sobreexpresada en el estroma tumoral y en el "*leading edge*" o borde líder que es la zona especializada del tumor donde se concentra la actividad proteolítica con fines de degradar la matriz extracelular circundante e invadir. Se ha demostrado que catepsina B está concentrada allí desde donde ejerce su rol proteolítico (Campo et al., 1994; Koblinski et al., 2000) ya sea secretada al medio extracelular o unida a membrana. Teniendo en cuenta las evidencias mencionadas junto con los trabajos científicos que demuestran su sobreexpresión en una amplia variedad de tumores, entre los cuales se encuentra el melanoma, decidimos estudiar la correlación entre SPARC, catepsina B y sus funciones biológicas y ahondar posteriormente en los mecanismos moleculares por los que SPARC regula a esta proteína.

En la sección resultados se demostró que efectivamente la procatepsina B es la proteína que se encuentra expresada diferencialmente en el secretoma de la línea de melanoma MEL-LES con niveles regulados de SPARC. En nuestro modelo, los resultados obtenidos por espectrometría de masas indicaron que se trataba de la forma inmadura de la enzima la que se encontraba diferencial. Esto fue confirmado posteriormente por Western blot, dado que el peso de la banda diferencial fue de 48 kDa el cual se corresponde con el de la procatepsina B mientras que no se detectaron formas maduras en los sobrenadantes de LBLAST y L2F6. Mas aún, la actividad enzimática de los medios condicionados, medidos en un ensayo de activación con pepsina, demostraron que la procatepsina B era funcional y que efectivamente la actividad enzimática también estaba diferencial en las líneas estudiadas.

Por otra parte, fue interesante encontrar que en los medios condicionados de la línea A375 con niveles regulados de la expresión de SPARC por un vector lentiviral, se observó que las formas maduras de 31 kDa y 25 kDa se encontraban expresadas diferencialmente mientras que la forma inmadura presentaba los mismos niveles extracelulares tanto en la línea control como en los clones donde fue inhibida la expresión de SPARC. Estos resultados, aparentemente disímiles, ya fueron reportados en estudios anteriores realizados por otros laboratorios que demuestran que tanto la procatepsina B

como la catepsina B madura extracelulares pueden hallarse en niveles diferenciales en distintas situaciones biológicas. En efecto, el grupo de Koblinski demostró en un trabajo científico (Koblinski et al., 2002) que el contacto de fibroblastos extraídos de mama con colágeno tipo I inducía a un aumento de la secreción principalmente de procatepsina B. Por su parte, Klose y colaboradores (Klose et al., 2006), demostraron que células de melanoma altamente invasivas en contacto con una matriz de colágeno eran inducidas a un aumento de la secreción de las formas maduras de catepsina B.

Con estas evidencias, uno de los puntos a discutir es si la forma inmadura procatepsina B liberada al medio extracelular puede ser activada a sus formas maduras y activas y por lo tanto ejercer su actividad proteolítica. Es importante en este aspecto tener en cuenta que la localización de la procatepsina B liberada puede ser unida a membrana o libre en el medio extracelular (Mai et al., 2000a; Mai et al., 2000b). Como se comentara en la introducción de esta tesis, la procatepsina B es una proteína que madura a su forma activa por clivaje proteolítico en los lisosomas en células normales. Sin embargo, las células tumorales cambian la distribución de la catepsina B intracelular aumentando la fracción de proenzima que es secretada al medio extracelular. Se ha especulado que la unión de la procatepsina B a la membrana favorecería el procesamiento mediado por proteasas a las formas maduras y activas de la proteína (Mai et al., 2000a). Asimismo, se ha propuesto que otro de los mecanismos de activación sería la maduración autocatalítica que se ha descrito para serin-proteasas o aspartil-proteasas (Mach et al., 1994) y que fue confirmado en catepsina B por Pungercar y colaboradores (Pungercar et al., 2009). Por otro lado, se ha encontrado en el medio extracelular que los glicosaminoglicanos facilitan la activación de la procatepsina B a proteína madura (Caglic et al., 2007). Finalmente, existen evidencias contundentes que hacen referencia a la activación de la proenzima por el pH ácido extracelular que se encuentra en el microambiente tumoral. En ese sentido, se ha demostrado que en los tumores existe un aumento de la captación y metabolismo de la glucosa que genera un aumento de la producción de ácido que favorece la maduración de la procatepsina B además de un aumento de la secreción de ambas formas de la enzima (Gatenby et al., 2006). Es interesante que en un modelo de melanoma *in vivo* se ha demostrado que este aumento de la acidez extracelular trae aparejado un aumento de la secreción de otras proteasas y de factores proangiogénicos lo cual finalmente induce un aumento de las metástasis a nivel pulmonar (Rofstad et al., 2006a).

Todos estos posibles mecanismos extracelulares de activación de la procatepsina B pueden estarse activando diferencialmente en distintas líneas celulares llevando a que en un determinado momento haya composiciones relativas diferentes, de célula a célula, de procatepsina B y su forma madura, que no necesariamente definen la capacidad degradativa de la matriz extracelular de dichas células.

A raíz de todas estas evidencias decidimos develar de qué manera la menor actividad enzimática de catepsina B regulada por SPARC favorecería la progresión tumoral. La discusión respecto a estos

resultados será presentada en la discusión correspondiente al Capítulo III: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas.

Validación técnica y biológica de N-caderina

La relación entre N-caderina y melanoma ha sido una de las más ampliamente descritas en cuanto al rol de moléculas de adhesión y este tipo de cáncer. Es conocido el rol de las caderinas como moléculas de adhesión involucradas en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de la piel (Li and Herlyn, 2000). Como se describiera anteriormente, los melanocitos en la piel normal expresan E-caderina y se encuentran “embebidos” en una capa de queratinocitos, que también expresan E-caderina, anclados a la membrana basal de la epidermis. N-caderina es expresada en la piel normal por los fibroblastos y células endoteliales, pero no por queratinocitos o melanocitos (Hsu et al., 1996). Durante la progresión del melanoma se ha observado una progresiva pérdida de la expresión de E-caderina: se ha demostrado inmunoreactividad heterogénea en los *nevi* o lunares (Silve et al., 1998) y un aumento de la expresión tanto *in vitro* como *in vivo* de N-caderina por células de melanoma en estadíos avanzados. La ganancia de la expresión de N-caderina correlaciona con la pérdida de expresión de E-caderina (**Figura 47**) y este último punto es un factor crítico en la progresión maligna de la mayoría de los tumores epiteliales. La inhibición de los contactos célula-célula mediados por E-caderina promueve un fenotipo celular maligno que puede ser revertido por la reexpresión forzada de E-caderina (Guilford, 1999).

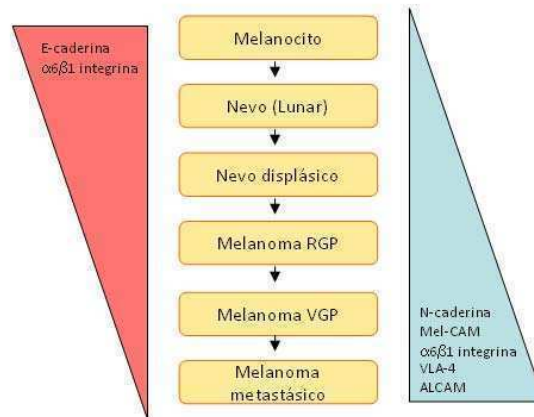


Figura 47. Expresión dinámica de las moléculas de adhesión durante el desarrollo del melanoma. Entre ellas se destaca el aumento paulatino de la expresión de N-caderina y la concomitante inhibición de la expresión de E-caderina. Nuestros resultados indican que SPARC es una molécula reguladora de este evento, favoreciendo la expresión de N-caderina y las consecuencias funcionales que trae aparejada esa expresión.

Nuestro interés por estudiar de qué manera SPARC regula la expresión de esta proteína queda expuesto claramente sobre la base de esta evidencia científica. Es por eso que nuestros estudios se

enfocaron a la validación de la proteína en forma integral, no sólo el fragmento de 90 kDa que se encontró diferencialmente expresado en el secretoma, sino también la proteína de membrana de 130 kDa que media las uniones homotípicas.

La validación de los resultados de proteómica en las líneas con expresión diferencial de SPARC, CMV y 1D, así como también las LBLAST y L2F6, demostraron contundentemente que el fragmento de 90 kDa de N-caderina se encuentra disminuído en las líneas que presentan disminución de la expresión de SPARC. Es por eso que ahondamos en la literatura en la búsqueda de funciones moleculares de este fragmento, el cual es un fragmento soluble generado por proteólisis de la N-caderina y que se demostró primeramente en retina (Paradies and Grunwald, 1993). Se demostró mas recientemente que la proteasa ADAM-10, otra proteína diferencial en nuestro análisis por iTRAQ, es la encargada del clivaje del dominio externo de N-caderina de 90 kDa, el cual regula el comportamiento adhesivo de las células y la localización de β -catenina (Reiss et al., 2005). Además, se propuso que otro de los roles del fragmento soluble sería el de promover la angiogénesis (Derycke et al., 2006).

De todos modos, la validación técnica y biológica de N-caderina demostró por citometría de flujo y por inmunocitoquímica que la proteína de membrana de 130 kDa también se encontraba expresada diferencialmente en las células de melanoma con niveles regulados de la expresión de SPARC. Demostramos además que SPARC es quien regula la expresión de la proteína dado que al restituir los niveles de la proteína en el medio extracelular de la línea L2F6 con bajos niveles de expresión de SPARC, aumentó la expresión de N-caderina de membrana. Como describiéramos anteriormente, la proteína madura es la que regula las uniones homotípicas célula-célula entre células de melanoma y fibroblastos o células de melanoma-célula endotelial. Las consecuencias funcionales de la expresión de N-caderina regulada por SPARC serán discutidas en la Capítulo III: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas.

Validación técnica de otras proteínas involucradas en el proceso de transición epitelio mesenquimal

Los resultados obtenidos por análisis proteómico del secretoma indicaron que además de catepsina B y N-caderina las cuales son proteínas involucradas en el proceso de Transición Epitelio-Mesenquimal, otras proteínas que son parte de este proceso también resultaron expresadas diferencialmente. Entre ellas: colágeno tipo I, FAM3C, catepsina L, catepsina X/Z/P y vimentina.

Se discutirá ampliamente en el Capítulo III el rol de colágeno tipo I en nuestro modelo de progresión de melanoma regulado por SPARC. Catepsina L y la catepsina X/Z/P, son dos proteasas cuyo rol en la progresión del melanoma ha sido demostrado en relación al proceso de invasión celular al igual que en el caso de catepsina B (Frohlich et al., 2001; Rumpler et al., 2003; Yang and Cox, 2007).

La proteína FAM3C también denominada ILEI, fue caracterizada en los últimos años siendo una publicación en *Cancer Cell* la que postula a la proteína como esencial para el proceso de transición epitelio-mesenquimal y formación tumoral (Waerner et al., 2006). Nuestro trabajo es el primero en demostrar que la disminución de la expresión de SPARC en un modelo *in vitro* de melanoma induce a una disminución de esta citoquina.

Finalmente, vimentina es una proteína que se ha demostrado como sobreexpresada en diferentes tipos tumorales, entre ellos melanoma, y cuyo rol en la progresión tumoral se centra en la regulación de la formación de filamentos intermedios y la consecuente motilidad celular (Hendrix et al., 1996). Además es una proteína considerada como marcadora o *hallmark* de la Transición Epitelio-Mesenquimal (Zeisberg and Neilson, 2009).

Dado el rol demostrado de estas proteínas en la progresión tumoral, decidimos validarlas técnicamente por western blot o inmunohistoquímica con el objeto de evaluar si la idea de SPARC como proteína reguladora de la transición epitelio-mesenquimal era avalada por la expresión diferencial de estas proteínas. Nuestros resultados probaron que efectivamente colágeno tipo I, FAM3C, catepsina L y catepsina X/Z/P están disminuídas en su expresión en el secretoma de la línea L2F6 donde SPARC se encuentra también disminuída mientras que vimentina fue detectada por inmunohistoquímica en cortes de tumores de las líneas LBLAST y L2F6. Aunque nuestro trabajo no profundizó el estudio con una posterior validación biológica mediante reversión de los niveles de expresión de SPARC, creemos que estos resultados validan nuestra hipótesis de que SPARC favorece la progresión tumoral mediante la regulación de proteínas que favorecen la transición epitelio-mesenquimal.

Interpretación global de los resultados obtenidos en proteómica de secretoma y de extractos celulares

El análisis proteómico de los extractos celulares obtenidos en nuestro de modelo de melanoma fue realizado con el objeto de ahondar en la búsqueda de intermediarios moleculares del efecto protumoral de SPARC. Los resultados obtenidos fueron analizados ontológicamente y supervisados individualmente. Los análisis evidenciaron que un grupo importante de proteínas expresadas diferencialmente en los extractos celulares, correspondía al de proteínas de citoesqueleto, mientras que el resto correspondía a diversas funciones celulares destacándose el metabolismo celular.

Nuestro trabajo luego se enfocó en profundizar en el estudio del mecanismo molecular mediante el cual SPARC regula la expresión y función celular de catepsina B y N-caderina y no se avanzó con la validación de proteínas de extractos celulares. Sin embargo, es posible hipotetizar acerca de posibles

relaciones moleculares entre las proteínas identificadas en el secretoma y en el análisis de extractos celulares. Entre ellas, la relación entre proteínas del metabolismo celular, las proteínas pertenecientes a vesículas membranosas y la activación de procatepsina B en el medio extracelular es una de las más relevantes. Se ha demostrado ampliamente en la literatura que los tumores presentan un catabolismo celular aumentado (Gatenby et al., 2006) generando un ambiente celular con baja concentración de glucosa, alta concentración de lactato, bajo pH extracelular y baja presión de O₂ (Rofstad et al., 2006b). Incluso se ha determinado que la incrementada captación de glucosa por parte de los tumores puede servir para determinar el pasaje de adenoma de colon a cáncer invasivo (Abbey et al., 2004). En nuestro modelo, una desregulación del metabolismo celular mediada por SPARC indicado por los resultados obtenidos en proteómica de extractos celulares, podría favorecer un pH ácido extracelular que favorezca la activación de la procatepsina B a catepsina B madura y activa. Asimismo, en la lista de proteínas diferenciales de los extractos celulares, se encuentra la proteína anexina II diferencialmente expresada. Se ha demostrado que la anexina II, junto con la procatepsina B forman un complejo anclado en la membrana de las células y concentrado en los *leading edge* o bordes líder que concentran la actividad proteolítica en los tumores. Esta proteína, anexina II, se encuentra disminuida en su expresión en las líneas que presentan bajo nivel de expresión de SPARC y de catepsina B y podría ser una causa de una disminuida actividad de la proteína en estas células de melanoma. Se ha demostrado que el aumento de la expresión de catepsina B, entre otras proteasas, en células tumorales puede observarse no sólo en el aumento de la secreción de la proteína sino también en su localización unida a membrana plasmática formando parte de un complejo proteico localizado en caveolas y constituido por anexina II, colágeno tipo I, procatepsina B y plasminógeno (Mai et al., 2000b). Este complejo podría ser el sitio de activación de la procatepsina B a catepsina B activa. Si bien en nuestro estudio no ahondamos en la verificación de este proceso, es factible que sea una de las causas moleculares que justifique, además de lo comentado anteriormente, las diferencias en los niveles de invasividad de las células que se observó en la validación funcional.

CAPITULO III: Validación funcional de las proteínas diferenciales seleccionadas

Análisis del rol de catepsina B en la progresión tumoral mediada por SPARC

La catepsina B es una cisteína-proteasa lisosomal cuya expresión y tráfico se encuentran frecuentemente alterados en cáncer y tanto la forma unida a membrana como las formas secretadas contribuyen a la invasividad y al incremento de las propiedades metastásicas en los tumores malignos (Szpaderska and Frankfater, 2001). De hecho, la sobreexpresión de catepsinas lisosomales ha sido propuesta como target terapéutico dado que evidencias experimentales han demostrado la sensibilización de las células tumorales a la muerte inducida por permeabilización de la membrana lisosomal y liberación del contenido al citosol, postulando este proceso como “el talón de Aquiles” de las células tumorales (Fehrenbacher and Jaattela, 2005).

La sobreexpresión de catepsina B se ha demostrado en una amplia variedad de tumores (Podgorski and Sloane, 2003), tanto murinos como humanos, entre los que se destaca el melanoma (Mohamed and Sloane, 2006). Su rol en la progresión tumoral se centra en el proceso de invasión celular, pero también se ha demostrado su participación en apoptosis, angiogénesis y proliferación celular (Gocheva et al., 2006). Catepsina B se ha encontrado normalmente en el borde o límite invasivo de los tumores en biopsias de tumores de pacientes (Rosly et al., 2003). Su rol en esa localización se centra en la degradación de proteínas de matriz extracelular como el colágeno tipo IV y la laminina, dos proteínas enriquecidas en la membrana basal que rodea a los órganos y que constituye la primer barrera física para la diseminación tumoral. Su acción se basa además en la degradación indirecta de proteínas dado que puede activar, mediante clivaje enzimático, otras proteasas que luego actuarán degradando proteínas de matriz.

Los resultados obtenidos por proteómica y las posteriores validaciones técnica y biológica de catepsina B dieron cuenta de que la secreción de esta proteína está disminuida en las células con baja expresión de SPARC. Dada la importancia de esta proteína en el proceso invasivo, la validación funcional de la misma se realizó mediante un ensayo *in vitro* de invasión en Matrigel, el cual remeda el proceso *in vivo* de invasión tumoral. Mediante este ensayo se pudo concluir que efectivamente la menor secreción de catepsina B correlaciona con una menor actividad enzimática y por lo tanto con un menor número de células de melanoma capaces de invadir una matriz de proteínas *in vitro*.

La relevancia de los resultados presentados radica en que hemos demostrado que SPARC regula la secreción de catepsina B en células de melanoma sin afectar aparentemente la transcripción del gen y

que la restitución de los niveles de SPARC no sólo reestablece un nivel aumentado de catepsina B secretada sino también la concomitante invasividad celular. Es interesante en este punto destacar que la catepsina B ha demostrado cumplir un papel preponderante en la invasividad de las células de melanoma frente a otras proteasas como las metaloproteasas que muestran una mayor influencia en la invasividad en otros sistemas experimentales.

Secreción de catepsina B mediada por SPARC: rol del colágeno tipo I

Los resultados presentados en esta tesis resaltaron la importancia de catepsina B en la invasión celular lo cual generó nuestro interés en la búsqueda de los intermediarios moleculares por los cuales SPARC regula la secreción de la proteína y el consecuente comportamiento invasivo de las células. Trabajos científicos han demostrado que el microambiente tumoral puede modular la expresión o secreción de catepsina B por parte de las células tumorales y de otros tipos celulares asociados al tumor como fibroblastos y células inflamatorias (Sloane et al., 2005). De este modo, comenzamos estudiando el rol de colágeno tipo I como mediador molecular de SPARC debido a la existencia de evidencia científica que relacionaba el rol de colágeno tipo I en la regulación de la secreción de catepsina B y, por otro lado, la regulación de la expresión de colágeno tipo I mediada por SPARC y TGF β 1.

Las publicaciones científicas que relacionaban a colágeno tipo I y catepsina B, se basaron en observaciones realizadas en células de fibroblastos humanos extraídos de mama y en célula de melanoma altamente invasivas las cuales, en contacto con colágeno tipo I *in vitro*, promovían un aumento de la secreción de catepsina B en el medio extracelular y un aumento concomitante de la capacidad invasiva de las células (Klose et al., 2006; Koblinski et al., 2002). Mas recientemente, se vió que en las capas externas de esferoides de células de glioblastoma crecidos sobre matrices de colágeno tipo I había una aumentada actividad de catepsina B sin cambios a nivel transcripcional o traduccional (Gole et al., 2009). Por otro lado, numerosas publicaciones relacionaron a SPARC y colágeno tipo I . Se ha demostrado que SPARC se une con alta afinidad al colágeno tipo I y a otros tipos de colágeno (Giudici et al., 2008; Sasaki et al., 1997a; Sasaki et al., 1998). Funcionalmente, SPARC influencia la fibrillogénesis durante los pasos tempranos de la formación de fibrillas con un posible rol como chaperona en el ensamblaje de las fibrillas (Emerson et al., 2006; Giudici et al., 2008; Martinek et al., 2007). Asimismo, ha sido documentado que la piel de ratones *null* para SPARC posee una composición mas laxa con la mitad de la cantidad de colágeno en comparación con piel normal. Por otro lado, varias publicaciones han demostrado que SPARC regula la expresión de colágeno tipo I indicando que SPARC podría actuar como proteína reguladora de la disponibilidad de colágeno tanto

a nivel transcripcional como postraducciona (Francki et al., 1999; Schellings et al., 2009; Yunker et al., 2008; Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2005a).

Nuestros datos proveen una clara evidencia de que el colágeno tipo I, a través de su interacción con su receptor $\alpha 2\beta 1$ integrina (Leitinger and Hohenester, 2007), es responsable en gran medida de la capacidad de SPARC de promover la degradación de proteínas de la membrana basal mediada por catepsina B producida por células de melanoma que sobreexpresan SPARC y por lo tanto debe ser considerado como un mediador del efecto protumorigénico de SPARC en melanoma humano.

Nos preguntamos posteriormente de qué manera SPARC incrementa la señalización mediada por colágeno tipo I y para eso chequeamos si SPARC era reguladora, en nuestro modelo de melanoma, de la transcripción del gen de colágeno tipo I. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por proteómica de secretoma donde veíamos que la proteína diferencialmente expresada en el medio condicionado es la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I, evaluamos por PCR en tiempo real los niveles del transcripto correspondiente y corroboramos que SPARC regula la transcripción del gen. Este incremento tanto en la transcripción como en la secreción de la proteína podría resultar en una incrementada activación de la señalización vía $\alpha 2\beta 1$ integrina. Sin embargo, no podemos determinar que este sea el único efecto ya que SPARC podría estar, además, regulando el procesamiento y/o maduración del colágeno tipo I lo cual podría afectar la señalización del mismo. En este aspecto, es interesante hipotetizar acerca del rol de la rigidez (*stiffness*) de la matriz extracelular en la progresión tumoral, que ha sido resaltada en trabajos recientes (Assoian and Klein, 2008; Discher et al., 2005; Levental et al., 2009). Estos trabajos han demostrado que la inducción de la expresión de colágeno tipo I genera un aumento en la rigidez de la matriz extracelular, promoviendo la formación de contactos focales de adhesión e induciendo la invasión celular del epitelio activado de manera dependiente de integrinas (Levental et al., 2009). El efecto de SPARC entonces sobre la expresión y/o el procesamiento del colágeno podría alterar las propiedades reológicas de la matriz extracelular y, de esta manera, la capacidad de transducir señales a través de integrinas. Es también importante mencionar que la región de unión del colágeno a SPARC se solapa parcialmente con la región de unión a $\alpha 2\beta 1$ integrina (Wang et al., 2005). Podríamos pensar en una posibilidad de que SPARC module la señalización a través de integrinas alterando la afinidad del colágeno por las integrinas.

Integrando las evidencias presentadas en esta tesis, las publicaciones científicas y las hipótesis planteadas queda claro que quedan abiertas nuevas vías para explorar los mecanismos moleculares por los cuales SPARC ejerce sus efectos biológicos a través de la interacción colágeno tipo I/ $\alpha 2\beta 1$ integrina.

Secreción de catepsina B mediada por SPARC: rol del TGFβ1

Como se comentara en la introducción de esta tesis, numerosas publicaciones han demostrado la relación entre SPARC y TGFβ1, quienes presentan efectos de activación recíprocos, esto es, TGFβ1 puede inducir la expresión de SPARC y SPARC puede generar un aumento de la expresión de TGFβ1 (Bassuk et al., 2000a; Ford et al., 1993; Francki et al., 1999; Francki et al., 2004a; Pavasant et al., 2003; Reed et al., 1994; Schiemann et al., 2003a; Shiba et al., 2001; Wrana et al., 1991).

Entre los efectos que se han demostrado para TGFβ1, se encuentra el de regulador y promotor de la transición epitelio-mesenquimal (Wendt et al., 2009; Zavadil and Bottinger, 2005) además de inducir el *switch* o cambio de E a N caderinas en melanoma a través de una vía de señalización dependiente de Snail (Peinado et al., 2003). Una publicación reciente ha relacionado además a TGFβ1 con la inducción de la transición epitelio-mesenquimal a través de la regulación de la expresión de clusterin, una proteína secretada que ha resultado disminuido en nuestros análisis proteómicos de melanoma en la línea celular donde se encuentra disminuida SPARC (Lenferink et al., 2010; Sosa et al., 2007). Si bien no hemos profundizado en la validación funcional de esta proteína, este *link* o relación entre TGFβ1-clusterin y SPARC debería ser investigado.

Entre las evidencias encontradas en la literatura, se destaca la que vincula a TGFβ1 con catepsina B en un modelo de células mieloides, donde se demostró que TGFβ1 induce a un aumento de la expresión de catepsina B (Reisenauer et al., 2007). Es por eso que indagamos acerca del rol de TGFβ1 en nuestro modelo de melanoma en relación a la invasividad celular debida a la expresión de catepsina B. Nuestros resultados demuestran que el reestablecimiento de la expresión de SPARC en la línea L2F6 y el consecuente aumento de la invasividad puede ser inhibido parcialmente con anticuerpos anti-TGFβ1 o por inhibidores como el SB-431542 (Halder et al., 2005) del receptor de TGFβ1 .

Es interesante que esta reversión mediada por dos inhibidores diferentes del TGFβ1 sea claramente parcial, aún cuando los resultados no son estadísticamente significativos dado el estrecho rango dinámico de la variable que se mide. Efectivamente, un mayor aumento de las concentraciones de inhibidores no varió la cantidad de células que invadieron en el ensayo. Este resultado, está indicando que la participación de SPARC como promotor de la invasión dependiente de catepsina B no estaría mediada únicamente por TGFβ1 endógeno. En efecto, habría una vía de aumento de la actividad de catepsina B en donde TGFβ1 estaría involucrado, y otra vía independiente de TGFβ1. Comprobando esta hipótesis, la adición de anticuerpos bloqueantes anti-SPARC a los experimentos de invasión en presencia de anticuerpos anti-TGFβ1 inhibe totalmente la invasión mediada por catepsina B, bloqueando la invasividad independiente de TGFβ1 endógeno.

Dos evidencias experimentales indican que TGFβ1 como mediador de la invasión, estaría actuando aguas arriba de colágeno tipo I y estimulando su acción promotora de catepsina B: la primera, la

acción de TGF β 1 exógeno, el cual restituye la invasividad de las células L2F6, está mediada por las integrinas α 2 β 1 ya que es inhibida por anticuerpos específicos. La segunda, el efecto promotor de la invasión logrado por el plaqueo de las células sobre una superficie de colágeno tipo I, no es afectado por inhibidores de TGF β 1, lo cual indica que la acción directa del colágeno tipo I está aguas debajo de TGF β 1.

Finalmente, los experimentos con anticuerpos anti-SPARC que inhiben completamente la inducción de la invasión dependiente de TGF β 1 exógeno, indican que TGF β 1 estaría actuando sobre la invasión a través de la inducción del eje SPARC/ colágeno I/ catepsina B. Sin embargo, los resultados de inhibición parcial de la invasión mediada por TGF β 1 por acción de los anticuerpos bloqueantes de integrinas sugieren un camino complementario, independiente de integrinas α 2 β 1. Se requieren nuevos experimentos para dilucidar esta cuestión.

Análisis del rol de N-caderina en la progresión tumoral mediada por SPARC

Evidencias nuestras y presentes en la literatura demuestran que SPARC induce la adquisición de un fenotipo más agresivo con características mesenquimales en melanoma lo cual es consistente con la posibilidad de que SPARC producida por fibroblastos en el límite invasivo del tumor pueda promover localmente el proceso de transición epitelio mesenquimal (EMT). En efecto, la transición desde un fenotipo epitelial a uno mesenquimal puede ser un evento focalizado que ocurra localmente en el límite invasivo (Thiery et al., 2009). Uno de los eventos más relevantes de la EMT que ocurre durante la progresión del melanoma es la pérdida de la expresión de E-caderina la cual contribuye al crecimiento descontrolado y al comportamiento invasivo de los melanocitos transformados.

Trabajos previos al nuestro habían demostrado el control de SPARC sobre la disminución de la expresión de E-caderina en células de melanoma humano a través de la inducción del factor Snail, un represor de la expresión de E-caderina, siendo este efecto asociado a un aumento de la invasividad tumoral (Robert et al., 2006a). Los resultados presentados en esta tesis demostraron que además SPARC regula la expresión de N-caderina, promoviendo un aumento de la proteína en membrana y del fragmento soluble en medios condicionados (Sosa et al., 2007). Nuestros resultados claramente demostraron el rol de SPARC como regulador del *switch* de caderinas en nuestro modelo de melanoma. Uno de los puntos más importantes luego de la obtención de estos resultados fue evaluar las consecuencias funcionales de la expresión de N-caderina en las células de melanoma. Nos basamos en evidencias experimentales publicadas en trabajos científicos como el de Qi y colaboradores (Qi et al., 2005) quienes demostraron que la expresión de N-caderina en membrana

favorece el proceso de migración transendotelial, esto es, el pasaje de células tumorales a través de células endoteliales, para ver si en nuestro modelo la expresión de N-caderina generaba el mismo efecto. En efecto, confirmamos que las células de melanoma con alta expresión de N-caderina confirmada por citometría de flujo e inmunocitoquímica, favorecían el pasaje de las células a través de una monocapa de células endoteliales de microvasculatura dérmica. Este proceso fue inhibido en presencia de anticuerpos bloqueantes de N-caderina y en el caso de células con baja expresión de N-caderina, como las L2F6 que a su vez expresan bajos niveles de SPARC, se observó un bajo número de células transmigrantes que fue revertido cuando fueron restituidos los niveles de SPARC exógena durante 24 hs en cultivo. Estas observaciones confirmaron que SPARC regula la expresión de N-caderina y que ésta es la encargada de favorecer el contacto homotípico célula-célula necesario para permitir el pasaje de las células tumorales a través de las endoteliales, proceso que, *in vivo*, se denomina intravasación y que es de crucial importancia a la hora de permitirle a las células tumorales viajar a sitios distantes y metastatizar.

En la búsqueda del conocimiento del mecanismo a través del cual SPARC ejerce este efecto regulador del *switch* de caderinas, evaluamos si compartía los intermediarios moleculares demostrados para la regulación de catepsina B. Vimos que ni el plaqueo sobre colágeno tipo I ni la incubación con anticuerpos anti $\alpha 2\beta 1$ integrinas afectaron la capacidad de las células de melanoma de pasar a través de una monocapa de células endoteliales remedando el proceso *in vivo* de intravasación, indicando que este proceso ocurre independientemente del eje colágeno tipo I- $\alpha 2\beta 1$ integrinas.

Nuestras evidencias demostraron además que TGF β 1 no media el efecto de SPARC sobre la intravasación. Esto sustenta la relevancia de SPARC como un inductor de la transformación mesenquimal independiente de TGF β 1 y sugiere una vez mas que el balance extracelular entre los efectos de SPARC y TGF β 1 secretados, ya sea por las células tumorales o por el estroma tumoral, es el que finalmente será responsable de la progresión tumoral a la metástasis. Nuestros resultados correlacionaron también con evidencias demostradas *in vivo* en un trabajo publicado por Alonso y colaboradores (Alonso et al., 2007) donde se estudió comparativamente la expresión de genes en muestras de pacientes con melanoma mestatásico y no metastático por tecnología de microarrays y tissue arrays y se demostró que la expresión de SPARC, N-caderina y catepsina B (entre otros) se correlacionó fuertemente con el desarrollo de metástasis en melanoma humano. Basados en nuestras evidencias experimentales, proponemos que SPARC es una proteína promotora de los cambios prometastásicos observados en muestras de pacientes.

Conclusión

El objetivo principal de esta tesis de doctorado fue conocer los intermediarios moleculares por los cuales SPARC ejerce su acción protumoral en melanoma. Mediante un análisis global del secretoma de células de melanoma deficientes en los niveles de expresión SPARC seguidas de la adición de SPARC exógena para reconstituir los niveles de expresión, se demostró que SPARC promueve en células de melanoma la adquisición de características mesenquimales mediante un incremento de la secreción o expresión de genes asociados con propiedades mesenquimales, tales como proteasas, colágeno tipo I y N-caderina.

Mediante el abordaje del estudio funcional de estas características mesenquimales adquiridas e inducidas por SPARC, demostramos que la regulación de la secreción de catepsina B es lo que determina la capacidad invasiva de las células. A mayor nivel de expresión de SPARC por parte de las células de melanoma, mayor es la secreción de catepsina B al medio extracelular y mayor es la capacidad de las células de invadir una matriz compleja de proteínas similar a la de la membrana basal.

De la misma manera, estudios funcionales enfocados al rol de N-caderina regulada por SPARC en la progresión de melanoma, demostraron que SPARC regula el *switch* o cambio de caderinas de superficie, favoreciendo la expresión de N-caderina e inhibiendo la expresión de E-caderina. Este cambio en el perfil de caderinas de membrana favoreció el pasaje de las células de melanoma a través de una monocapa de células endoteliales humanas en lo que se conoce como proceso de migración transendotelial, un evento *in vitro* que representa el proceso de intravasación celular *in vivo*, dando como consecuencia a las células la posibilidad de viajar en la circulación a sitios distantes del tumor primario.

Con el objeto de conocer a través de que mecanismo molecular SPARC regula a estas proteínas, demostramos que TGF β 1 y colágeno tipo I son los intermediarios moleculares por los cuales SPARC regula la secreción o expresión de estas proteínas. Se demostró que colágeno tipo I, inducido por SPARC, señala dentro de las células a través de los receptores de membrana α 2 β 1 integrinas favoreciendo la secreción de catepsina B. De la misma manera, el agregado exógeno de TGF β 1 en células deficientes de SPARC ejerce un efecto promotor de la secreción de catepsina B y la concomitante invasividad celular. Se demostró que TGF β 1 induce este efecto a través de los receptores de colágeno tipo I, las α 2 β 1 integrinas, postulando un mecanismo de acción que involucra a estas dos proteínas como reguladoras de la secreción de catepsina B.

Finalmente, se demostró que la regulación de N-caderina ocurre a través de una vía independiente de TGF β 1 y colágeno tipo I.

Los resultados obtenidos nos permiten postular un mecanismo a través del cual SPARC podría estar ejerciendo su efecto protumoral, en melanoma este mecanismo se encuentra representado en la siguiente **Figura 48**.

MODELO PROPUESTO:

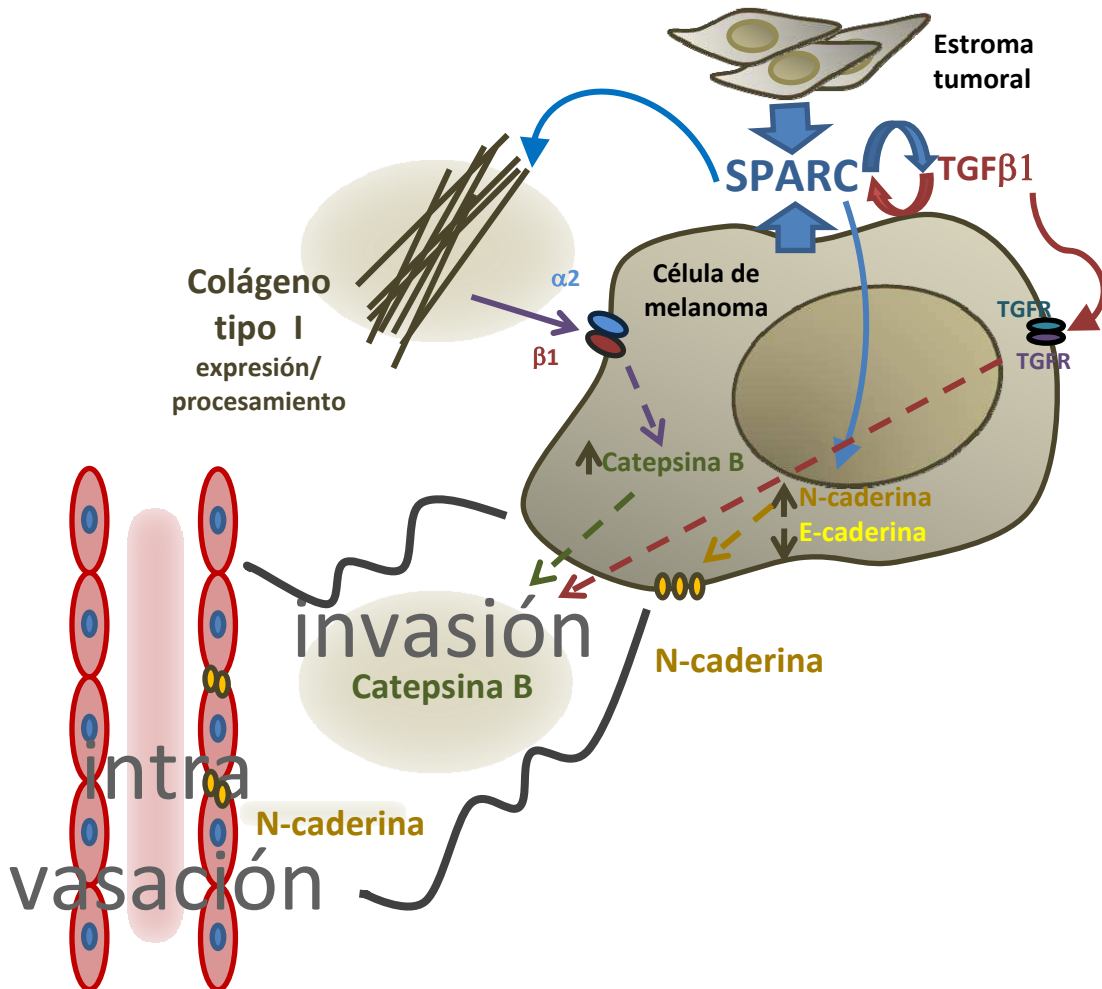


Figura 48. Modelo propuesto del mecanismo de acción de SPARC en la progresión tumoral. El trabajo presentado en esta tesis demuestra que SPARC ejecuta su acción protumoral regulando la secreción o expresión de proteínas prometastásicas orquestando en las células la secreción aumentada de catepsina B y la expresión de la proteína de membrana N-caderina. Funcionalmente, estas proteínas le confieren a las células capacidades asociadas a la transición epitelio mesenquimal (EMT): invasión y trans migración. SPARC induce la expresión y secreción/deposición de colágeno tipo I en la matriz extracelular, allí el colágeno dispara una vía de señalización a través de sus receptores conocidos $\alpha 2$ y $\beta 1$ integrinas lo cual finalmente conduce a una aumentada secreción de catepsina B, una proteasa que degrada la membrana basal que rodea los órganos. SPARC regula además, la expresión de TGF $\beta 1$ quien también colabora en el aumento de catepsina B y la consecuente invasividad, tanto a través de colágeno tipo I como de una vía independiente. Por el otro lado, la expresión de N-caderina inducida por SPARC promueve la interacción célula-célula entre las mismas células de melanoma y éstas con células endoteliales favoreciendo la trans migración de las células de melanoma a los vasos sanguíneos, el primer paso para promover la localización en sitios distantes al tumor primario.

Materiales y Métodos

Cultivos Celulares

Las células IIB-MEL-LES derivan de una metástasis pulmonar de un paciente con melanoma maligno epitelioide. En cultivo estas células presentan una morfología ahusada típicamente fibroblastoide y característica de fenotipos malignos. Expresan antígenos HLA clase I y HLA-DR en proporciones variables. Un análisis citogenético reveló la presencia anormal de 48 cromosomas. Sobre agar blando es capaz de formar colonias y cuando es transplantada a ratones atímicos, éstos desarrollan tumores con características fenotípicas del tumor original (Kairiyama et al., 1995).

La línea celular CMV surge de la transfección de las células IIB-MEL-LES con el plásmido pRc/CMV (Invitrogen), de ahora en adelante referido como pCMV, que carece de inserto codificante para proteínas (Ledda et al., 1997a).

El clon celular L-1D se obtuvo a partir de la transfección de las células IIB-MEL-LES con el plásmido pCMV conteniendo la secuencia codificante de la proteína SPARC de 1.6-kb de longitud, en orientación antisentido. A través de un análisis de *Northern Blot* se observó que este clon manifestó un 87% de disminución en la expresión del ARNm de SPARC, en comparación a las células L-CMV. Los niveles de expresión de proteína SPARC, evaluados por *Western Blot*, demostraron un 88% de disminución respecto a los de las células L-CMV (Ledda et al., 1997a). Esta disminución en la expresión de SPARC provocó que el clon L-1D permaneciera esencialmente no invasivo en ensayos de invasividad sobre Matrigel, y previno por completo la formación de tumores sólidos subcutáneos en ratones atímicos. En cultivos en monocapa las células L-1D presentan un tamaño ligeramente mayor al de las L-CMV.

Las líneas celulares con ARN de interferencia contra SPARC surgen de la transfección de las IIB-MEL-LES con el plásmido pcDNA6-V5-His-B (Invitrogen) sin la secuencia del promotor CMV. Este plásmido contiene clonada en su secuencia la de un ARN de interferencia para bloquear en forma estable la expresión de SPARC. El diseño del ARN de interferencia se realizó utilizando el programa GenScript Target Finder (www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai). Las secuencias target de 21 pares de bases comenzando en la base 321 (5'- CCAGAACCACCACTGCAAAC-3') y en la base 2175 (5'- TCTTAGTCTTAGTCACCTTAT-3') del ARNm de SPARC humana fueron clonadas en el vector pcDNA6-V5-His-B por digestión del mismo con enzimas *NheI* and *BglII*. Los vectores con ARN de interferencia resultantes fueron denominados pSP321 y pSP2175 y el plásmido control sin secuencia de interferencia fue denominado pBlast. Los vectores fueron transfectados en las células de melanoma mediante Lipofectamine 2000, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Resumidamente, las

células crecidas al 85% de confluencia en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con una mezcla de 1 mg de plásmido en 3 ml de Lipofectamine 2000. Treinta y seis horas después, las células se plaquearon en una dilución 1:10 en medio fresco de selección suplementado con 10% de suero fetal bovino (Natocor) y con 1mg/ml de blasticidina y se permitió que crezcan durante al menos 3 pasajes. De esta manera se obtuvieron las líneas celulares L-2175, L-321 y LBLAST. Para evaluar el bloqueo estable de la expresión de SPARC, 1 mg de proteína total obtenida de medio condicionado luego de 24 hs de cultivo en cada transfección fue analizado por western blot con un anticuerpo específico anti-SPARC. Posteriormente, se aislaron clones celulares individuales con bloqueo estable de la expresión de SPARC mediante dilución límite de las líneas celulares L-2175 y L-321 utilizando medio de cultivo suplementado con 1mg/ml de blasticidina en el medio de cultivo. De esta manera se obtuvieron los clones celulares L2F6 y L3B9 con diferentes grados centígrados de disminución de la expresión de SPARC, los cuales fueron mantenidos de rutina en medio de selección.

Mediante análisis por PCR en tiempo real y Northern blot, se demostró que el clon L2F6 presentó un 85% de disminución en la expresión de ARNm de SPARC, en comparación con la línea control LBLAST. Los niveles de expresión de la proteína SPARC evaluados por Western blot demostraron un 88,5% de disminución respecto a los de las células LBLAST (Sosa et al., 2007). En cultivos en monocapa las células L2F6 presentan un tamaño ligeramente mayor al de las LBLAST y una morfología mas epitelial. Cuando 5 millones de células LBLAST o L2F6 fueron inyectadas subcutáneamente en ratones nude atímicos se observó que las que presentaban disminuida la expresión de SPARC no generaban tumor *in vivo*. Esto se muestra en la **Figura 49**.

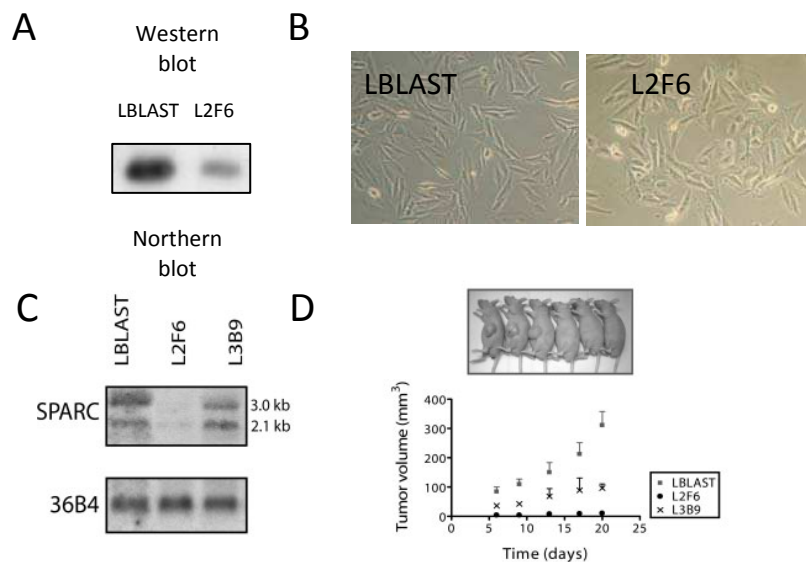


Figura 49. Características morfológicas de las células en cultivo, análisis de los niveles de proteína y ARNm luego de la transfección y ensayo de capacidad tumorigénica *in vivo*. A) Western blot de medio condicionado donde se ve que L2F6 secreta un 70% de SPARC respecto a LBLAST. B) Diferencia en la morfología celular, las células LBLAST son de tipo fibroblastoide y la de L2F6 de tipo epitelial. C) Northern blot the extractos de ARN de células LBLAST, L2F6 y L3B9 (clon con expresión intermedia de SPARC entre LBLAST y L2F6) donde se observa la disminución del ARNm de SPARC en L2F6. D) Las

células L2F6 con bloqueo de la expresión de SPARC presentan incapacidad de formación tumoral *in vivo* mientras que las LBLAST generan tumores que aumentan su tamaño hasta el día 25 del ensayo.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células fueron rutinariamente crecidas en placas de 150 mM de diámetro (P150), en medio denominado MEL con hepes (ver composición detallada en el anexo II), consistente en DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con L-Glutamina, Penicilina-G, Estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (Natocor). Para el mantenimiento de las células en cultivo cada 48 hs fueron lavadas 2 veces con PBS, tratadas con tripsina bovina 250 mg/ml por 5 minutos a 37 grados centígrados, resuspendidas en medio MEL y plaqueadas nuevamente en P150, normalmente en diluciones al tercio de la placa inicial. Cada uno de estos tratamientos de división del contenido celular una placa en tres o más placas, es llamado pasaje o repique celular. Con el objetivo de estandarizar las condiciones de mantenimiento celular y obtención de muestra, se estableció en forma arbitraria que el medio condicionado o los extractos celulares se obtendrían de células con no más de 5 pasajes desde el momento de su descongelación.

Generación de un vector lentiviral llevando un ARN de interferencia para SPARC

Se cortaron 10µg del vector pRNATin H1.4 (Genscript) con las enzimas BamHI y XhoI (Invitrogen) y 10 µg del siguiente oligo con la secuencia de ARN de interferencia efectiva contra SPARC:

51: tggatccccgaggcagagcgcgctcttgatatccggagagcgcgctctgctgccgtttttccaactcgagg

Los fragmentos cortados se corrieron en geles de agarosa y los fragmentos a clonar se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN illustra (Invitrogen). El inserto y el vector se cuantificaron y se ligaron en relación 3:1 y 5:1 (inserto:vector) utilizando la enzima Ligasa (Invitrogen). Estas ligaciones se utilizaron para transformar bacterias STBL3 (Invitrogen). Para la producción de los vectores lentivirales se transfectaron 5×10^6 células 293FT con los siguientes plásmidos y cantidades por placa 100mM^2 : pRNATin H1.4/lenti 51 ó empty (sin inserto) (8µg (Genscript), Gag/pol (12 µg), Env (VSV-G) (2 µg) y Rev (5 µg) utilizando 25 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Al día siguiente se cambió el medio y el sobrenadante conteniendo los lentivirus se colectó cada 12 horas desde las 24 hasta las 48 horas post transfección. Cada lote de medio conteniendo los virus se centrifugó a 1200 rpm, se filtró por $0,22 \mu\text{m}$ y se almacenó a -80°C hasta su utilización. Para la transducción de células A375 con los vectores lentivirales, se plaquearon 100.000 células A375 pasaje 49 en placas de 6 pocillos. A las 4 horas cada pocillo se transdujo con un 1ml de medio conteniendo los vectores lentivirales, Lenti51 ó empty utilizando polybrene (8 µg /ml). Se repitió la transducción a las 24 horas. A las 48 horas

posteriores a la primer transducción se seleccionaron las células transducidas utilizando G418 (5mg/ml). Luego de 15 días de selección se procedió a la amplificación y almacenamiento de las líneas A375, que es la línea parental sin ningún tratamiento y las líneas AE y A51, que contienen el lentivirus control y con el ARN de interferencia, respectivamente. Las células transducidas con el Lenti.51 se clonaron por dilución límite para obtener líneas con bajos niveles de expresión de SPARC. Los niveles de SPARC de 10 de esos clones se testearon por Western blot y PCR en tiempo real. El clon denominado A3 fue el que mostró menor producción de SPARC y fue seleccionado para su uso.

Purificación de SPARC humana a partir de medios condicionados

SPARC fue purificada a partir de medios condicionados por células de melanoma A375 en medio de cultivo libre de suero de acuerdo a como se describió en Haber et al (Haber et al., 2008).

Las preparaciones de medios condicionados concentrados rindieron SPARC con un 90% de pureza aproximadamente de acuerdo a lo que se testeó por SDS-PAGE. Para los ensayos de reversión de los niveles exógenos de SPARC las células fueron cultivadas 24 hs con SPARC humana derivada de A375 en concentración 1µg/ml.

Obtención de vectores adenovirales

Adenovirus conteniendo la secuencia sentido de SPARC (Ad-SPs) o la secuencia β Gal (Ad- β gal) fueron obtenidos como se describió en Sosa et al (Sosa et al., 2007). La concentración de los vectores recombinantes fue expresada como 50% de dosis infectiva de tejidos por mililitro sobre células HEK 293 (TCID₅₀/mL). Para la transducción de las células, $2,5 \times 10^5$ células de LBLAST y $2,0 \times 10^5$ células de L2F6 fueron plaqueadas en placas con pocillos de 35 mM de diámetro y crecidas en medio con suero. Luego de 24 hs, se realizó la transducción celular agregando $1,0 \times 10^9$ TCID₅₀/mL durante 6 hs en medio libre de suero. Las células fueron luego mantenidas en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino por 24 hs posteriores. Los ensayos de invasión fueron realizados 72 hs post-transducción cuando el efecto del transgen fue máximo.

Obtención de medios condicionados

Cinco millones de células LBLAST o 4 millones de células L2F6 fueron plaqueadas en placas P150 con medio suplementado con suero de manera de obtener un 80% de subconfluencia en las placas previo a la obtención del medio condicionado. Luego de 24 hs post-plaqueo, las células fueron lavadas 3 veces con PBS de manera de remover todas las proteínas que pudieran provenir del suero y que contaminarían la muestra posteriormente. Se agregaron 12 ml de medio MEL sin suero y se colectó el

medio condicionado 24 hs después. La colección de cada medio condicionado se realizó independientemente (LBLAST y L2F6) sobre tubos falcon de 50 ml en hielo para que la temperatura del medio condicionado baje evitando así la acción de proteasas presentes en el medio que podrían alterar y digerir las proteínas para el estudio. Posteriormente se centrifugó el medio a 1000 g durante 7 minutos a 4 grados centígrados, para descartar células o debris celular y el sobrenadante fue trasvasado a una nueva botella preenfriada donde se agregó un cocktail de inhibidores de proteasas (ver composición en el Anexo II). El medio condicionado volvió a centrifugarse a 3000 g por 30 minutos a 4 grados centígrados para eliminar precipitados.

Posteriormente el medio obtenido fue concentrado 60 veces utilizando dispositivos ultrafiltrantes de 3000 Da de *cut off* o valor de corte (Centriprep 3- Millipore) centrifugando las muestras a 4 grados centígrados a una velocidad de 2500 g. Las proteínas presentes en el medio condicionado concentrado fueron precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) al 10% en acetona suplementado con DTT 1M. La mezcla se dejó precipitar a -20 grados centígrados y se obtuvo el precipitado por centrifugación a 12000 g durante 40 minutos. El pellet obtenido fue lavado con acetona fría suplementada con DTT 1M y con 10% de agua para retirar el exceso de sales y posteriormente fue solubilizado en buffer de lisis (en adelante BL, ver composición en el Anexo II). Las proteínas presentes en el pellet fueron solubilizadas por agitación a temperatura ambiente durante 2 hs y posteriormente sometidas a un tratamiento extra de limpieza de sales utilizando el kit comercial 2D Clean Up kit (GE Healthcare). El mismo consiste en reprecipitar a las muestras con componentes presentes en el kit y lavar el pellet de proteínas utilizando una buffer de lavado. La muestra proteica obtenida se resolubiliza en buffer BL y está lista para ser cuantificada.

El proceso de cuantificación fue realizado utilizando también un kit comercial denominado 2D Quant Kit (GE Healthcare) el cual es compatible con los componentes presentes en el buffer de lisis. Las muestras fueron cuantificadas y conservadas a -80 grados centígrados hasta el momento de su utilización.

Obtención de extractos celulares

El procedimiento para la obtención de proteínas de extractos celulares fue similar al realizado para la obtención de medios condicionado. Luego de levantar el medio condicionado de las placas, las células adheridas a la placa fueron tratadas con tripsina durante 4 minutos a 37 grados centígrados y levantadas con medio MEL suplementado con suero. Las células fueron trasvasadas a un tubo de 50 ml y centrifugadas durante 7 minutos a 1000 g. Posteriormente, el pellet celular fue lavado dos veces con PBS para remover las proteínas provenientes del suero. Se agregó buffer de lisis sobre el pellet y

un cocktail de inhibidores de proteasas (ver composición en el Anexo II). Finalmente, las muestras fueron tratadas con el Clean Up Kit para remover sales y cuantificadas con el 2D Quant Kit.

Marcaje con fluoróforos para DIGE (*differential in gel electrophoresis*)

Las muestras proteicas obtenidas de los medios condicionados o de extractos celulares fueron marcadas previamente con los colorantes fluorescentes Cy2, Cy3 y C5 de acuerdo a las indicaciones del fabricante (GE Healthcare). Resumidamente, 50µg de extractos proteicos de las muestras LBLAST y L2F6 fueron marcados por el método de mínimo marcaje, con 400 pmoles de ésteres de *N*-hidroxisuccinimida de los colorantes Cy3 y Cy5 en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Todos los experimentos incluyeron un estandar interno marcado con el colorante Cy2, conteniendo iguales cantidades de proteínas de todas las muestras que forman parte del experimento. La reacción de marcaje fue limitada mediante el agregado de lisina 10 µM en hielo durante 30 minutos.

Los extractos proteicos LBLAST y L2F6 y el estándar interno se combinaron de a pares de acuerdo al diseño experimental indicado en la **Tabla 9** y corridos en un mismo gel (150 µg de proteína total). Las mezclas proteicas fueron diluídas en buffer de rehidratación (BR, ver Anexo II).

A)

GEL	Cy2 STANDARD	Cy3	Cy5
1	50 µg (6,25 µg each): LBLAST (A,B,C,D); L2F6 (A,B,C,D)	50 µg LBLAST A	50 µg L2F6 B
2	50 µg (6,25 µg each): LBLAST (A,B,C,D); L2F6 (A,B,C,D)	50 µg LBLAST B	50 µg L2F6 C
3	50 µg (6,25 µg each): LBLAST (A,B,C,D); L2F6 (A,B,C,D)	50 µg L2F6 D	50 µg LBLAST C
4	50 µg (6,25 µg each): LBLAST (A,B,C,D); L2F6 (A,B,C,D)	50 µg L2F6 A	50 µg LBLAST D

B)

GEL	Cy2 STANDARD	Cy3	Cy5
1	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg LBLAST A	50 µg L2F6 B
2	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg L2F6 A	50 µg LBLAST B
3	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg LBLAST C	50 µg L2F6 D
4	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg L2F6 C	50 µg LBLAST D
5	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg LBLAST E	50 µg L2F6 F
6	50 µg (4,16 µg each): LBLAST (A,B,C,D,E,F); L2F6 (A,B,C,D,E,F)	50 µg L2F6 E	50 µg LBLAST F

Tabla 9. Diseño experimental de los experimentos de secretoma 1 y 2 y experimento 3 sobre extractos celulares. Cuatro réplicas biológicas fueron estudiadas (A, B, C y D) para los experimentos de secretoma en rango de pH 3-11 (experimento 1) y rango 4-7 (experimento 2). Para extractos celulares, se estudiaron 6 réplicas biológicas (A,B,C,D,E y F) en rango de pH 4-7. Para todos los casos, 50 µg de muestra proteica fueron solubilizados en buffer de lisis y marcados con Cy3 o Cy5 de acuerdo al diseño experimental indicado.

Isoelectroenfoque (primera dimensión)

Rehidratación de tiras de anfólitos inmovilizados (IPG): consideraciones generales

La rehidratación de las tiras para isoelectroenfoque se llevó a cabo en un *buffer* de rehidratación adecuado (BR, ver Anexo II), de baja fuerza iónica y que mantiene las proteínas solubles y desplegadas durante toda la corrida electroforética. El mismo contiene urea en concentración desnaturalizante, CHAPS para solubilizar proteínas hidrofóbicas y minimizar agregados, tiourea para contribuir a la desnaturalización y solubilización de las proteínas más hidrofóbicas y azul de bromofenol para visualizar el frente de corrida. En el momento previo a usar la BR, se le agregó DTT para la reducción de puentes disulfuro y *buffer* IPG (mezcla de anfólitos solubles que complementa a los anfólitos inmovilizados y contribuye al correcto enfoque de las proteínas), del rango de pH correspondiente a la tira a utilizar. El volumen requerido de BR se eligió según la longitud de la tira elegida, en nuestro caso al utilizar tiras de 18 cm de largo, el volumen fue de 340 μ l.

Método de siembra de la muestra proteica

Para el caso de las tiras de isoelectroenfoque de 18 cm con un rango de pH 3-11 NL, las tiras fueron rehidratadas hasta su espesor original de 0.5 mM colocándolas sobre un soporte, con la cara correspondiente al gel hacia abajo, en contacto con la solución BR, durante 10-14 hs a temperatura ambiente. Se cubrieron las tiras con 4 ml de aceite mineral para evitar la evaporación del agua. La siembra de la muestra se realizó para este rango de pH 3-11 NL, por la metodología de siembra **en copa o cup loading**. En este método de siembra se utiliza una copita que sirve de reservorio para la muestra, y que permite la entrada gradual de la misma bajo la acción de voltaje. Se diluyó la muestra de proteína en un volumen de BR tal que la misma no superase el 10% del volumen total y cuidando de obtener un volumen final no mayor a 100 μ l, que es la capacidad máxima del reservorio. Esta mezcla se dejó con agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Se centrifugó brevemente la muestra a máxima velocidad por 5 min en una microcentrífuga, a temperatura ambiente, para bajar cualquier material particulado que existiese. Inmediatamente se sembró en el reservorio para muestra previamente apoyado sobre la cara del gel de la tira de IPG rehidratada y se inició el IEF siguiendo el protocolo A (ver apartado: Protocolo del isoelectroenfoque). Cabe aclarar que en este unico caso la corrida se lleva a cabo con la tira ubicada con la cara del gel hacia arriba.

Para el caso de las tiras de isoelectroenfoque de 18 cm con un rango de pH 4-7, las tiras fueron rehidratadas por el sistema de **rehidratación en gel o in gel rehydration**. Esta forma de siembra involucra la inclusión de la muestra a separar en el paso de rehidratación junto con el BR. Se mezcló entonces el BR previamente descripto con la muestra de proteínas de manera que la solución

resultante alcanzara el volumen sugerido según el largo de la tira de IPG (340 μ l para tiras de 18 cm). Esta mezcla se dejó agitando una hora a temperatura ambiente y luego se colocó sobre la superficie de todo el soporte de porcelana donde se llevó a cabo la corrida electroforética. Sobre esta mezcla se colocó la tira de IPG con la cara del gel hacia abajo, evitando la formación de burbujas de aire. Se cubrió con 1 ml de aceite mineral y se colocó en el aparato IPGphor. Se programó la corrida de isoelectroenfoque según protocolo B (ver siguiente apartado) el cual incluye la aplicación de un voltaje bajo durante la etapa de rehidratación. Este tipo de rehidratación favorece la entrada al gel de isoelectroenfoque de proteínas de alto peso molecular (Gorg et al., 1999). Por otro lado, con este tipo de rehidratación es menos probable que ocurra el fenómeno de carbamilación. En este proceso los iones cianatos que son lentamente producidos por degradación de la urea presente en el BR reaccionan con las proteínas modificándolas. En la rehidratación en gel estos iones son inmediatamente transportados por el gradiente de voltaje hacia el ánodo ofreciendo un ambiente libre de cianatos sin posibilidad de carbamilación (Herbert et al., 2003).

Protocolo de isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque para los sistemas rehidratación en gel o siembra en copa se desarrollaron en el sistema electroforético horizontal IPGphor (GE Healthcare). Este aparato incluye un elemento Peltier para el control de la temperatura (entre 18 y 25 grados centígrados) y una fuente de energía programable (hasta 8000 V y 1,5 mA). Las corridas se hicieron a 20 grados centígrados, limitando el amperaje a un máximo de 50 μ A por tira, ya que valores superiores de amperaje podrían provocar generación de calor que dañarían la tira y/o el soporte de la tira. La influencia de la temperatura a la cual es desarrollado el isoelectroenfoque sobre la calidad del mapa proteico ha sido estudiada en detalle (Gorg et al., 1991), concluyendo que 20 grados centígrados es una temperatura de enfoque óptima. A temperaturas bajas se forman cristales de urea, mientras que a temperaturas mayores se logra menor viscosidad, favoreciendo la entrada de las proteínas. Además a 20 grados centígrados se obtienen fondos más claros, menos modificaciones de las manchas y permite un enfoque bien definido de la manchas básicas en los extremos del gel (Gorg et al., 2000).

Protocolo A (cup loading)

Modo de voltaje aplicado	Voltaje (V)	Duración (h:min)	Voltios/horas (kVh)
En salto (step'n hold)	500	1:00	0.5
En salto (step'n hold)	1000	1:00	1.0
En salto (step'n hold)	8000	4:00	30.5
Total		6:00	32.0

Protocolo B (rehidratación en gel)

Modo de voltaje aplicado	Voltaje (V)	Duración (h:min)	Voltios/ horas (kVh)
En salto (step'n hold)	30	6:00	180
En salto (step'n hold)	60	6:00	360
En salto (step'n hold)	200	1:00	200
En salto (step'n hold)	500	1:00	500
En salto (step'n hold)	1000	0:30	1000
Gradiente	2000	0:30	2000
En salto (step'n hold)	8000	5:19	27760
Total		20:19	42533

Electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión)

Equilibración de las tiras de IPG

Inmediatamente luego de finalizar el isoelectroenfoco las tiras fueron equilibradas en buffer de equilibración (BE, ver anexo II), o, alternativamente, guardadas a -80°C hasta su corrida en la segunda dimensión.

La equilibración se llevó a cabo dentro de pipetas de 10 ml descartables, acondicionadas y firmemente selladas, utilizando 10 ml de BE para cada tira. La misma llevó dos pasos de 15 minutos cada uno. En el primero se le adiciono DTT al BE para volver a reducir los puentes disulfuro. En el segundo se reemplazo el DTT por iodoacetamida (IAA) para lograr la alquilación irreversible (carboxiamido-metilación) de los sulfhidrilos libres. De esta manera, se evitan oxidaciones que llevan a la formación de rayas o chorreados en el mapa electroforético final.

SDS-PAGE

Para la segunda dimensión se realizaron geles al 12,5% de acrilamida/bisacrilamida de 24 cm X 24 cm. La tira de IPG de 18 cm equilibrada fue colocada en la parte superior del gel de poliacrilamida con la parte plástica apoyada contra uno de los vidrios de baja fluorescencia. Los geles se corrieron en oscuridad en una cuba electroforética Ettan Dalt Six (GE Healthcare) en dos etapas, la primera a 5 mA por gel durante 45 minutos y luego 25 mA por gel durante 5-6 hs a temperatura ambiente hasta que el frente de corrida llegaba a 0,5 cm del borde inferior del gel.

Obtención de imágenes y procesamiento de las mismas

Los geles bidimensionales obtenidos fueron escaneados en un escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) a una resolución de 100 μm aplicando las longitudes de onda adecuadas de excitación para cada uno de los 3 fluoróforos (Cy2, Cy3 y Cy5). La cuantificación proteica relativa entre las muestras LBLAST y L2F6 en los 3 experimentos se realizó aplicando el software DeCyder 6.5 donde se detectaron los spots con expresión diferencial que cumplieran con los requisitos de estar en el menos 9 de 12 geles para los experimentos 1 y 2 y en al menos 15 de 18 geles para el experimento 3. Además se contaron como diferenciales aquellos spots que cambien su nivel de expresión en más de 1.5 veces (en valor absoluto) y que presenten un valor $p < 0,05$ en el análisis T-test.

Luego del escaneo de los geles, los mismos fueron teñidos durante una noche con el colorante fluorescente Sypro Ruby y fueron vueltos a escanear. Las imágenes obtenidas fueron cargadas al software del robot picador de spots automático o *Spot Picker* (GE Healthcare) el cual llevó a cabo la excisión de los spots diferenciales del gel de acuerdo al análisis realizado. Los geles fueron reescaneados luego del corte del spots para asegurar que el procedimiento haya sido preciso. Las imágenes obtenidas así lo indican en la **Figura 50**.

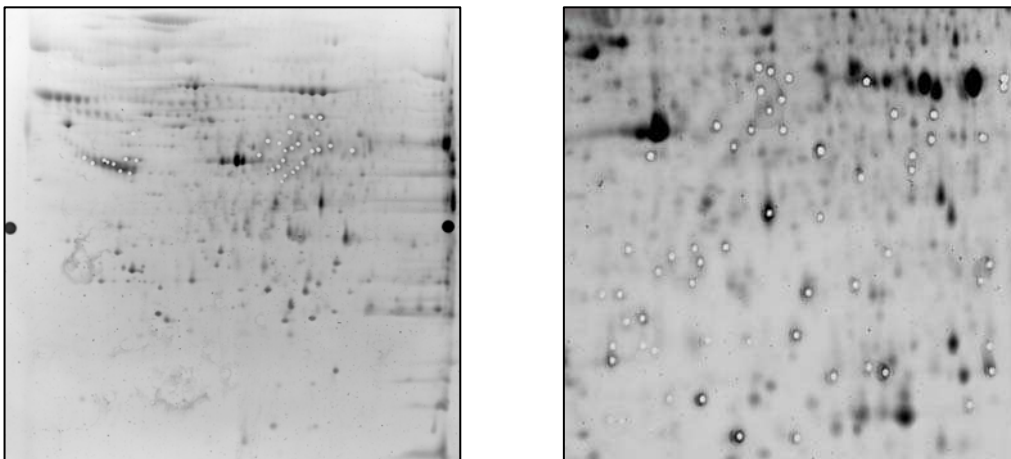


Figura 50. Imágenes de los geles luego del corte con el picador automático. Las imágenes demuestran la precisión del aparato para cortar los spots indicados en el software.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

Se llevó a cabo la identificación de proteínas en los spots diferenciales mediante el método de huella peptídica. Como fuera descripto en la introducción de esta tesis, este método se basa en el análisis del peso molecular de péptidos derivados de la digestión trípica de un spot escindido del gel bidimensional, mediante espectrometría de masas. Los pesos moleculares de dichos péptidos, obtenidos experimentalmente (huella peptídica de la proteína desconocida), se comparan mediante

algoritmos especiales con aquellos derivados de digestiones “virtuales” sobre secuencias de proteínas depositadas en banco de datos. La identidad de la proteína en la mancha corresponderá a la de aquella proteína cuya digestión virtual coincide con la experimental.

Digestión en gel de proteínas

La digestión trípica de las manchas se llevó a cabo en un digestor automático Investigator™ ProGest (Genomic Solutions), siguiendo el protocolo de Schevchenko *et al.* (Shevchenko et al., 2001) con ligeras variaciones:

- Lavado de las porciones del gel de poliacrilamida con 100 µl de NH₄HCO₃ 50 mM durante 20 minutos.
- Segundo lavado con 100 µl de acetonitrilo 100/ por 10 minutos.

Para la reducción y alquilación se procedió de la siguiente manera:

- DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM a 56° C durante 20 minutos.
- Iodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 50 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con bicarbonato de sodio 50 mM y acetonitrilo.
- Secado de las muestras por corriente de nitrógeno.

Para la digestión se añadió a las bandas secas:

- Tripsina porcina modificada para la secuenciación (Promega) a una concentración final de 16 ng/µl en bicarbonato amónico 25 mM durante 45 minutos a 37°C.
- Bicarbonato de amonio 50 mM durante 6 horas a 37°C.
- Se recolectó este primer sobrenadante y se guardó como primer extracto de los péptidos, aunque se procedió a una segunda extracción peptídico con TFA 0.1/ durante 15 min.
- La muestra se secó con calor en una centrifuga de vacío y posteriormente se reconstituyó en 10 µl de TA (solución de acetonitrilo acuoso al 33/ con ácido trifluoroacético al 0. 1/) sonicando la muestras durante 3 minutos.

Obtención de la huella peptídica mediante MALDI y búsqueda en bases de datos

Se depositó manualmente una alícuota de 0,3 µl de solución matriz (ácido 2,5 dihidroxibenzoico 5g/L en acetonitrilo acuoso al 33/ con ácido trifluoroacético al 0. 1/) en un portamuestras MALDI AnchorChip™ de 600 µm que se dejó secar a temperatura ambiente; a continuación se añadieron 0,3 µl de la mezcla de péptidos eluidos y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente.

Las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*, Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) Ultraflex (Bruker Daltonik) como lo describió Suckau et al (Suckau et al., 2003). De esta manera se obtuvieron espectros de huella peptídica y espectros de fragmentación del péptido más abundante. Cada espectro fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autoproteólisis de la tripsina bajo el control del software flec análisis 2.2 (Bruker Daltonik). Las masas correspondientes a péptidos trípticos y/o los espectros de fragmentación de péptidos fueron enviadas automáticamente a través del programa MS BioTools™ 3.0 (Bruker Daltonik) al programa Mascot™ (Matrix Science) (Perkins et al., 1999) para efectuar la búsqueda en la base de datos NCBI nr 6.5. No se establecieron restricciones respecto a la especie de origen y se permitió la pérdida de un corte tríptico.

Marcaje y diseño experimental de la metodología iTRAQ

Los medios condicionados de las células de melanoma LBLAST y L2F6 obtenidos como se describió anteriormente, fueron precipitados aplicando el 2D Clean-Up kit (GE Healthcare), y los precipitados fueron resuspendidos en bicarbonato de trietileamonio (TEAB). Las proteínas pertenecientes a cada muestra fueron cuantificadas por el 2D Quant kit (GE Healthcare). Un total de 50 µg de proteínas de cada muestra fueron reducidas con el reactivo Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en concentración 5 mM durante 1 hora a 60 grados centígrados y posteriormente alquiladas con s-metilmetanotiosulfonato (MMTS) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron digeridas con tripsina (Promega) a 37 grados centígrados durante 5 horas en una proporción 1:50 de tripsina: proteína.

Las muestras digeridas fueron marcadas con los reactivos iTRAQ, siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Applied Biosystems). Con cada vial de etiquetas iTRAQ solubilizadas en etanol se marcaron 100 µg de muestra proteica a pH 7.0 a temperatura ambiente por 2 horas. La reacción fue frenada por el agregado de 3 µl de ácido acético. Estas muestras marcadas y mezcladas en un único pool se fraccionaron por intercambio catiónico utilizando saltos de NaCl en concentraciones crecientes.

Identificación por LCTQ-Orbitrap

Cada fracción proveniente de la columna de intercambio catiónico fue inyectada en una nano columna (100 µm de diámetro interno y 12 cm de largo) de fase reversa C-18, y fueron analizados en un gradiente continuo de acetonitrilo consistente en 40% de B durante 45 minutos, 50-90% B en 1 minuto (B=95% acetonitrilo, 0.5% ácido acético). Una tasa de flujo de 300 nL/minuto fue aplicada para

eluir a los péptidos de la columna. Posteriormente fueron emitidos por una aguja nanospray para una ionización en tiempo real y fragmentación peptídica en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher). Se obtuvieron los espectros de fragmentación de tres iones parentales mas intensos de cada péptido ionizado y se analizaron a través de una corrida cromatográfica.

Todas las identificaciones fueron realizadas con el software Proteome Discoverer 1.0 (Thermo Fisher). Para la identificación de proteínas y de modificaciones postraduccionales, los espectros de fragmentación fueron analizados contra la base de datos MSDB utilizando el software Mascot (Matrix Science) contenida en el software Proteome Discoverer. Se permitió un error de 10 ppm o 0,8 Da para las búsquedas con espectros MS o MS/MS, respectivamente.

Western blot

Para confirmar la expresión diferencial de SPARC y otras proteínas diferenciales en los sobrenadantes o extractos celulares de las líneas celulares LBLAST, L2F6 y sus derivados luego de tratamientos para restituir la expresión de SPARC, se llevaron a cabo *western blots* revelados con anticuerpos específicos. Para ello se sembraron 5 µg de cada muestra de medios condicionados concentrados (obtenida según se describió anteriormente), o 20 µg de extractos celulares en distintas calles de geles de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida, junto a marcadores de peso molecular aparente (GE Healthcare) y se separó electroforéticamente en una cuba Mini-PROTEAN III (BioRad Laboratories) aplicando 70 V durante el pasaje de las proteínas por la porción concentradora del gel (*stacking*) y 100 V (equivalente a aproximadamente 300 mA) en la porción resolutive del gel (*resolving*). La corrida se detuvo cuando el azul de bromofenol (marcador del frente de corrida) llegó a un cm del borde inferior del gel.

Las proteínas así separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (HyBond, GE Healthcare) aplicando un voltaje de 90 V durante una hora en una cuba de transferencia del sistema Mini-PROTEAN III (BioRad Laboratories). Finalizada la transferencia la membrana fue bloqueada mediante tratamiento con leche descremada al 10% en PBS durante una noche a 4°C. Posteriormente se incubó con anticuerpos: monoclonal anti-SPARC AON-1 1:300 (Developmental Studies Hybridoma Bank); policlonal anti-catepsina B 1:100 (Santa Cruz Biotechnology); policlonal anti-catepsina X/Z/P 1:100 (Santa Cruz Biotechnology); monoclonal anti-catepsina L 1:100 (Santa Cruz Biotechnology); policlonal anti-FAM3C 1:100 (Abcam); policlonal anti-colágeno tipo I 1:100 (Santa Cruz Biotechnology); en leche al 5% en PBS durante 16 hs a 4 grados centígrados. Se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0,05% sobre la membrana, de 5-10 minutos cada uno.

Luego la membrana fue incubada por 40 minutos a temperatura ambiente con una solución 1:200 de IgG de cabra con especificidad anti-IgG de ratón, conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP)

(Jackson); o 1:200 de IgG de cabra con especificidad anti-IgG de conejo, conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson), según corresponda. Seguidamente se realizaron tres lavados más con PBS por 15 minutos cada uno y se revelaron las bandas específicas mediante la adición de 2 ml de solución de luminol (GE Healthcare), el cual al ser oxidado por la acción de HRP y peróxido de hidrógeno, emitió fluorescencia que se registró en placas fotográficas (GE Healthcare).

Los controles de carga fueron realizados mediante corrida de un gel en paralelo que fue cargado de la misma manera que para el western blot y fue teñido con el colorante fluorescente Sypro Ruby. El gel fue posteriormente escaneado y la imagen fue analizada densitométricamente con el software Image J. De la misma manera, luego del revelado de las placas, las mismas fueron posteriormente escaneadas y las imágenes fueron analizadas con el software image J (Rasband WS. Image J. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health) el cual permitió normalizar la densidad óptica de las bandas en estudio de acuerdo a la carga total de proteína en el gel y relativizar las cantidades de expresión como porcentaje de la línea control LBLAST.

Northern blot

El ARN total de las células LBLAST, L2F6 y L3B9 fue extraído de las células utilizando el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Alícuotas de 15 µg fueron sometidas a electroforesis en geles de 1% de agarosa, 18% v/v de formaldehído y 1X de buffer MOPS y transferidos posteriormente a una membrana Hybond-N1 de nylon (GE Healthcare) durante una noche en buffer SSC 2X de acuerdo al efecto de capilaridad. Luego se llevó a cabo la prehibridización en 1% p/v BSA, 0.5 M buffer fosfato, pH 7.4, 1 mM EDTA, 7% p/v SDS. Luego las membranas con el ARN prehibridizado fueron hibridizadas con una sonda de ADN complementario para SPARC marcada con (³²P)-dCTP por marcaje de primers al azar. Las membranas fueron rehibridizadas con una sonda de ADN complementario para 36B4 a los fines de normalizar los niveles de carga. Los niveles de expresión del gen de SPARC fueron cuantificados por densitometría de las bandas utilizando el software Image J y normalizados contra 36B4.

PCR en tiempo real

El ARN total de las células LBLAST y L2F6 fue extraído usando el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich). Cinco µg de ARN fueron retro-transcriptos utilizando 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) y 500 ng de primers oligo dT. Los ADNs complementarios fueron sujetos a la reacción de PCR en tiempo real en un aparato PCR in a Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, Agilent Technologies).

Cada 25 µl de volumen de reacción contenían 1 unidad en enzima Taq Platinum DNA Polimerasa (Invitrogen), 1X de buffer de reacción de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1X fluoróforo de referencia ROX, 1.5 mM Mg₂Cl₂, 2.5 mg BSA, 0.01% Glicerol, 200 mM of dNTPs, 0.3 X solución SYBR Green y 0.4 mM de primers específicos para SPARC, TGF-β, catepsina B, cadena α₂ del colágeno tipo I y HPRT (hipoxantina fosforibosil transferasa) como housekeeping (**Ver tabla 10**). Las condiciones de la reacción fueron seteadas de la siguiente manera: 90 segundos a 94 grados centígrados, 30 ciclos de 30 segundos a 94 grados centígrados, 30 segundos a 60 grados centígrados y 30 segundos a 72 grados centígrados. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicada y se estudiaron 3 réplicas biológicas de cada condición. Los resultados obtenidos para nuestros genes de interés fueron normalizados con los obtenidos para HPRT y expresados como fracción de los niveles de expresión de la línea control LBLAST que fue seteada como valor de referencia 1.0 para cada gen estudiado.

Gene	Sense sequence	Antisense sequence
SPARC	5' AACCGAAGAGGAGGTGGTG 3'	5' GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA 3'
HPRT	5' AGACTGAAGAGCTATTGTAAT 3'	5' CAGCAAGCTTGCGACCTTGAC 3'
Collagen I, α ₂ chain	5' AAGGTCATGCTGGTCTTGCT 3'	5' GACCCTGTTACCTTTTCCA 3'
TGFβ1	5' ACCAACTACTGCTTCAGCTC3'	5' TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG 3'
Cathepsin B	5' GGCCCCCTGCATCTATCG 3'	5' AGGTCTCCCGCTGTTCCACTG 3'

Tabla 10. Secuencia de los primers utilizados para la reacción de PCR en tiempo real.

Análisis del crecimiento tumoral *in vivo*

Ratones atímicos N:NIH(S)-nude mice de 8 a 10 semanas de edad, recibieron una inyección subcutánea de 5×10^6 células de melanoma (LBLAST, L2F6 o L3B9) en el costado izquierdo en un volumen total de 100 µl. Se estudiaron 6 ratones por tipo celular ensayado. Para los ensayos de inmunohistoquímica, se extrajo el tumor 24 hs post-inyección. Para determinar el crecimiento tumoral, se determinó el diámetro perpendicular para establecer el tamaño tumoral, de acuerdo a la ecuación $d1^2 \times d2/2$, donde d1 es el diámetro menor y d2 es el diámetro mayor. Los ratones fueron seguidos durante 2 meses o hasta que alcancen el tamaño tumoral de 2 cm³, momento en el cual fueron sacrificados de acuerdo a las normas aprobadas por las autoridades del NIH.

Ensayo de actividad enzimática de catepsina B

La actividad enzimática de catepsina B fue evaluada en medios condicionados frescos obtenidos de las células LBLAST y L2F6. Estas fueron plaqueadas a un 80% de subconfluencia en placas de 100 mM de diámetro, crecidas por 24 hs en medio suplementado con suero, lavadas 3 veces con PBS y mantenidas en medio libre suero por 24 hs adicionales. El medio condicionado colectado fue centrifugado para eliminar el debris celular y los sobrenadantes fueron concentrados 10 veces en Centriprep 3 (Millipore) en ausencia de inhibidores de proteasas. Para evaluar la actividad de catepsina B en esos medios, aplicamos el procedimiento experimental descrito por Hulkower et al (Hulkower et al., 2000). Resumidamente, 200 µl de medio concentrado de LBLAST o L2F6 o la misma cantidad de medio libre de suero (control) fueron incubados 30 minutos a 37 grados centígrados con 50 µl de formato de sodio 0,5M , 20 mM de EDTA, pH 3.2 y 0,2 mg/ml de pepsina. La actividad de catepsina B fue luego ensayada mediante el agregado de 250 µl de buffer fosfato de sodio 200 mM, pH 6,7 conteniendo 4 mM de EDTA, 10 mM de ditioneitol (DTT, 0,1% de Tritón y 200 µM del sustrato sintético específico para catepsina B, el Z-Arg-Arg-NHMec (Sigma) en concentración final de 100 µM pH 6.0. El inhibidor específico de catepsina B, el CA-074 (Peptide Institute Inc.), fue usado como inhibidor específico de la catepsina B secretada. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2. Los resultados fueron expresados como pmoles de producto fluorescente NH2Mec formado/segundo/µg de proteína total.

Crecimiento de las células sobre sustratos específicos

Para estudiar la influencia en el potencial invasivo del crecimiento de las células sobre una matriz de colágeno tipo I, las células LBLAST y L2F6 fueron crecidas durante 24 hs sobre placas sin cobertura y con cobertura de colágeno tipo I o fibronectina. La cobertura con colágeno monomérico tipo I (Sigma) o con fibronectina (BD Biosciences) se preparó durante una noche a 4 grados centígrados incubando las placas con solución de 5µg/cm² de colágeno tipo I o fibronectina. Al día siguiente, la matriz excedente se retiró y se dejaron secar las placas a temperatura ambiente. Este procedimiento no afectó la eficiencia de pegado de las células a las placas dado que mas del 90% de las células se pegó a los sustratos luego de 12 hs de incubación a 37 grados centígrados.

Citometría de flujo

Para los análisis por citometría de flujo las células LBLAST y L2F6 fueron crecidas durante 24 hs en presencia o ausencia de SPARC humana exógena en concentración 1 µg/ml. Las células fueron despegadas con EDTA 0,1 mM en PBS y lavadas con medio de cultivo a 4 grados centígrados.

Posteriormente, las células fueron mantenidas a 4 grados centígrados e incubadas 1 hora con 10% v/v de suero normal de cabra in PBA (PBS, 5 mg/ml BSA y 0,01% p/v de azida sódica) . Luego, se las incubó 30 minutos con 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti N-CAD (anti ACAM clon CG-4 Sigma) o 0,1 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti E-CAD (clon 180224, R&D Systems Inc). Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBA y se fijaron en 4% p/v de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de los lavados con PBA (PBS con 5% p/v de albúmina), las muestras se incubaron 30 minutos con 5µg/ml de anticuerpo IgG secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluoróforo FITC (Molecular Probes) diluido en PBA (2 µg/ml). Finalmente las células fueron lavadas 3 veces en PBS frío, resuspendidas en PBS, protegidas de la luz y sujetas a citometría de flujo en un citómetro FACStar Plus (Bd Biosciences). Para cada condición, 10000 células fueron analizadas.

Inmunohistoquímica

Se evaluaron cortes tumorales de 8 µm de espesor obtenidos de tumores de LBLAST y L2F6 luego de 24 hs de ser inyectados subcutáneamente en ratones nude. Estos cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados en gradiente de etanol. Para desenmascarar los antígenos, los cortes fueron inmersos en buffer citrato (pH=6) y hervidos dos veces en olla a presión en microondas durante 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada mediante incubación de los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados por incubación de los cortes en suero normal de cabra al 10% en volumen en PBS. El exceso de suero fue removido y se procedió a incubar los cortes durante toda la noche en cámara húmeda a 4 grados centígrados con diluciones 1: 50 en solución bloqueante de anticuerpos monoclonales anti-SPARC (R&D Systems), anti-vimentina (Chemicon) o anti-catepsina B (Santa Cruz Biotechnology). Luego, los vidrios donde se encontraban fijados los cortes fueron lavados 2 veces en PBS durante 10 minutos e incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de cabra anti ratón o cabra anti-conejo (Vector Laboratories), en dilución 1:400. Posteriormente se lavaron los cortes 2 veces con PBS por 5 minutos y se los incubó con el reactivo Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories), que se basa en un complejo streptavidina-peroxidasa, durante 45 minutos a temperatura ambiente.

El color de la reacción fue desarrollado mediante el agregado del sustrato específico de la peroxidasa, la diaminobencidina (Substrate Chromogen System, DakoCytomation). Finalmente las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina para poder evidenciar los núcleos, se deshidrataron y se montaron.

Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células CMV y 1D fueron plaqueadas en cubreobjetos de vidrio y crecidas como se describió anteriormente. Luego de 48 hs fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% p/v durante 10 minutos. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se bloquearon con suero de burro en PBS al 1% v/v durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron durante 1 noche con anticuerpo de conejo anti-NCAD (H-63, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50 en solución de bloqueo. Luego de este paso, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron por 2 hs con anticuerpo de burro anti-conejo conjugado con el fluoróforo Cy2 en una dilución 1: 200 en PBS (Jackson ImmunoResearch). Las muestras fueron lavadas con PBS-Tween 0,01% v/v y luego incubadas con colorante de Hoescht 33258 en PBS para teñir los núcleos. Luego del lavado, fueron montadas con Fluorsave (Calbiochem, EMD Biosciences) y evaluadas con un microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss).

Ensayo de invasión en Matrigel

Los ensayos de invasión en Matrigel de las células de melanoma *in vitro* fueron realizados en cámaras de quimiotaxis de 48 pocillos (NeuroProbe). Esta cámara posee dos compartimentos separados por una membrana con poros de 8µm de diámetro los cuales se encuentran ocluidos por incubación con Matrigel 0.5 mg/ml (Becton Dickinson) a 37 grados centígrados durante 60 minutos. La suspensión celular en ausencia o presencia del inhibidor específico de la catepsina B, el CA-074 (Peptide Institute Inc.), fue cargada en los pocillos del compartimento superior mientras que en el pocillo inferior se agregó medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino a modo de quimioattractante.

Luego de 5 hs las células que lograron invadir mediante la degradación proteolítica del Matrigel y que lograron pasar a través de los poros al otro lado de la membrana, fueron fijadas y teñidas con colorante de Hoescht 33258.

Se tomaron en el microscopio de fluorescencia BX-60 (Olympus), 2 imágenes representativas de cada pocillo que representaron el 70% de las células que forman parte del total de células que invadieron. Los núcleos presentes en estas imágenes digitales capturadas con un aumento total de 100 X fueron contabilizados automáticamente mediante la aplicación del programa CellProfiler (www.cellprofiler.com) (Carpenter et al., 2006).

En todos los experimentos se realizaron 3 réplicas técnicas y se analizaron al menos tres réplicas biológicas de cada condición estudiada. Las condiciones en estudio se describen a continuación.

Para los experimentos de bloqueo de integrinas, las células fueron levantadas con EDTA a partir de cultivos subconfluentes, se centrifugaron y resuspendieron en medio con suero conteniendo 4µg/100µl de anticuerpos bloqueantes anti-β1 integrina (Chemicon International) o anti- α2 integrina

(Chemicon International) o la combinación de ambos durante 30 minutos a 4 grados centígrados y luego plaqueada y cultivada por 24 hs. La viabilidad celular determinada por un ensayo de MTT en todas las condiciones ensayadas fue superior al 95% demostrando que los tratamientos no afectan sobrevida celular.

Para ensayos de bloqueo de TGF β 1 las células fueron previamente incubadas durante 24 hs con 2 μ g/ml de anticuerpo monoclonal anti-TGF β 1 (MAB2401, R&D Systems) o MOPC (Sigma) como control de isotipo IgG en igual concentración. Alternativamente se agregó el inhibidor del receptor de TGF β 1, el SB431542 en concentración 10 μ M o un volumen igual del vehículo DMSO.

Para ensayos de bloqueo de SPARC las células fueron previamente incubadas durante 24 hs con tres anticuerpos monoclonales anti SPARC, denominados MAb 293, MAb 303 y AON1 RB los cuales fueron agregados en conjunto a la suspensión celular en concentración 5 μ g/ml cada uno. El anticuerpo MOPC (Sigma) fue utilizado como control de isotipo IgG en igual concentración.

Para ensayos de reversión, se incubaron las células durante 24 hs, en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes mencionados, con proteína recombinante humana TGF- β 0,1ng/ μ l (PreproTech) o SPARC 1 μ g/ml obtenida como se describió anteriormente en "Purificación de SPARC humana a partir de medios condicionados".

Ensayo de migración transendotelial

Se plaquearon 2.5x10⁵ células endoteliales de microvasculatura de dermis humana (HMEC) en 200 μ l de medio DMEM sobre la parte superior de un inserto de cultivo con una membrana con poros de 8 μ m de diámetro (24-well format, Becton Dickinson) y se permitió que se establezcan como monocapa durante 24 hs en cultivo. Las células de melanoma LBLAST y L2F6 fueron marcadas con una eficiencia superior al 99% durante la noche a 37 grados centígrados con el colorante fluorescente CM-Dil en concentración 1 μ g/ml (Invitrogen). Luego fueron levantadas de la placa con tripsina y lavadas con PBS y resuspendidas finalmente en medio de cultivo libre de suero en concentración 2.8x10⁵ células/ml. Doseos μ l de esa suspensión celular, ya sea preincubadas con 1 μ g/ml de SPARC exógena o no, fueron adicionados sobre la monocapa de células endoteliales. Los insertos fueron luego plaqueados en placas multipocillos de 24, las cuales contenían en cada pocillo 400 μ l de medio DMEM 10% de SFB. Luego de 6 hs los co-cultivos fueron fijados y teñidos con Hoescht 33258.

El análisis cuantitativo de la trans migración se llevó a cabo usando el microscopio fluorescente BX-60 (Olympus). Para cada membrana de cada inserto, se tomó un set de 8 fotos de campos al azar de un total de 14 que componen a la membrana y se contó el número de células rojas (las células de melanoma) que transmigró en cada condición. Se observó que menos de un 10% de células

endoteliales transmigró en cada condición, no siendo este número diferencial en los distintos tratamientos.

Para los ensayos de inhibición, las células de melanoma fueron preincubadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo bloqueante anti-N-caderina GC4 (A-CAM, clon GC-4; Sigma) durante 30 minutos a 4 grados centígrados previo el agregado de las células sobre la monocapa de HDMEC. El mismo procedimiento se realizó para los anticuerpos bloqueantes anti $\beta 1$ o $\alpha 2$ integrina o anti-TGF $\beta 1$ o el control de isotipo IgG MOPC. Luego de la incubación, se obtuvieron las células de melanoma y se llevó a cabo el experimento de trans migración endotelial en presencia o ausencia del inhibidor específico de catepsina B, el CA-074 en concentración 10 μM .

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron de acuerdo al tipo de variable en estudio en cada experimento.

Para el caso de variables continuas, se realizó un análisis de varianza a una cola (one-way ANOVA) para determinar las diferencias estadísticamente significativas ante múltiples condiciones.

El test T de Student fue aplicado solamente para calcular la significancia estadística cuando sólo fueron comparadas dos condiciones.

En el caso de los ensayos de invasión en matrigel y ensayos de migración transendotelial, la variable observada (número de células que invaden/migran) en las diferentes condiciones experimentales es discreta (conteos). Cuando la variable observada es de este tipo, no es posible aplicar metodos tipo ANOVA o modelos lineales ya que estos son válidos bajo un contexto de variables "normales" o "gaussianas". Sin embargo, dado que los valores de células que invaden/migran son grandes, es posible aproximar la variable observada a una variable continua "normal" mediante la aplicación de la transformación logaritmo. Una vez transformada la variable de conteo, se aplicaron modelos lineales o lineales mixtos (West BT., 2007) según correspondiese (en función de si se observaban heteroscedasticidad o no). Dado que es de interés encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de los tratamientos y/o sus interacciones, sobre cada factor (y/o su interacción) se estimaron las diferencias de medias mediante el método de mínimos cuadrados y sus valores "p" asociados. Sobre estos últimos, se realizaron ajustes mediante el método de Benjamini & Hochberg (Benjamini et al., 2001) para controlar la tasa de falsas detecciones (del ingles "false discovery rate") cuandos se realizan comparaciones múltiples. Para simplificar la visualización de los efectos experimentales, las figuras se graficaron como porcentaje de células que invadieron tomando siempre al valor de la línea control LBLAST como el 100/ .

ANEXO I

Proteínas diferenciales obtenidas por análisis proteómico por metodología DIGE.

PROTEINAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE EN EL SECRETOMA

Proteínas disminuidas en su expresión en L2F6

Nro	Nro	Nro acceso	Nombre de la	Valor P (T-test)	Relación	MASCOT	ion	PM (Da)	pl	/
spot	exp.	NCBI	proteína	DeCyder	LBLAS/L2F6	score	score	teórico	teórico	Coverage
1175	2	16307393	Cathepsin B, preproprotein	2,4E-02	-2,3	106	N	38766	5,9	25
1382	1	16307393	Cathepsin B, preproprotein	2,6E-02	-2,2	91	N	38766	5,9	22
1151	2	16307393	Cathepsin B, preproprotein	5,1E-03	-2,2	123	N	38766	5,9	30
1346	1	16307393	Cathepsin B, preproprotein	2,2E-02	-2,1	87	N	38766	5,9	22
1162	2	16307393	Cathepsin B, preproprotein	4,8E-03	-2,1	135	N	38766	5,9	34
1046	2	16307393	Cathepsin B, preproprotein	1,4E-02	-2,0	172	63	38766	5,9	20
1090	2	16307393	Cathepsin B, preproprotein	2,5E-03	-1,9	175	N	38766	5,9	20
1370	1	16307393	Cathepsin B, preproprotein	1,2E-02	-2,2	87	N	38766	5,9	22
1227	2	15214962	cathepsin L , preproprotein	8,0E-04	-2,7	90	50	37996	5,3	9
1449	1	4503155	Cathepsin L, preproprotein	1,1E-04	-2,2	252	98	37996	5,3	27
1217	2	22538442	Cathepsin X, preproprotein	2,8E-04	-1,9	121	N	33366	6,1	25
1238	2	3719219	Cathepsin X, preproprotein	2,8E-02	-1,6	75	27	33366	6,1	13
779	2	21361657	Chain A, TapasinERP57 HETERODIMER	3,2E-02	-2,0	154	16	54541	5,6	27
1233	2	55956899	Cytokeratin 9	1,0E-03	-3,2	114	85	62320	5,2	7
1219	1	56410847	GDP dissociation inhibitor 2	1,4E-02	-1,5	98	N	46046	5,9	25
1163	2	12654615	Hsp40	5,3E-03	-1,5	90	N	40774	5,8	7
1734	1	62896777	lectin, mannose-binding 2 variant	2,3E-05	-2,1	112	N	40564	6,6	18

1704	1	11596467	MHC class I antigen	8,9E-03	-4,5	115	N	31776	5,6	35
2550	1	253483	N-cadherin	4,7E-03	-3,7	134	73	100132	4,6	6
2293	2	62896507	Niemann-Pick disease, type C2 precursor variant	2,0E-02	-2,2	113	N	16916	7,6	30
1190	1	3135316	PCOLCE (procollagen C-endopeptidase enhancer)	9,2E-04	-1,9	129	N	48797	7,4	25
916	2	21619971	PCOLCE (procollagen C-endopeptidase enhancer)	2,2E-03	-1,8	138	N	48797	7,4	23
902	2	6919941	PCOLCE (procollagen C-endopeptidase enhancer)	3,4E-02	-1,8	86	34	48797	7,4	17
1183	1	3135316	PCOLCE (procollagen C-endopeptidase enhancer)	1,3E-02	-1,6	109	N	48797	7,4	22
1885	2	5453549	peroxiredoxin 4	8,3E-04	-2,8	119	63	30749	5,9	12
970	1	4758412	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	3,5E-02	-1,7	96	N	65433	8,6	14
2118	1	29126971	Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 2	6,1E-03	1,5	115	N	25996	6,9	29
2265	1	3334194	Protein FAM3C precursor	3,3E-02	-2,5	129	48	24950	8,5	25
1288	1	54311156	Renin	2,0E-02	-3,0	108	N	45097	7,6	14
1316	1	54311156	Renin	4,2E-02	-2,9	75	N	45097	7,6	9
1052	2	337347	Renin	1,2E-02	-4,0	166	N	45097	7,6	25
1064	2	337347	Renin	1,1E-03	-3,6	158	N	37000	5,1	28
1034	2	337347	Renin	1,0E-02	-2,8	164	22	45097	7,6	11
1053	2	337347	Renin	6,5E-03	-2,8	140	N	45097	7,6	28
1056	2	337347	Renin	2,8E-02	-2,7	134	N	45097	7,6	30
1148	2	4507171	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (SPARC)	1,9E-02	-3,5	158	N	35465	4,5	17
1028	2	20139982	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	5,0E-02	-1,6	98	N	41329	6,6	14
1204	1	27769056	SERPINE2 protein (PAI-1)	2,1E-02	-1,9	99	N	44200	9,4	18
1239	1	27769056	SERPINE2 protein (PAI-1)	1,4E-02	-1,6	82	N	44200	9,4	18
1657	2	553801	Thrombospondin 1 chain A	1,1E-03	-2,9	111	N	22972	7,0	41
1645	2	553801	Thrombospondin 1 chain A	2,9E-02	-2,1	130	N	22972	7,0	42
1699	2	553801	Thrombospondin 1 chain A	3,3E-02	-1,8	114	N	27858	5,2	34
1744	1	553801	Thrombospondin 1 chain A	7,9E-03	-1,8	145	74	22972	7,0	19
1630	2	553801	Thrombospondin 1 chain A	1,1E-02	-1,7	139	N	22972	7,0	33
1567	2	553801	Thrombospondin 1, chain A	1,2E-02	-2,6	100	42	22972	7,0	19
1805	1	553801	Thrombospondin chain A	1,1E-02	-3,6	191	N	22972	7,0	40

1833	1	61620560	TIMP-1	9,1E-03	-1,7	97	N	16560	8,8	34
1865	1	61620560	TIMP-1	8,2E-03	-1,7	94	N	16560	8,8	29
1801	1	61620560	TIMP-1	3,0E-03	-2,3	107	48	21293	8,8	25
987	2	12654931	TXNDC5 protein/protein disulfide isomerase family a, member 6	4,9E-02	-1,6	112	75	36725	5,3	12
1764	1	1418930	Type I collagen alpha 2 chain	1,9E-03	-4,3	117	73	37887	6,1	20
1532	2	32451581	Type I collagen alpha 2 chain	6,1E-03	-4,1	93	79	20373	5,5	7
1592	2	32451581	Type I collagen alpha 2 chain	2,4E-02	-3,5	103	89	20373	5,5	7
1828	1	85687376	type V collagen preproprotein, alpha 1	4,7E-02	-2,3	70	44	184131	4,9	3
1114	2	47115317	vimentin	4,1E-02	-1,9	114	N	53619	4,8	26

Proteínas aumentadas en su expresión en L2F6

1834	2	68085578	14-3-3 Protein	3,9E-02	2,1	143	N	29413	5,0	37
1802	2	68085578	14-3-3 Protein	1,6E-03	2,7	147	77	29413	5,0	21
1884	2	5803227	14-3-3 Protein Theta chain A	1,2E-02	2,7	175	112	29408	5,2	17
2465	1	4557251	ADAM 10	1,7E-02	2,7	100	40	58773	6,8	9
1351	1	1353386	adenosine kinase	3,9E-03	2,2	127	N	37887	6,1	23
1955	1	56208541	calyculin binding protein isoform 2	1,6E-02	1,9	92	N	21329	7,7	40
1457	1	12653873	Capping protein (actin filament), gelsolin-like	7,0E-03	1,9	154	70	38779	5,9	26
1735	2	55961619	chloride intracellular channel 1	1,4E-02	2,8	75	30	27248	5,1	10
1676	2	55961619	chloride intracellular channel 1	4,7E-04	3,4	98	45	27248	5,1	17
1736	2	55961619	chloride intracellular channel 1	6,9E-04	4,0	112	N	27248	5,1	31
1827	1	55961619	chloride intracellular channel 1	1,1E-02	2,9	110	N	27248	5,1	30
1781	2	15214636	Chloride intracellular channel 4	2,8E-03	2,3	133	96	28982	5,5	14
1922	1	15214636	chloride intracellular channel 4	2,4E-02	1,9	129	N	28982	5,5	37
1916	1	15214636	chloride intracellular channel 4	1,6E-03	2,1	124	53	28982	5,5	20
2590	1	27695621	Coactosin-Like Protein	4,3E-03	1,9	90	51	16049	5,5	26
2340	1	15147369	Cofilin 1 (non-muscle)	3,7E-03	2,9	131	59	15877	8,5	32
2403	1	15147369	Cofilin 1 (non-muscle)	1,6E-02	3,2	78	60	18719	8,2	18

2388	1	15147369	Cofilin 1 (non-muscle)	1,3E-02	3,6	131	59	15877	8,5	32
1945	1	1199487	collagen binding protein 2	7,4E-03	1,8	94	60	46620	8,9	8
2409	1	1237406	Cu/Zn-superoxide dismutase/SOD 1	7,5E-03	1,9	131	N	16023	5,7	37
2279	2	1237406	Cu-Zn Human Superoxide Dismutase/SOD 1	2,3E-02	1,6	152	152	16096	5,9	48
2498	1	51895760	Cyclophilin A (peptidyl-prolyl isomerase A)	7,8E-03	2,6	108	57	18098	7,8	27
2051	2	31543380	Dj-1, chain A	3,5E-02	1,7	108	N	20063	6,3	47
2049	2	31543380	Dj-1, chain A	5,0E-02	2,0	110	N	20063	6,3	37
1510	2	38566211	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta, isoform 2	2,9E-02	2,0	133	72	31217	4,9	25
1506	2	38566211	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta, isoform 2	5,1E-04	2,2	104	26	31217	4,9	20
2311	2	453133	eukaryotic translation initiation factor 5A	1,5E-02	2,5	171	55	17049	5,1	31
1280	1	55961217	fumarate hydratase precursor	2,5E-02	2,1	209	122	54773	8,9	20
2528	2	4504981	Galectin-1	7,1E-03	1,8	312	104	15048	5,3	57
2036	2	4504183	Glutathione Transferase P1-1, chain A	4,8E-03	1,9	107	N	23394	5,7	36
2022	2	2204207	Glutathione Transferase, chain A	2,7E-02	1,7	175	78	23394	5,7	36
1970	2	47496673	Growth factor receptor bound protein 2	5,1E-03	2,0	96	N	25304	5,9	27
1430	1	23879	MAPK- 40kDa protein kinase	4,9E-03	1,9	137	N	40794	6,7	28
1652	1	12804929	Mitochondrial malate dehydrogenase, precursor	2,4E-02	1,9	191	N	35965	8,9	35
2246	1	134665	Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase/SOD2	1,5E-02	1,9	100	38	22288	6,9	21
2618	1	417811	Mitochondrial Single Strand Dna Binding Protein	1,1E-03	2,5	100	17	15186	8,2	40
1352	1	3641398	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	9,4E-03	1,9	168	N	46944	6,3	33
2229	1	913159	neuropolypeptide h3 or prostatic binding protein	4,7E-04	2,3	144	N	21027	7,4	43
2451	1	66392203	NME1-NME2 protein	6,2E-03	2,6	112	88	32906	8,7	7
2254	2	4557797	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in isoform b	5,2E-03	2,0	118	N	17309	5,8	42
2415	1	4557797	non-metastatic cells nucleoside-diphosphate kinase 1	9,6E-04	2,6	156	N	17309	5,8	68
1689	2	37594464	nudix hydrolase NUDT5	3,7E-02	1,5	88	N	24597	4,9	13
1897	2	3122258	p27BBP protein/eukaryotic initiation factor 6	3,8E-02	2,1	125	80	26845	4,6	15
2491	1	51895760	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	2,3E-03	2,9	191	97	18229	7,7	46
2242	1	18204954	peroxiredoxin 1	4,4E-03	2,6	96	N	22324	8,3	45
1742	1	5453908	phosphatidylinositol transfer protein, alpha	2,1E-02	1,9	90	N	32014	6,1	23

1238	1	12653201	Phosphogluconate dehydrogenase	1,5E-03	1,8	176	118	53619	6,8	14
1243	1	5453842	proliferation-associated 2G4, 38kDa	5,8E-03	1,6	118	N	44101	6,1	26
1917	1	13528948	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	7,3E-04	2,8	80	N	27858	5,2	23
1933	1	4506203	proteasome beta 7 subunit proprotein	1,8E-02	1,5	73	N	27978	7,1	14
1951	1	55977294	proteasome beta 7 subunit proprotein	4,1E-03	1,9	96	22	25592	5,8	14
1537	2	85397510	pyrophosphatase 1	2,0E-03	1,8	97	79	33095	5,5	3
1711	1	38181963	Pyrophosphatase 1	7,4E-03	2,2	95	N	33095	5,5	24
1709	1	38181963	Pyrophosphatase 1	1,5E-02	1,7	72	N	33095	5,5	15
1009	1	31416989	pyruvate kinase, muscle	7,4E-03	2,1	149	N	60277	8,2	23
1874	2	76780069	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	2,0E-03	2,3	107	N	23250	5,0	29
1756	1	55749504	syntenin isoform 2	6,2E-03	1,8	98	N	31913	7,1	19
2011	2	4507511	TIMP-2	7,8E-03	1,7	180	125	21363	8,0	12
2026	2	4507511	TIMP-2	6,7E-03	1,5	222	129	24879	7,5	22
1545	1	48257056	Transaldolase 1	2,3E-03	1,7	111	58	37556	6,4	18
2079	1	12653131	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	9,8E-04	3,0	176	N	25151	5,3	52
2076	1	21361091	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	9,4E-03	2,2	130	69	24850	5,2	15
1953	2	21361091	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	2,6E-02	2,5	105	86	23354	5,3	8
2510	1	56203164	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	1,9E-03	2,1	112	51	11948	9,2	61
2558	1	80479362	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	7,6E-03	2,4	109	71	17184	6,1	19
2422	2	80479362	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	4,7E-03	2,1	131	93	17184	6,1	19

PROTEINAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE EN EXTRACTOS CELULARES

Proteínas disminuidas en su expresión en L2F6

1243	3	693933	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase; carbonate dehydratase	3,0E-06	-1,8	517	276	47421	7,0	42
1585	3	74741321	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	1,4E-07	-1,9	231	153	41838	6,5	14
1047	3	5453595	adenyl cyclase-associated protein	2,0E-09	-1,9	171	96	51926	8,1	16
1769	3	4502049	aldo-keto reductase family 1, member b1 (aldose reductase)	1,6E-09	-2,8	642	452	36099	6,6	35
1763	3	4757756	annexin A2 isoform 2	2,6E-10	-1,8	141	N	38808	7,6	33
1730	3	4757756	annexin A2 isoform 2	3,3E-08	-1,6	136	N	38808	7,6	28

1749	3	4757756	annexin A2, isoform CRA_c	1,6E-04	-1,6	96	65	32600	5,9	6
1696	3	4502101	annexin I	9,4E-06	-1,6	160	N	38918	6,6	29
775	3	4758762	asparaginyl-tRNA synthetase, isoform CRA_b	1,0E-07	-1,6	200	99	63687	5,9	16
501	3	179830	caldesmon	4,8E-08	-1,8	247	112	62715	6,2	27
497	3	44680105	caldesmon 1 isoform 1	7,5E-07	-1,9	170	67	93232	5,6	15
513	3	15149465	caldesmon 1 isoform 5	4,0E-07	-1,5	223	95	61233	6,4	32
1834	3	4758018	calponin 2, isoform CRA_e	2,2E-08	-1,6	130	52	31829	7,6	18
1036	3	5453595	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast), isoform CRA_b	3,7E-09	-1,7	98	64	51357	7,6	7
2032	3	14251209	chloride intracellular channel 1	1,4E-06	-1,7	102	48	27248	5,1	10
1988	3	14251209	chloride intracellular channel 1	2,8E-08	-1,7	392	180	27248	5,1	62
1199	3	4557491	cleavage stimulation factor subunit 1	2,4E-05	-1,8	270	109	49125	6,1	29
1061	3	8922699	CNDP dipeptidase 2	1,2E-09	-2,2	271	81	53088	5,6	21
1226	3	4557499	C-terminal binding protein 2 isoform 1	1,9E-05	-1,7	122	64	49427	6,5	8
1090	3	181573	cytokeratin 8	2,2E-08	-2,2	239	N	53529	5,5	30
1083	3	181573	cytokeratin 8	9,3E-06	-1,5	224	N	53529	5,5	37
789	3	4503377	dihydropyrimidinase-like 2	1,6E-11	-1,8	191	N	62711	6,0	26
2079	3	55274010	ENC-1AS [Homo sapiens]/hexosaminidase B	1,6E-08	-1,6	103	71	38519	6,0	6
1187	3	693933	enolase 1	2,1E-05	-1,9	241	102	47421	7,0	32
1236	3	4503571	enolase 1	1,2E-05	-1,8	119	N	47481	7,0	24
1223	3	4503571	enolase 1	4,0E-09	-1,8	212	59	47481	7,0	28
1860	3	33413400	esterase D/formylglutathione hydrolase, isoform CRA_a	8,8E-05	-1,5	181	76	29161	6,6	23
508	3	21614499	ezrin	7,4E-09	-1,6	482	209	69484	5,9	38
1904	3	4826659	F-actin capping protein beta subunit	5,0E-07	-1,6	207	N	30952	5,7	46
1531	3	4557305	fructose-bisphosphate aldolase A	1,9E-08	-2,0	219	65	39851	8,3	30
1459	3	4557587	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	6,4E-08	-1,8	129	92	46743	6,5	5
1420	3	178045	gamma-actin	3,7E-06	-1,7	109	71	26147	5,7	11
1041	3	17380385	Glucose-6-Phosphate Isomerase	4,5E-08	-1,7	148	105	63336	7,8	6
1042	3	17380385	Glucose-6-Phosphate Isomerase	2,5E-07	-1,7	120	64	63336	7,8	7
1764	3	7669492	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,3E-06	-1,9	208	86	36201	8,6	23

551	3	600727	glycyl-tRNA synthetase	3,9E-07	-1,5	112	N	78166	5,9	13
569	3	386758	GRP78 precursor/heat shock 70kda protein 5	1,5E-06	-1,8	608	407	72185	5,0	26
2133	3	4504517	heat shock protein beta-1	1,3E-06	-2,5	170	78	22826	6,0	32
2148	3	4504517	heat shock protein beta-1	1,5E-09	-1,7	420	218	22826	6,0	48
1064	3	6996014	histidyl-tRNA synthetase, isoform CRA_a	1,2E-07	-1,7	131	64	50162	5,3	12
2150	3	6225527	isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	1,4E-09	-1,8	113	81	26776	5,9	9
762	3	11935049	keratin 1	1,6E-09	-2,1	111	N	66170	8,2	22
1987	3	11935049	keratin 1	2,6E-07	-1,7	105	N	66170	8,2	22
202	3	11935049	keratin 1	4,0E-03	-1,6	103	N	66198	8,2	20
294	3	4959425	lysyl oxidase-like protein 2	2,9E-04	-1,5	161	102	72708	6,3	9
1314	3	20127486	mannose 6 phosphate receptor binding protein 1	5,9E-06	-1,5	318	189	47189	5,3	25
1936	3	70995422	NAD(P)H menadione oxidoreductase 1, dioxin-inducible isoform c	4,3E-07	-2,0	145	61	26406	8,8	15
1261	3	930063	neurone-specific enolase	3,6E-07	-2,4	137	N	47467	4,9	22
1084	3	5031977	nicotinamide phosphoribosyltransferase precursor	1,3E-09	-1,8	99	70	55772	6,7	3
2231	3	32483377	peroxiredoxin 3	4,5E-06	-1,6	129	80	11158	6,1	24
2153	3	4758638	peroxiredoxin 6	9,2E-08	-2,1	251	77	25133	6,0	38
2100	3	4505753	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	4,4E-05	-1,6	130	72	22822	5,8	19
1087	3	16877641	Proline-rich coiled-coil 1	2,3E-08	-2,4	134	104	46598	5,6	6
849	3	63252888	prolyl 4-hydroxylase, alpha I subunit isoform 2 precursor	1,6E-07	-1,7	182	85	61296	5,7	20
2021	3	5453990	proteasome activator subunit 1 isoform 1	4,2E-10	-2,0	179	70	28876	5,8	28
833	3	57863257	T-complex protein 1 isoform a	5,1E-11	-2,4	164	68	60819	5,8	12
2324	3	55960374	transgelin 2	3,8E-08	-1,6	508	207	21244	7,6	65
1523	3	55960374	transgelin 2	2,6E-06	-1,5	473	254	21244	7,6	63
473	3	39777597	transglutaminase 2 isoform a	8,6E-07	-2,6	465	205	78420	5,1	39
2172	3	4507645	triosephosphate isomerase 1	5,9E-08	-1,7	685	349	26938	6,5	75
2273	3	1617118	TSA /peroxiredoxin 2	1,5E-05	-2,4	172	78	18486	5,2	28
2186	3	4185720	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	5,3E-09	-2,0	249	101	23354	5,3	44
1012	3	19913428	vacuolar H+ATPase B2	1,5E-05	-1,6	129	N	56807	5,6	19

Proteínas aumentadas en su expresión en L2F6

664	3	4503841	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit	5,7E-07	1,5	194	77	70084	6,2	16
1340	3	6912240	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	1,4E-07	1,9	131	75	47251	6,5	9
677	3	4501993	alkylglycerone phosphate synthase	3,5E-05	1,6	214	N	60803	6,0	29
341	3	2804273	alpha actinin 4	9,6E-07	1,7	203	127	102661	5,3	8
414	3	10863945	ATP-dependent DNA helicase II	6,8E-09	2,3	307	102	83222	5,6	25
670	3	4503841	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit	1,7E-08	1,9	194	89	70084	6,2	17
2233	3	4757834	BCL2-associated athanogene 2	1,6E-08	2,1	180	103	23928	6,3	19
347	3	21361370	brain glycogen phosphorylase	1,3E-06	1,7	91	51	97319	6,4	3
887	3	31542947	chaperonin	3,8E-09	1,7	401	242	61187	5,7	23
855	3	31542947	chaperonin	5,7E-08	1,9	134	104	39434	6,7	7
881	3	31542947	chaperonin	4,1E-05	1,7	686	430	61187	5,7	36
853	3	4502643	chaperonin subunit 6A	1,5E-05	1,5	167	107	54103	5,8	11
1396	3	38327625	citrate synthase precursor	2,5E-09	1,8	145	N	51908	8,5	19
716	3	14149734	coronin, actin binding protein, 1b	1,6E-05	1,6	149	35	54755	5,7	12
1157	3	12654373	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	2,1E-05	2,1	207	85	44807	6,5	18
583	3	87196351	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3	7,9E-08	1,7	122	73	73597	6,7	5
2295	3	55960004	dynactin 3 (p22)	6,3E-03	1,6	108	85	11875	9,8	8
2096	3	1922287	enoyl-CoA hydratase	1,0E-07	1,5	190	102	31807	8,3	19
1288	3	39644794	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	3,8E-07	2,6	202	75	44869	6,1	25
330	3	4503483	eukaryotic translation elongation factor 2	1,3E-06	1,6	378	155	96246	6,4	25
343	3	4503483	eukaryotic translation elongation factor 2	9,6E-07	1,7	410	177	96246	6,4	25
1117	3	4507115	fascin 1	4,2E-05	1,5	221	52	55123	6,8	26
1104	3	4885281	glutamate dehydrogenase 1	3,8E-05	1,6	463	148	61701	7,7	45
2249	3	4504183	Glutathione S-transferase PI	1,1E-03	1,7	164	65	23394	5,7	35
1128	3	517196	G-rich RNA sequence binding factor 1 isoform 2	1,9E-03	1,5	137	58	36761	5,5	15
880	3	31542947	heat shock 60kda protein 1 (chaperonin)	3,5E-07	2,4	241	107	60813	5,8	20
585	3	24234688	heat shock 70kDa protein 9 precursor	3,0E-05	1,7	486	280	73920	5,9	30
1125	3	5031753	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	4,6E-07	1,6	191	N	49484	5,9	33

800	3	11527777	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I	6,6E-09	1,7	233	N	62515	7,1	34
824	3	55958544	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1,0E-04	1,5	206	63	47756	5,5	25
813	3	11527777	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, isoform CRA_a	8,7E-11	1,6	166	N	60693	6,8	25
814	3	11527777	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, isoform CRA_a	4,0E-09	2,7	167	N	60693	6,8	29
1377	3	62898213	interleukin enhancer binding factor 2 variant	4,3E-04	1,7	114	63	43249	5,2	9
1812	3	11935049	keratin 1	4,7E-07	2,4	109	N	66198	8,2	15
1640	3	11935049	keratin 1	1,0E-12	1,6	71	N	66198	8,2	10
2189	3	11935049	keratin 1	5,1E-03	2,1	77	N	66198	8,2	11
1343	3	21961605	Keratin 10	2,4E-09	1,8	76	N	59020	5,1	10
687	3	5031877	lamin B1	5,5E-05	1,5	509	180	66653	5,1	45
200	3	7678804	mitochondrial isoleucine tRNA synthetase	4,9E-06	1,8	134	51	112699	6,4	8
1576	3	2737886	NAD+-specific isocitrate dehydrogenase beta precursor	9,6E-07	1,6	162	76	42470	8,6	13
45	3	39645205	NOMO3 protein	6,5E-06	1,6	83	71	90388	5,5	1
1361	3	833999	P43	6,9E-08	1,8	183	N	49844	7,7	32
432	3	55666250	phosphofructokinase, platelet	2,0E-07	1,8	146	N	86516	8,9	12
591	3	14530105	septin 9	5,7E-11	1,7	160	74	64926	7,2	12
1173	3	19923315	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	2,7E-10	1,7	163	N	56414	8,8	25
187	3	77404397	staphylococcal nuclease domain containing 1, isoform CRA_a	5,3E-07	1,6	110	49	59542	5,7	9
1501	3	7305503	stomatatin (EPB72)-like 2	1,0E-12	1,6	193	97	38624	6,9	21
766	3	5803181	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	4,0E-06	1,7	167	81	63227	6,4	17
942	3	3820535	thioredoxin reductase 1	2,0E-05	1,6	163	53	57918	6,1	15
379	3	23241743	Transducin (beta)-like 3	2,6E-06	1,6	207	94	90248	6,4	13
1250	3	46593007	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	6,0E-06	1,7	147	91	53297	5,9	9
124	3	62897997	vacuolar protein sorting 35 (yeast), isoform CRA_b	1,6E-04	1,5	230	82	89150	5,4	14

ANEXO II

REACTIVOS UTILIZADOS EN PROTEÓMICA

Solución de lisis 1.2 x (BL)		1x
Urea	10.1g	7M
Tiourea	3.66g	2M
CHAPS	1g	4/
TCEP-HCl*	400 µl 0.1M stock	2mM
Agua MilliQ	c.s.p. 20 ml	

Añadir IPGbuffer 3-10 1/ antes de usar

*TCEP-HCl 0.1M stock 53.7mg en 2 ml agua milliQ

Solución de rehidratación (BR)

Urea	10.5g
Tiourea	3.75
CHAPS	0.5g
Pizca de azul de bromofenol	
Agua MilliQ	c.s.p. 25 ml

Se agrega IPGbuffer 0.5/ (5 µl/ml) antes de usar (del pH correspondiente a la tira a utilizar) y DTT (50 mM (7.7 mg/ml)).

Solución de equilibración (BE)		1x
Tris-HCl (4x resolving buffer)	10 ml	50 mM
Urea	72.07 g	6M
Glicerol 87/ v/v	69 ml	30/ v/v
SDS	4 g	2/
Pizca de azul de bromofenol		
Agua MilliQ	c.s.p. 200 ml	

Se agrega DTT (1/ p/v) o IAA (4/ p/v) antes de usar

Cocktail inhibidores de proteasas (concentraciones finales)

Soluciones stock 100 X:

Aprotinin	0.1 ug/ml (soluble en agua)
PMSF	20 ug/ml (soluble en isopropanol)
E-64	0.5 ug/ml (soluble en agua:etanol 1:1)
Bestatin	40 ug/ml (soluble en metanol)
(Pepstatin)	0.7 ug/ml (soluble en metanol)
(EDTA)	0.5-1 mM (soluble en agua a pH 8-9)

Solución de acrilamida

Acrilamida	30/ p/v	60 g
N-N'metilenbisacrilamida	0,8/ p/v	1,6 g
Agua bidestilada	200 ml	

Resolving Buffer

Tris	1,5 M	181,7 g
Agua bidestilada	750 ml	
HCl	ajustar a pH 8,8	
Agua bidestilada	llevar a 1 L	

SDS 10/

SDS	10/ p/v	5,0 g
Agua bidestilada	50 ml	

Buffer de electroforesis 1X

Tris	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144 g
SDS	0,1/ p/v	10g
Agua bidestilada	10L	

Persulfato de amonio

Persulfato de amonio	10/ p/v	0,1 g
Agua bidestilada	1ml	

SOLUCIONES UTILIZADAS EN CULTIVO CELULAR

Medio de Cultivo MEL c/hepes:(2 l)

- DMEM/F-12=24 g
- HEPES= 15mM (es decir 7.149 g)
- NaHCO₃= 4.88g
- acido ascórbico= 35.2 mg
- galactosa= 600 mg
- glutamina= 584 mg
- estreptomycin= 265 mg y penicilina= 127 mg (o 20 ml de P/E 100x)
- insulina 2000x (cc 10mg/ml)= 1ml

Medio de Cultivo MEL s/hepes (2l)

- DMEM/F-12= 24 g
- NaHCO₃= 4.88g
- acido ascórbico= 35.2 mg
- galactosa= 600 mg
- glutamina= 584 mg
- estreptomycin= 265 mg y penicilina= 127 mg (o 20 ml de P/E 100x)
- insulina 2000x (cc 10mg/ml)= 1ml

ANEXO III

Referencias bibliográficas correspondientes a las Tablas 5 y 6.

1. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
2. Liotta, L. A. and Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411, 375-379.
3. Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesion activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*, 107 (7), 785-790.
4. Bornstein, P. (2002). Cell-matrix interactions: the view from the outside. *Methods Cell Biol*, 69, 7-11.
5. Sage, E. H. (2001). Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a comMand performance on several stages. *J Clin Invest*, 107 (7), 781-783.
6. Rosenblatt, S., Bassuk, J. A., Alpers, C. E., Sage, E. H., Timpl, R. and Preissner, K. T. (1997). Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC). *Biochem J*, 324, 311-319.
7. Xie, R. L. and Long, G. L. (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. *J Biol Chem*, 270 (39), 23212-23217.
8. Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Gohring, W., Timpl, R. and 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. *J Mol Biol*, 253 (2), 347-357.
9. Raines, E. W., Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Ross, R. and Sage, E. H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1281-1285.
10. Hasselaar, P. and Sage, E. H. (1992). SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*, 49, 272-283.
11. Tremble, P. M., Lane, T. F., Sage, E. H. and 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. *J Cell Biol*, 121 (6), 1433-1444.
12. Ledda, M. F., Adris, S., Bravo, A. I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., et al. (1997). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med*, 3 (2), 171-175.
13. Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L. and Sage, E. H. (1992). Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro, changes in fibronectin, thrombospondin-1 and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem*, 267 (23), 16736-16745.
14. Gilles, C., Bassuk, J. A., Pulyaeva, H., Sage, E. H., Foidart, J.-M. and Thompson, E. W. (1998). SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 58 (23), 5529-5536.
15. Murphy-Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A. and Sage, E. H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca²⁺ binding EF-hand. *J Cell Biochem*, 57, 341-350.
16. Brekken, R. A. and Sage, E. H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol*, 19 (7), 569-580.
17. Bradshaw, A. D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C. and Sage, E. H. (1999). Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell*, 10 (5), 1569-1579.
18. Ledda, M. F., Bravo, A. I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J. and Podhajcer, O. L. (1997). The expression on the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol*, 108 (2), 210-214.
19. Rumpler, G., Becker, B., Hafner, C., McClelland, M., Stolz, W., Landthaler, M., et al. (2003). Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol*, 12 (6), 761-771.

20. Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Reali, U. M. and Santucci, M. (1999). Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol*, 30 (3), 339-344.
21. Ikuta, Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., et al. (2005). Highly Sensitive Detection of Melanoma at an Early Stage Based on the Increased Serum Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine and Glypican-3 Levels. *Clin Cancer Res*, 11 (22), 8079-8088.
22. Sosa, M. S., Girotti, M. R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J. A., Gallango, S. J., et al. (2007). Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics*, 7 (22), 4123-4134.
23. Smit, D. J., Gardiner, B. B. and Sturm, R. A. (2007). Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer*, 121 (12), 2653-2660.
24. Porter, P. L., Sage, E. H., Lane, T. F., Funk, S. E. and Gown, A. M. (1995). Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem*, 43 (8), 791-800.
25. Bellahcene, A. and Castronovo, V. (1995). Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol*, 146 (1), 95-100.
26. Podhajcer, O. L., Wolf, C., Lefebvre, O., Segain, J. P., Rouyer, N., Stoll, I., et al. (1996). Comparative expression of the SPARC and stromelysin-3 genes in mammary tumors. *The Breast*, 5, 13-20.
27. Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., et al. (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res*, 64 (9), 3037-3045.
28. Lien, H. C., Hsiao, Y. H., Lin, Y. S., Yao, Y. T., Juan, H. F., Kuo, W. H., et al. (2007). Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 26 (57), 7859-7871.
29. Barth, P. J., Moll, R. and Ramaswamy, A. (2005). Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch*, 446 (5), 532-536.
30. Parker, B. S., Argani, P., Cook, B. P., Liangfeng, H., Chartrand, S. D., Zhang, M., et al. (2004). Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, 64 (21), 7857-7866.
31. Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., Hempen, P. M., Jones, J. and Kern, S. E. (2002). The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res*, 62 (18), 5351-5357.
32. Graham, J. D., Balleine, R. L., Milliken, J. S., Bilous, A. M. and Clarke, C. L. (1997). Expression of osteonectin mRNA in human breast tumours is inversely correlated with oestrogen receptor content. *Eur J Cancer*, 33 (10), 1654-1660.
33. Lakhani, S. R., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Penault-Llorca, F., van der Vijver, M., Parry, S., et al. (2005). Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*, 11 (14), 5175-5180.
34. Watkins, G., Douglas-Jones, A., Bryce, R., Mansel, R. E. and Jiang, W. G. (2005). Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72 (4), 267-272.
35. Rempel, S. A., Golembieski, W. A., 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. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57 (12), 1112-1121.
36. Golembieski, W. A., Ge, S., Nelson, K., Mikkelsen, T. and Rempel, S. A. (1999). Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion *in vitro*. *Int J Dev Neurosci*, 17 (5-6), 463-472.
37. Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., CumMings, T. J., Kuan, C. T., Bigner, D. D., et al. (2003). Bone-related Genes Expressed in Advanced Malignancies Induce Invasion and Metastasis in a Genetically Defined Human Cancer Model. *J Biol Chem*, 278 (18), 15951-15957.
38. Schultz, C., Lemke, N., Ge, S., Golembieski, W. A. and Rempel, S. A. (2002). Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth *in vivo*. *Cancer Res*, 62, 6270-6277.
39. Vajkoczy, P., Manger, M. D., Goldbrunner, R., Ge, S., Fong, T. A., Vollmar, B., et al. (2000). Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int J Cancer*, 87 (2), 261-268.
40. Shi, Q., Bao, S., Maxwell, J. A., Reese, E. D., Friedman, H. S., Bigner, D. D., et al. (2004). Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem*, 279 (50), 52200-52209.

41. McClung, H. M., Thomas, S. L., Osenkowski, P., Toth, M., Menon, P., Raz, A., et al. (2007). SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett*, 419 (2), 172-177.
42. Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., et al. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436 (7050), 518-524.
43. Campo-McKnight, D. A., Sosnoski, D. M., Koblinski, J. E. and Gay, C. V. (2006). Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. *J Cell Biochem*, 97 (2), 288-302.
44. Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D. and Kleinman, H. K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res*, 59 (17), 4453-4457.
45. De, S., Chen, J., Narizhneva, N. V., Heston, W., Brainard, J., Sage, E. H., et al. (2003). Molecular Pathway for Cancer Metastasis to Bone. *J Biol Chem*, 278 (40), 39044-39050.
46. Chen, N., Ye, X. C., Chu, K., Navone, N. M., Sage, E. H., Yu-Lee, L. Y., et al. (2007). A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 67 (14), 6544-6548.
47. Koblinski, J. E., Kaplan-Singer, B. R., VanOsdol, S. J., Wu, M., Engbring, J. A., Wang, S., et al. (2005). Endogenous Osteonectin/SPARC/BM-40 Expression Inhibits MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Metastasis. *Cancer Res*, 65 (16), 7370-7377.
48. Finocchiaro, G., Mancuso, F. M., Cittaro, D. and Muller, H. (2007). Graph-based identification of cancer signaling pathways from published gene expression signatures using PubLiME. *Nucleic Acids Res*, 35 (7), 2343-2355.
49. Chlenski, A., Liu, S., Crawford, S. E., Volpert, O. V., DeVries, G. H., Evangelista, A., et al. (2002). SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 62 (24), 7357-7363.
50. Chlenski, A., Liu, S., Baker, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R., et al. (2004). Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC. *Cancer Res*, 64 (20), 7420-7425.
51. Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D. and Motamed, K. (2007). Normalization of the Ovarian Cancer Microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res*, 5 (10), 1015-1030.
52. Said, N. A., Najwer, I., Socha, M. J., Fulton, D. J., Mok, S. C. and Motamed, K. (2007). SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk. *Neoplasia*, 9 (1), 23-35.
53. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., et al. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol*, 159 (2), 609-622.
54. Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G. and Berkowitz, R. S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 12, 1895-1901.
55. Said, N. and Motamed, K. (2005). Absence of Host-Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Augments Peritoneal Ovarian Carcinomatosis. *Am J Pathol*, 167 (6), 1739-1752.
56. Brown, T. J., Shaw, P. A., Karp, X., Huynh, M. H., Begley, H. and Ringuette, M. J. (1999). Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 75 (1), 25-33.
57. Tai, I. T., Dai, M., Owen, D. A. and Chen, L. B. (2005). Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest*, 115 (6), 1492-1502.
58. Taghizadeh, F., Tang, M. J. and Tai, I. T. (2007). Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine-induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy-resistant colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther*, 6 (1), 309-317.
59. Tang, M. J. and Tai, I. T. (2007). A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem*, 282 (47), 34457-34467.
60. Yang, E., Kang, H. J., Koh, K. H., Rhee, H., Kim, N. K. and Kim, H. (2007). Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer*, 121 (3), 567-575.
61. Wiese, A. H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., et al. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev*, 31 (4), 282-295.
62. Nguyen, Q. D., De Wever, O., Bruyneel, E., Hendrix, A., Xie, W. Z., Lombet, A., et al. (2005). ComMutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene*, 24 (56), 8240-8251.

63. 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. *Int J Cancer*, 64, 70-75.
64. Guweidhi, A., Kleeff, J., Adwan, H., Giese, N. A., Wente, M. N., Giese, T., et al. (2005). Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg*, 242 (2), 224-234.
65. Infante, J. R., Matsubayashi, H., Sato, N., Tonascia, J., Klein, A. P., Riall, T. A., et al. (2007). Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 25 (3), 319-325.
66. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Brekken, R. A., Sivridis, E., Gatter, K. C., Harris, A. L., et al. (2003). Enhanced Expression of SPARC/Osteonectin in the Tumor-associated Stroma of Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Markers of Hypoxia/ Acidity and with Poor Prognosis of Patients. *Cancer Res*, 63 (17), 5376-5380.
67. Sato, N., Fukushima, N., Maehara, N., Matsubayashi, H., Koopmann, J., Su, G. H., et al. (2003). SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene*, 22 (32), 5021-5030.
68. López Haber, C., Gottifredi, V., Llera, A. S., 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. *Int J Cancer*, In press.,
69. Prada, F., Benedetti, L. G., Bravo, A. I., Alvarez, M. J., Carbone, C. and Podhajcer, O. L. (2007). SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol*, 127 (11), 2618-2628.
70. Brekken, R. A., Puolakkainen, P., Graves, D. C., Workman, G., Lubkin, S. R. and Sage, E. H. (2003). Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest*, 111 (4), 487-495.
71. Sangaletti, S., Stoppacciaro, A., Guiducci, C., Torrisi, M. R. and Colombo, M. P. (2003). Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med*, 198 (10), 1475-1485.
72. Framson, P. E. and Sage, E. H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem*, 92 (4), 679-690.
73. Gooden, M. D., Vernon, R. B., Bassuk, J. A. and Sage, E. H. (1999). Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, 74 (2), 152-167.
74. Sodek, J., Zhu, B., Huynh, M. H., Brown, T. J. and Ringuette, M. (2002). Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res*, 43 (2-3), 308-319.
75. Yan, Q., Weaver, M., Perdue, N. and Sage, E. H. (2005). Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells. *J Cell Physiol*, 203 (1), 286-294.
76. Sage, E. H., Johnson, C. and Bornstein, P. (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem*, 259, 3993-4007.
77. Funk, S. E. and Sage, E. H. (1993). Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 154, 53-63.
78. Funk, S. E. and Sage, E. H. (1991). The Ca²⁺-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 2648-2652.
79. Kupprion, C., Motamed, K. and Sage, E. H. (1998). SPARC (BM-40, Osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273 (45), 29635-29640.
80. Lau, C. P., Poon, R. T., Cheung, S. T., Yu, W. C. and Fan, S. T. (2006). SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*, 210 (4), 459-468.
81. Charest, A., Pepin, A., Shetty, R., Cote, C., Voisine, P., Dagenais, F., et al. (2006). Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart*, 92 (12), 1844-1849.
82. Iruela Arispe, M. L., Lane, T. F., Redmond, D., Reilly, M., Bolender, R. P., Kavanagh, T. J., et al. (1995). Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*. *Mol Biol Cell*, 6 (3), 327-343.
83. Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Johnson, R. S. and Sage, E. H. (1994). SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol*, 125, 929-943.
84. Sage, E. H., Reed, M., Funk, S. E., 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 (39), 37849-37857.

85. Sasaki, T., Miosge, N. and Timpl, R. (1999). ImMunochemical and tissue analysis of protease generated neopeptides of BM-40 (osteonectin, SPARC) which are correlated to a higher affinity binding to collagens. *Matrix Biol*, 18 (5), 499-508.
86. Kato, Y., Lewalle, J. M., Baba, Y., Tsukuda, M., Sakai, N., Baba, M., et al. (2001). Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 287 (2), 422-426.
87. Nozaki, M., Sakurai, E., Raisler, B. J., Baffi, J. Z., Witta, J., Ogura, Y., et al. (2006). Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. *J Clin Invest*, 116 (2), 422-429.
88. Ferrari, G., Pintucci, G., Seghezzi, G., Hyman, K., Galloway, A. C. and Mignatti, P. (2006). VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (46), 17260-17265.
89. Choi, M. E. and Ballermann, B. J. (1995). Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*, 270 (36), 21144-21150.
90. Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2 (6), 442-454.
91. Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., et al. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2 (2), 76-83.
92. De Craene, B., van Roy, F. and Berx, G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal*, 17 (5), 535-547.
93. Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrío, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S. M., Villa, S., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 66 (19), 9543-9556.
94. Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., et al. (2006). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res*, 66 (15), 7516-7523.
95. Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., et al. (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res*, 67 (7), 3450-3460.
96. Bierie, B. and Moses, H. L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 6 (7), 506-520.
97. Ford, R., Wang, G., Jannati, P., Adler, D., Racanelli, P., Higgins, P. J., et al. (1993). Modulation of SPARC expression during butyrate-induced terminal differentiation of cultured human keratinocytes: regulation via a TGF-beta-dependent pathway. *Exp Cell Res*, 206 (2), 261-275.
98. Bassuk, J. A., Pichler, R., Rothmier, J. D., Pippen, J., Gordon, K., Meek, R. L., et al. (2000). Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney Int*, 57 (1), 117-128.
99. Francki, A., Bradshaw, A. D., Bassuk, J. A., Howe, C. C., Couser, W. G. and Sage, E. H. (1999). SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem*, 274 (45), 32145-32152.
100. Reed, M. J., Vernon, R. B., Abrass, I. B. and Sage, E. H. (1994). TGF-b 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol*, 158 (1), 169-179.
101. 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 (7), 1653-1659.
102. Wrana, J. L., Overall, C. M. and Sodek, J. (1991). 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. *Eur J Biochem*, 197, 519-528.
103. Pavasant, P., Yongchaitrakul, T., Pattamapun, K. and Arksornnukit, M. (2003). The synergistic effect of TGF-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol*, 48 (10), 717-722.

104. Francki, A., McClure, T. D., Brekken, R. A., Motamed, K., Murri, C., Wang, T., et al. (2004). SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem*, 91 (5), 915-925.
105. Schiemann, B. J., Neil, J. R. and Schiemann, W. P. (2003). SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the TGF-beta-signaling system. *Mol Biol Cell*, 14 (10), 3977-3988.
106. Bradshaw, A. D., Reed, M. J., Carbon, J. G., Pinney, E., Brekken, R. A. and Sage, E. H. (2001). Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair Regen*, 9 (6), 522-530.
107. Peinado, H., Quintanilla, M. and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, 278 (23), 21113-21123.
108. McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G. and Frame, M. C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, 5 (7), 505-515.
109. Shi, Q., Bao, S., Song, L., Wu, Q., Bigner, D. D., Hjelmeland, A. B., et al. (2007). Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene*, 26 (28), 4084-4094.
110. Coussens, L. M. and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, 3, 895-904.
111. Alvarez, M. J., Prada, F., Salvatierra, E., Bravo, A. I., Lutzky, V. P., 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 (12), 5123-5132.
112. Savani, R. C., Zhou, Z., Arguiri, E., Wang, S., Vu, D., Howe, C. C., et al. (2000). Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC. *AJP-Lung Physiol*, 279 (4), L743-750.
113. Sangaletti, S., Gioiosa, L., Guiducci, C., Rotta, G., Rescigno, M., Stoppacciaro, A., et al. (2005). Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J Cell Sci*, 118 (Pt 16), 3685-3694.
114. Rempel, S. A., Hawley, R. C., Gutierrez, J. A., Mouzon, E., Bobbitt, K. R., Lemke, N., et al. (2007). Splenic and imMune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of imMune response. *Genes ImMun*, 8 (3), 262-274.
115. Vannahme, C., Gosling, S., Paulsson, M., Maurer, P. and Hartmann, U. (2003). Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein. *Biochem J*, 373 (Pt 3), 805-814.
116. Rocnik, E. F., Liu, P., Sato, K., Walsh, K. and Vaziri, C. (2006). The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *J Biol Chem*, 281 (32), 22855-22864.
117. Girard, J.-P. and Springer, T. A. (1995). Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *ImMunity*, 2, 113-123.
118. Girard, J.-P. and Springer, T. A. (1996). Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *J Biol Chem*, 271 (8), 4511-4517.
119. Nelson, P. S., Plymate, S. R., Wang, K., True, L. D., Ware, J. L., Gan, L., et al. (1998). Hevin, an antiadhesive extracellular matrix protein, is down-regulated in metastatic prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, 58 (2), 232-236.
120. Bendik, I., Schraml, P. and Ludwig, C. U. (1998). Characterization of MAST9/Hevin, a SPARC-like protein, that is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 58 (4), 626-629.
121. Claeskens, A., Ongenaes, N., Neefs, J. M., 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. *Br J Cancer*, 82 (6), 1123-1130.
122. Esposito, I., Kayed, H., Keleg, S., Giese, T., Sage, E. H., Schirmacher, P., et al. (2007). Tumor-suppressor function of SPARC-like protein 1/Hevin in pancreatic cancer. *Neoplasia*, 9 (1), 8-17.
123. Jazaeri, A. A., Awtrey, C. S., Chandramouli, G. V., Chuang, Y. E., Khan, J., Sotiriou, C., et al. (2005). Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res*, 11 (17), 6300-6310.
124. Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J. A. and Bos, T. J. (2002). Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene*, 21 (46), 7077-7091.
125. Lopez, M. V., Blanco, P., Viale, D. L., Cafferata, E. G., Carbone, C., Gould, D., et al. (2006). Expression of a suicidal gene under control of the human secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) promoter in tumor or stromal cells led to the inhibition of tumor cell growth. *Mol Cancer Ther*, 5 (10), 2503-2511.

126. Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H.-L., Munishkin, A., et al. (2001). Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, 61 (13), 5168-5178.
127. Woelfle, U., Cloos, J., Sauter, G., Riethdorf, L., Janicke, F., van Diest, P., et al. (2003). Molecular Signature Associated with Bone Marrow Micrometastasis in Human Breast Cancer. *Cancer Res*, 63 (18), 5679-5684.
128. Watkins, G., Martin, T. A., Bryce, R., Mansel, R. E. and Jiang, W. G. (2005). GamMa-Linolenic acid regulates the expression and secretion of SPARC in human cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72 (4), 273-278.
129. Castronovo, V. and Bellahcene, A. (1998). Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells. *Int J Oncol*, 12 (2), 305-308.
130. Porter, D., Lahti-Domenici, J., Keshaviah, A., Bae, Y. K., Argani, P., Marks, J., et al. (2003). Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*, 1 (5), 362-375.
131. Dairkee, S. H., Ji, Y., Ben, Y., Moore, D. H., Meng, Z. and Jeffrey, S. S. (2004). A molecular 'signature' of primary breast cancer cultures; patterns resembling tumor tissue. *BMC Genomics*, 5, 47.
132. Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., et al. (2004). Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res*, 64 (3), 844-856.
133. Jansen, M. P. H. M., Foekens, J. A., van Staveren, I. L., Dirkwager-Kiel, M. M., Ritstier, K., Look, M. P., et al. (2005). Molecular Classification of Tamoxifen-Resistant Breast Carcinomas by Gene Expression Profiling. *J Clin Oncol*, 23 (4), 732-740.
134. Sturm, R. A., Satyamoorthy, K., Meier, F., Gardiner, B. B., Smit, D. J., Vaidya, B., et al. (2002). Osteonectin/SPARC induction by ectopic β_3 integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res*, 62, 226-232.
135. Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I. and Bosserhoff, A. K. (2005). Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 15 (4), 305-313.
136. Menon, P. M., Gutierrez, J. A. and Rempel, S. A. (2000). A study of SPARC and vitronectin localization and expression in pediatric and adult gliomas: high SPARC secretion correlates with decreased migration on vitronectin. *Int J Oncol*, 17 (4), 683-693.
137. Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H. (2000). Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res*, 60 (24), 6868-6874.
138. Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Fisher, J. L., Maile, M. and Nakeff, A. (2001). SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *J Neurooncol*, 53, 149-160.
139. Golembieski, W. A. and Rempel, S. A. (2002). cDNA array analysis of SPARC-modulated changes in glioma gene expression. *J Neurooncol*, 60 (3), 213-226.
140. Zhou, X., Tan, F. K., Guo, X., Wallis, D., Milewicz, D. M., Xue, S., et al. (2005). Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 52 (1), 257-261.
141. Cantarella, G., Risuglia, N., Dell'eva, R., Lempereur, L., Albin, A., Pennisi, G., et al. (2006). TRAIL inhibits angiogenesis stimulated by VEGF expression in human glioblastoma cells. *Br J Cancer*, 94 (10), 1428-1435.
142. Kunigal, S., Gondi, C. S., Gujrati, M., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C., et al. (2006). SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. *Int J Oncol*, 29 (6), 1349-1357.
143. Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Magnani, I., Bertelli, A. A., Nowicky, W., et al. (2006). Effect of Ukrain on matrix metalloproteinase-2 and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) expression in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs*, 17 (2), 189-194.
144. Colin, C., Baeza, N., Bartoli, C., Fina, F., Eudes, N., Nanni, I., et al. (2006). Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. *Oncogene*, 25 (19), 2818-2826.
145. Rempel, S. A., Ge, S. and Gutiérrez, J. A. (1999). SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res*, 5, 237-241.
146. Rich, J. N., Hans, C., Jones, B., Iversen, E. S., McLendon, R. E., Rasheed, B. K., et al. (2005). Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res*, 65 (10), 4051-4058.

147. Volmer, M. W., Radacz, Y., Hahn, S. A., Klein-Scory, S., Stuhler, K., Zapatka, M., et al. (2004). Tumor suppressor Smad4 mediates downregulation of the anti-adhesive invasion-promoting matricellular protein SPARC: Landscaping activity of Smad4 as revealed by a "secretome" analysis. *Proteomics*, 4 (5), 1324-1334.
148. Sansom, O. J., Mansergh, F. C., Evans, M. J., Wilkins, J. A. and Clarke, A. R. (2007). Deficiency of SPARC suppresses intestinal tumorigenesis in APCMin/+ mice. *Gut*, 56 (10), 1410-1414.
149. Madoz-Gurpide, J., Lopez-Serra, P., Martinez-Torrecedrera, J. L., Sanchez, L., Lombardia, L. and Casal, J. I. (2006). Proteomics-based Validation of Genomic Data: Applications in Colorectal Cancer Diagnosis. *Mol Cell Proteomics*, 5 (8), 1471-1483.
150. Kaiser, S., Park, Y. K., Franklin, J. L., Halberg, R. B., Yu, M., Jessen, W. J., et al. (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol*, 8, R131.
151. Lecrone, V., Li, W., Devoll, R. E., Logothetis, C. and Farach-Carson, M. C. (2000). Calcium signals in prostate cancer cells: specific activation by bone-matrix proteins. *Cell Calcium*, 27 (1), 35-42.
152. Thomas, R., True, L. D., Bassuk, J. A., Lange, P. H. and Vessella, R. L. (2000). Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*, 6 (3), 1140-1149.
153. Lapointe, J., Li, C., Higgins, J. P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., et al. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (3), 811-816.
154. Best, C. J., Gillespie, J. W., Yi, Y., Chandramouli, G. V., Perlmutter, M. A., Gathright, Y., et al. (2005). Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res*, 11 (19 Pt 1), 6823-6834.
155. Kato, Y., Sakai, N., Baba, M., Kaneko, S., Kondo, K., Kubota, Y., et al. (1998). Stimulation of motility of human renal cell carcinoma by SPARC/Osteonectin/BM-40 associated with type IV collagen. *Invasion Metastasis*, 18 (2), 105-114.
156. Sakai, N., Baba, M., Nagasima, Y., Kato, Y., Hirai, K., Kondo, K., et al. (2001). SPARC expression in primary human renal cell carcinoma: upregulation of SPARC in sarcomatoid renal carcinoma. *Hum Pathol*, 32 (10), 1064-1070.
157. Gieseg, M. A., Cody, T., Man, M. Z., Madore, S. J., Rubin, M. A. and Kaldjian, E. P. (2002). Expression profiling of human renal carcinomas with functional taxonomic analysis. *BMC Bioinformatics*, 3, 26.
158. Luo, A., Kong, J., Hu, G., Liew, C. C., Xiong, M., Wang, X., et al. (2004). Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene*, 23 (6), 1291-1299.
159. Mitas, M., Almeida, J. S., Mikhitarian, K., Gillanders, W. E., Lewin, D. N., Spyropoulos, D. D., et al. (2005). Accurate Discrimination of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Using a Quantitative Three-Tiered Algorithm and Multimarker Real-time Reverse Transcription-PCR. *Clin Cancer Res*, 11 (6), 2205-2214.
160. Che, Y., Luo, A., Wang, H., Qi, J., Guo, J. and Liu, Z. (2006). The differential expression of SPARC in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*, 17 (6), 1027-1033.
161. Porte, H., Triboulet, J. P., Kotelevets, L., Carrat, F., Prevot, S., Nordlinger, B., et al. (1998). Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Clin Cancer Res*, 4 (6), 1375-1382.
162. Yamashita, K., Upadhyay, S., Mimori, K., Inoue, H. and Mori, M. (2003). Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer*, 97 (10), 2412-2419.
163. Brabender, J., Marjoram, P., Lord, R. V., Metzger, R., Salonga, D., Vallbohmer, D., et al. (2005). The molecular signature of normal squamous esophageal epithelium identifies the presence of a field effect and can discriminate between patients with Barrett's esophagus and patients with Barrett's-associated adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (9), 2113-2117.
164. Siddiq, F., Sarkar, F. H., Wali, A., Pass, H. I. and Lonardo, F. (2004). Increased osteonectin expression is associated with malignant transformation and tumor associated fibrosis in the lung. *Lung Cancer*, 45 (2), 197-205.
165. 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 (44), 6848-6857.

166. Hedvat, C. V., Comenzo, R. L., Teruya-Feldstein, J., Olshen, A. B., Ely, S. A., Osman, K., et al. (2003). Insights into extramedullary tumour cell growth revealed by expression profiling of human plasmacytomas and multiple myeloma. *Br J Haematol*, 122 (5), 728-744.
167. Martinez, N., Camacho, F. I., Algara, P., Rodriguez, A., Dopazo, A., Ruiz-Ballesteros, E., et al. (2003). The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res*, 63 (23), 8226-8232.
168. Aouacheria, A., Navratil, V., Lopez-Perez, R., Gutierrez, N. C., Churkin, A., Barash, D., et al. (2007). In silico whole-genome screening for cancer-related single-nucleotide polymorphisms located in human mRNA untranslated regions. *BMC Genomics*, 8, 2.
169. Bloomston, M., Ellison, E. C., Muscarella, P., Al-Saif, O., Martin, E. W., Melvin, W. S., et al. (2007). Stromal osteonectin overexpression is associated with poor outcome in patients with ampullary cancer. *Ann Surg Oncol*, 14 (1), 211-217.
170. Prenzel, K. L., Warnecke-Eberz, U., Xi, H., Brabender, J., Baldus, S. E., Bollschweiler, E., et al. (2006). Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA in pancreatic cancer compared to cancer of the papilla of Vater. *Oncol Rep*, 15 (5), 1397-1401.
171. Le Bail, B., Faouzi, S., Boussarie, L., Guirouilh, J., Blanc, J. F., Carles, J., et al. (1999). Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol*, 189 (1), 46-52.
172. Goldenberg, D., Ayesh, S., Schneider, T., Pappo, O., Jurim, O., Eid, A., et al. (2002). Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog*, 33, 113-124.
173. Maeng, H. Y., Song, S. B., Choi, D. K., Kim, K. E., Jeong, H. Y., Sakaki, Y., et al. (2002). Osteonectin-expressing cells in human stomach cancer and their possible clinical significance. *Cancer Lett*, 184 (1), 117-121.
174. Inoue, H., Matsuyama, A., Mimori, K., Ueo, H. and Mori, M. (2002). Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray. *Clin Cancer Res*, 8 (11), 3475-3479.
175. Wang, C. S., Lin, K. H., Chen, S. L., Chan, Y. F. and Hsueh, S. (2004). Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer*, 91 (11), 1924-1930.
176. Paley, P. J., Goff, B. A., Gown, A. M., Greer, B. E. and Sage, E. H. (2000). Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 78 (3 Pt 1), 336-341.
177. Nimphius, W., Moll, R., Olbert, P., Ramaswamy, A. and Barth, P. J. (2007). CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch*, 450 (2), 179-185.
178. Yamanaka, M., Kanda, K., Li, N.-C., Fukumori, T., Oka, N., Kanayama, H.-O., et al. (2001). Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol*, 166, 2495-2499.
179. Chen, Y., Miller, C., Mosher, R., Zhao, X., Deeds, J., Morrissey, M., et al. (2003). Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res*, 63 (8), 1927-1935.
180. Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., et al. (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (1), 114-123.
181. Rodriguez-Jimenez, F. J., Caldes, T., Iniesta, P., Vidart, J. A., Garcia-Asenjo, J. L. and Benito, M. (2007). Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma. *Oncol Rep*, 17 (6), 1301-1307.
182. Fanburg-Smith, J. C., Brattbauer, G. L. and Miettinen, M. (1999). Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskeletal osteosarcoma: a study of 28 cases. *Hum Pathol*, 30 (1), 32-38.
183. Dalla-Torre, C. A., Yoshimoto, M., Lee, C. H., Joshua, A. M., de Toledo, S. R., Petrilli, A. S., et al. (2006). Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer*, 6 (1), 237.
184. Takano, T., Hasegawa, Y., Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Yoshida, H., Kuma, K., et al. (2002). Quantitative analysis of osteonectin mRNA in thyroid carcinomas. *Endocr J*, 49 (4), 511-516.
185. Chin, D., Boyle, G. M., Williams, R. M., Ferguson, K., Pandeya, N., Pedley, J., et al. (2005). Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer*, 113 (5), 789-797.
186. Aycock, R. L., Bradshaw, A. C., Sage, E. H. and Starcher, B. (2004). Development of UV-induced squamous cell carcinomas is suppressed in the absence of SPARC. *J Invest Dermatol*, 123 (3), 592-599.
187. Said, N., Najwer, I. and Motamed, K. (2007). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol*, 170 (3), 1054-1063.

188. Cody, N. A., Ouellet, V., Manderson, E. N., Quinn, M. C., Filali-Mouhim, A., Tellis, P., et al. (2007). Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene*, 26 (4), 618-632.
189. Dhanesuan, N., Sharp, J. A., Blick, T., Price, J. T. and Thompson, E. W. (2002). Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. *Breast Cancer Res Treat*, 75 (1), 73-85.
190. Bergamaschi, A., Tagliabue, E., Sorlie, T., Naume, B., Triulzi, T., Orlandi, R., et al. (2007). Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*, 214 (3), 357-367.
191. Tang, H., Wang, J., Bai, F., Hong, L., Liang, J., Gao, J., et al. (2007). Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer. *Biochem Cell Biol*, 85 (1), 103-110.
192. Chlenski, A., Liu, S., Guerrero, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R., et al. (2006). SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. *Int J Cancer*, 118 (2), 310-316.
193. Chlenski, A., Guerrero, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Peddinti, R., Salwen, H. R., et al. (2007). SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation. *Oncogene*, 26 (31), 4513-4522.
194. Puolakkainen, P., Bradshaw, A. D., Kyriakides, T. R., Reed, M., Brekken, R., Wight, T., et al. (2003). Compromised production of extracellular matrix in mice lacking secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) leads to a reduced foreign body reaction to implanted biomaterials. *Am J Pathol*, 162 (2), 627-635.
195. DiMartino, J. F., Lacayo, N. J., Varadi, M., Li, L., Saraiya, C., Ravindranath, Y., et al. (2006). Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia*, 20 (3), 426-432.

Referencias bibliográficas

- Abbey, C. K., Borowsky, A. D., McGoldrick, E. T., Gregg, J. P., Maglione, J. E., Cardiff, R. D., and Cherry, S. R. (2004). In vivo positron-emission tomography imaging of progression and transformation in a mouse model of mammary neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11438-11443.
- Acker, H., Carlsson, J., Holtermann, G., Nederman, T., and Nylen, T. (1987). Influence of glucose and buffer capacity in the culture medium on growth and pH in spheroids of human thyroid carcinoma and human glioma origin. *Cancer Res* *47*, 3504-3508.
- Aebersold, R., and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* *422*, 198-207.
- Alonso, S. R., Ortiz, P., Pollan, M., Perez-Gomez, B., Sanchez, L., Acuna, M. J., Pajares, R., Martinez-Tello, F. J., Hortelano, C. M., Piris, M. A., and Rodriguez-Peralto, J. L. (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* *164*, 193-203.
- Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., Linares, J., Serrano, S., Saez-Castillo, A. I., Sanchez, L., *et al.* (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* *67*, 3450-3460.
- Alvarez, M. J., Prada, F., Salvatierra, E., Bravo, A. I., Lutzky, V. P., Carbone, C., Pitossi, F. J., Chuluyan, H. E., and Podhajcer, O. L. (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.
- Alliel, P. M., Perin, J. P., Jolles, P., and Bonnet, F. J. (1993). Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *European Journal of Biochemistry* *214*, 347-350.
- Assoian, R. K., and Klein, E. A. (2008). Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol* *18*, 347-352.
- Atorrasagasti, C., Malvicini, M., Aquino, J. B., Alaniz, L., Garcia, M., Bolontrade, M., Rizzo, M., Podhajcer, O. L., and Mazzolini, G. (2010). Overexpression of SPARC obliterates the in vivo tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* *126*, 2726-2740.
- Barker, T. H., Baneyx, G., Cardo-Vila, M., Workman, G. A., Weaver, M., Menon, P. M., Dedhar, S., Rempel, S. A., Arap, W., Pasqualini, R., *et al.* (2005). SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem* *280*, 36483-36493.
- Bassuk, J. A., Grady, R., and Mitchell, M. (2000a). Review article: The molecular era of bladder research. Transgenic mice as experimental tools in the study of outlet obstruction. *J Urol* *164*, 170-179.
- Bassuk, J. A., Pichler, R., Rothmier, J. D., Pippen, J., Gordon, K., Meek, R. L., Bradshaw, A. D., Lombardi, D., Strandjord, T. P., Reed, M., *et al.* (2000b). Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney Int* *57*, 117-128.
- Bassuk, J. A., Pichler, R., Rothmier, J. D., Pippen, J., Gordon, K., Meek, R. L., Brandshaw, A. D., Lombardi, D., Strandjord, T. P., Reed, M., *et al.* (2000c). Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney International* *57*, 117-128.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* *125*, 279-284.
- Bhoopathi, P., Chetty, C., Gujrati, M., Dinh, D. H., Rao, J. S., and Lakka, S. (2010). Cathepsin B facilitates autophagy-mediated apoptosis in SPARC overexpressed primitive neuroectodermal tumor cells. *Cell Death Differ*.
- Bierie, B., and Moses, H. L. (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* *17*, 29-40.
- Bonnet, F., Perin, J. P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J. L., and Alliel, P. M. (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. (2000). Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol* *19*, 555-556.
- Bornstein, P. (2002). Cell-matrix interactions: the view from the outside. *Methods Cell Biol* *69*, 7-11.

- Bradshaw, A. D., Graves, D. C., Motamed, K., and Sage, E. H. (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, A. D., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *The Journal of Clinical Investigation* *107*, 1049-1054.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biology* *19*, 569-580.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* *19*, 816-827.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* *172*, 902-908.
- Brown, L. F., Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M. L., Yeo, T. K., Tognazzi, K., and Dvorak, H. F. (1999). Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* *5*, 1041-1056.
- Caglic, D., Pungercar, J. R., Pejler, G., Turk, V., and Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem* *282*, 33076-33085.
- Campo, E., Munoz, J., Miquel, R., Palacin, A., Cardesa, A., Sloane, B. F., and Emmert-Buck, M. R. (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* *145*, 301-309.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* *2*, 76-83.
- Carlsson, J., and Acker, H. (1988). Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer* *42*, 715-720.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., *et al.* (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* *7*, R100.
- Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* *64*, 631-644.
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Epstein, M. N., Greene, M. H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* *15*, 1147-1165.
- Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. D., and Tabi, Z. (2005). Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* *118*, 3631-3638.
- Chlenski, A., Liu, S., Baker, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R., and Cohn, S. L. (2004). Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC. *Cancer Res* *64*, 7420-7425.
- Chlenski, A., Liu, S., Crawford, S. E., Volpert, O. V., DeVries, G. H., Evangelista, A., Yang, Q., Salwen, H. R., Farrer, R., Bray, J., and Cohn, S. L. (2002). SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res* *62*, 7357-7363.
- Damjanovski, S., Huynh, M. H., Motamed, K., Sage, E. H., and 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.
- De Craene, B., van Roy, F., and Berx, G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* *17*, 535-547.
- Derycke, L., Morbidelli, L., Ziche, M., De Wever, O., Bracke, M., and Van Aken, E. (2006). Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis. *Clin Exp Metastasis* *23*, 187-201.
- Discher, D. E., Janmey, P., and Wang, Y.-I. (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* *310*, 1139-1143.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* *315*, 1650-1659.
- Emerson, R. O., Sage, E. H., Ghosh, J. G., and Clark, J. I. (2006). Chaperone-like activity revealed in the matricellular protein SPARC. *J Cell Biochem* *98*, 701-705.

- Engel, J., Taylor, W., Paulsson, M., Sage, H., and 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.
- Fehrenbacher, N., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 65, 2993-2995.
- Fernandez, E. A., Girotti, M. R., Lopez del Olmo, J. A., Llera, A. S., Podhajcer, O. L., Cantet, R. J., and Balzarini, M. (2008). Improving 2D-DIGE protein expression analysis by two-stage linear mixed models: assessing experimental effects in a melanoma cell study. *Bioinformatics* 24, 2706-2712.
- Finocchiaro, G., Mancuso, F. M., Cittaro, D., and Muller, H. (2007). Graph-based identification of cancer signaling pathways from published gene expression signatures using PubLIME. *Nucleic Acids Res* 35, 2343-2355.
- Ford, R., Wang, G., Jannati, P., Adler, D., Racanelli, P., Higgins, P. J., and Staiano-Coico, L. (1993). Modulation of SPARC expression during butyrate-induced terminal differentiation of cultured human keratinocytes: regulation via a TGF-beta-dependent pathway. *Exp Cell Res* 206, 261-275.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339.
- Francki, A., Bradshaw, A. D., Bassuk, J. A., Howe, C. C., Couser, W. G., and Sage, E. H. (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, T., Brekken, R., Motamed, K., Murri, C., Wang, T., and Sage, E. (2004a). SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91, 915-925.
- Francki, A., McClure, T. D., Brekken, R. A., Motamed, K., Murri, C., Wang, T., and Sage, E. H. (2004b). SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91, 915-925.
- Frohlich, E., Schlagenhauff, B., Mohrle, M., Weber, E., Klessen, C., and Rassner, G. (2001). Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 91, 972-982.
- Funk, S. E., and Sage, E. H. (1991). The Ca²⁺-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, S. E., and Sage, E. H. (1993). Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 154, 53-63.
- Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B., and Gillies, R. J. (2006). Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 66, 5216-5223.
- Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., and Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340, 1341-1348.
- Gilles, C., Bassuk, J. A., Pulyaeva, H., Sage, E. H., Foidart, J.-M., and Thompson, E. W. (1998). SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 58, 5529-5536.
- Girard, J.-P., and Springer, T. A. (1995). Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* 2, 113-123.
- Girard, J.-P., and Springer, T. A. (1996). Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 4511-4517.
- Giudici, C., Raynal, N., Wiedemann, H., Cabral, W. A., Marini, J. C., Timpl, R., Bachinger, H. P., Farndale, R. W., Sasaki, T., and Tenni, R. (2008). Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 283, 16.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* 20, 543-556.
- Gole, B., Duran Alonso, M. B., Dolenc, V., and Lah, T. (2009). Post-translational regulation of cathepsin B, but not of other cysteine cathepsins, contributes to increased glioblastoma cell invasiveness in vitro. *Pathol Oncol Res* 15, 711-723.
- Gooden, M. D., Vernon, R. B., Bassuk, J. A., and Sage, E. H. (1999). Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *Journal of Cellular Biochemistry* 74, 152-167.

- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* *21*, 1037-1053.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., and Weiss, W. (1999). Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* *20*, 712-717.
- Gorg, A., Postel, W., Friedrich, C., Kuick, R., Strahler, J. R., and Hanash, S. M. (1991). Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. *Electrophoresis* *12*, 653-658.
- Greenwood, J. A., and Murphy-Ullrich, J. E. (1998). Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microscopy Research and Technique* *43*, 420-432.
- Guermah, M., Crisanti, P., Laugier, D., Dezelee, P., Bidou, L., Pessac, B., and Calothy, G. (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.
- Guilford, P. (1999). E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* *5*, 172-177.
- Gullberg, D., Gehlsen, K. R., Turner, D. C., Ahlen, K., Zijenah, L. S., Barnes, M. J., and Rubin, K. (1992). Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. *EMBO J* *11*, 3865-3873.
- Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 816-826.
- Haass, N. K., and Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc* *10*, 153-163.
- Haber, C. L., Gottifredi, V., Llera, A. S., Salvatierra, E., Prada, F., Alonso, L., Sage, E. H., and Podhajcer, O. L. (2008). SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int J Cancer* *122*, 1465-1475.
- Halder, S. K., Beauchamp, R. D., and Datta, P. K. (2005). A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* *7*, 509-521.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hasselaar, P., and Sage, E. H. (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.
- Heldin, C. H., Landstrom, M., and Moustakas, A. (2009). Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 166-176.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Chu, Y. W., Trevor, K. T., and Seftor, R. E. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* *15*, 507-525.
- Herbert, B., Hopwood, F., Oxley, D., McCarthy, J., Laver, M., Grinyer, J., Goodall, A., Williams, K., Castagna, A., and Righetti, P. G. (2003). Beta-elimination: an unexpected artefact in proteome analysis. *Proteomics* *3*, 826-831.
- Herlyn, M., Berking, C., Li, G., and Satyamoorthy, K. (2000). Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res* *10*, 303-312.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J. N., and Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca²⁺-binding module in BM-40. *Nature Structural Biology* *3*, 67-73.
- Hohenester, E., Maurer, P., and 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, P. W., Harper, S. J., McVey, J. H., and Hogan, B. L. (1987). In vivo expression of mRNA for the Ca²⁺-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *The Journal of Cell Biology* *105*, 473-482.
- Hsu, M. Y., Meier, F., and Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* *70*, 522-536.
- Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* *1*, 188-194.
- Huang da, W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res* *35*, W169-175.

- Hughes, C. S., Postovit, L. M., and Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* *10*, 1886-1890.
- Hughes, R. C., Taylor, A., Sage, H., and Hogan, B. L. (1987). Distinct patterns of glycosylation of colligin, a collagen-binding glycoprotein, and SPARC (osteonectin), a secreted Ca²⁺-binding glycoprotein. Evidence for the localisation of colligin in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* *163*, 57-65.
- Hulkower, K. I., Butler, C. C., Linebaugh, B. E., Klaus, J. L., Keppler, D., Giranda, V. L., and Sloane, B. F. (2000). Fluorescent microplate assay for cancer cell-associated cathepsin B. *Eur J Biochem* *267*, 4165-4170.
- Ikuta, Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H., and Nishimura, Y. (2005). Highly Sensitive Detection of Melanoma at an Early Stage Based on the Increased Serum Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine and Glypican-3 Levels. *Clin Cancer Res* *11*, 8079-8088.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., and Hill, C. S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* *62*, 65-74.
- Iruela-Arispe, M. L., Vernon, R. B., Wu, H., Jaenisch, R., and Sage, E. H. (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, M. L., Lane, T. F., Redmond, D., Reilly, M., Bolender, R. P., Kavanagh, T. J., and Sage, E. H. (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.
- Johnston, I. G., Paladino, T., Gurd, J. W., and Brown, I. R. (1990). Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* *4*, 165-176.
- Kairiyama, C., Slavutsky, I., Larripa, I., Morvillo, V., Bravo, A. I., Bover, L., Podhajcer, O. L., and José, M. (1995). Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Research* *88*, 121-131.
- Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* *119*, 1420-1428.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* *60*, 2299-2301.
- Kato, Y., Lewalle, J. M., Baba, Y., Tsukuda, M., Sakai, N., Baba, M., Kobayashi, K., Koshika, S., Nagashima, Y., Frankenne, F., *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, F. G., Hartmann, U., Paulsson, M., Maurer, P., and Zaucke, F. (2004). Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* *14*, 609-619.
- Kelm, R. J., Jr., and Mann, K. G. (1991). The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J Biol Chem* *266*, 9632-9639.
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquere, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., and Busson, P. (2006). Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* *6*, 283.
- Kleinman, H. K., and Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* *15*, 378-386.
- Klose, A., Wilbrand-Hennes, A., Zigrino, P., Weber, E., Krieg, T., Mauch, C., and Hunzelmann, N. (2006). Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin B. *Int J Cancer* *118*, 2735-2743.
- Koblinski, J. E., Ahram, M., and Sloane, B. F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* *291*, 113-135.
- Koblinski, J. E., Dosesescu, J., Sameni, M., Moin, K., Clark, K., and Sloane, B. F. (2002). Interaction of Human Breast Fibroblasts with Collagen I Increases Secretion of Procathepsin B
J Biol Chem *277*, 32220-32227.
- Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I., and Bosserhoff, A. K. (2005). Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* *15*, 305-313.

- Kupprion, C., Motamed, K., and Sage, E. H. (1998). SPARC (BM-40, Osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 29635-29640.
- Lane, T. F., and Sage, E. H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB Journal* 8, 163-173.
- Lau, C. P., Poon, R. T., Cheung, S. T., Yu, W. C., and Fan, S. T. (2006). SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 210, 459-468.
- LeBleu, V. S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1121-1129.
- Ledda, M. F., Adris, S., Bravo, A. I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. (1997a). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Medicine* 3, 171-175.
- Ledda, M. F., Bravo, A. I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. (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.
- Leitinger, B., and Hohenester, E. (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26, 146-155.
- Lenferink, A. E., Cantin, C., Nantel, A., Wang, E., Durocher, Y., Banville, M., Paul-Roc, B., Marcil, A., Wilson, M. R., and O'Connor-McCourt, M. D. (2010). Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies. *Oncogene* 29, 831-844.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891-906.
- Li, G., and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6, 163-169.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 62-70.
- Lien, H. C., Hsiao, Y. H., Lin, Y. S., Yao, Y. T., Juan, H. F., Kuo, W. H., Hung, M. C., Chang, K. J., and Hsieh, F. J. (2007). Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 26, 7859-7871.
- Lilley, K. S., and Friedman, D. B. (2004). All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 1, 401-409.
- Linebaugh, B. E., Sameni, M., Day, N. A., Sloane, B. F., and Keppler, D. (1999). Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem* 264, 100-109.
- Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.
- López Haber, C., Gottifredi, V., Llera, A. S., Salvatierra, E., Prada, F., Alonso, L., Sage, E. H., and Podhajcer, O. (2007). SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *International Journal of Cancer In press*.
- Lyon, C. A., Johnson, J. L., Williams, H., Sala-Newby, G. B., and George, S. J. (2009). Soluble N-cadherin overexpression reduces features of atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 195-201.
- Llera, A. S., Girotti, M. R., Benedetti, L. G., and Podhajcer, O. L. (2010). Matricellular proteins and inflammatory cells: a task force to promote or defeat cancer? *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 67-76.
- Mach, L., Mort, J. S., and Glossl, J. (1994). Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 269, 13030-13035.
- Mach, L., Stuwe, K., Hagen, A., Ballaun, C., and Glossl, J. (1992). Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J* 282 (Pt 2), 577-582.
- Mai, J., Finley, R. L., Jr., Waisman, D. M., and Sloane, B. F. (2000a). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem* 275, 12806-12812.

- Mai, J., Waisman, D. M., and Sloane, B. F. (2000b). Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta* 1477, 215-230.
- Maillard, C., Malaval, L., and Delmas, P. D. (1992). Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* 13, 257-264.
- Mancianti, M. L., Gyorfı, T., Shih, I. M., Valyi-Nagy, I., Levengood, G., Menssen, H. D., Halpern, A. C., Elder, D. E., and Herlyn, M. (1993). Growth regulation of cultured human nevus cells. *J Invest Dermatol* 100, 281S-287S.
- Mann, K., Deutzmann, R., Pausson, M., and 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.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Marko-Varga, G., and Fehniger, T. E. (2004). Proteomics and disease--the challenges for technology and discovery. *J Proteome Res* 3, 167-178.
- Marr, H. S., Basalamah, M. A., Bouldin, T. W., Duncan, A. W., and Edgell, C. J. (2000). Distribution of testican expression in human brain. *Cell and Tissue Research* 302, 139-144.
- Marr, H. S., Basalamah, M. A., and Edgell, C. J. (1997). Endothelial cell expression of testican mRNA. *Endothelium* 5, 209-219.
- Martinek, N., Shahab, J., Sodek, J., and Ringuette, M. (2007). Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res* 86, 296-305.
- Mason, I. J., Murphy, D., Munke, M., Francke, U., Elliott, R. W., and hogan, B. L. M. (1986a). Developmental and transformation-sensitive expression of SPARC gene on mouse chromosome 11. *EMBO Journal* 5, 1831-1837.
- Mason, I. J., Taylor, A., Williams, J. G., Sage, H., and Hogan, B. L. M. (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.
- Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Reali, U. M., and Santucci, M. (1999). Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Human Pathology* 30, 339-344.
- Mathias, R. A., Wang, B., Ji, H., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Zhu, H. J., and Simpson, R. J. (2009). Secretome-based proteomic profiling of Ras-transformed MDCK cells reveals extracellular modulators of epithelial-mesenchymal transition. *J Proteome Res* 8, 2827-2837.
- Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Gohring, W., Timpl, R., and 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., Engel, J., and Timpl, R. (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, J. E., and 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.
- McKinnon, P. J., and Margolskee, R. F. (1996). SC1: a marker for astrocytes in the adult rodent brain is upregulated during reactive astrocytosis. *Brain Research* 709, 27-36.
- McVey, J. H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I. J., and Hogan, B. L. (1988). Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11111-11116.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.
- Mohamed, M. M., and Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-775.
- Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G., and Berkowitz, R. S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* 12, 1895-1901.

- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrio, D., Peinado, H., Rodriguez-Pinilla, S. M., Villa, S., Bolos, V., Jorda, M., Fabra, A., Portillo, F., *et al.* (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66, 9543-9556.
- Mort, J. S., and Buttle, D. J. (1997). Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 715-720.
- Motamed, K., Funk, S. E., Koyama, H., Ross, R., Raines, E. W., and Sage, E. H. (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.
- Motamed, K., and Sage, E. H. (1998). SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 70, 543-552.
- Müller, J. (1837). *Handbook of Human Physiology*, (London).
- Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T., and Zabel, B. (1992). Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40, 283-291.
- Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., and Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, *in vitro*. *FEBS Lett* 280, 307-310.
- Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesion activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The Journal of Clinical Investigation* 107, 785-790.
- Nguyen, Q. D., De Wever, O., Bruyneel, E., Hendrix, A., Xie, W. Z., Lombet, A., Leibl, M., Mareel, M., Gieseler, F., Bracke, M., and Gespach, C. (2005). Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene* 24, 8240-8251.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270, 2109-2119.
- Nomura, S., Wills, A. J., Edwards, D. R., Heath, J. K., and Hogan, B. L. M. (1988). Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by *in situ* hybridization. *The Journal of Cell Biology* 106, 441-450.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nozaki, M., Sakurai, E., Raisler, B. J., Baffi, J. Z., Witta, J., Ogura, Y., Brekken, R. A., Sage, E. H., Ambati, B. K., and Ambati, J. (2006). Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. *J Clin Invest* 116, 422-429.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T., and Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145, 204-220.
- Otsuka, K., Yao, K. L., Wasi, S., Tung, P. S., Aubin, J. E., Sodek, J., and Termine, J. D. (1984). Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 9805-9812.
- Paradies, N. E., and Grunwald, G. B. (1993). Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res* 36, 33-45.
- Park, C. C., Bissell, M. J., and Barcellos-Hoff, M. H. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 6, 324-329.
- Parker, B. S., Argani, P., Cook, B. P., Liangfeng, H., Chartrand, S. D., Zhang, M., Saha, S., Bardelli, A., Jiang, Y., St Martin, T. B., *et al.* (2004). Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 64, 7857-7866.
- Pavasant, P., Yongchaitrakul, T., Pattamapun, K., and Arksornnukit, M. (2003). The synergistic effect of TGF-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol* 48, 717-722.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-21123.

- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551-3567.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., and Vulpe, C. D. (2008). Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* *8*, 1744-1749.
- Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* *316*, 1324-1331.
- Podgorski, I., and Sloane, B. F. (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp*, 263-276.
- Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E., and Llera, A. S. (2008). The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* *27*, 691-705.
- Porter, P. L., Sage, E. H., Lane, T. F., Funk, S. E., and Gown, A. M. (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., Krieg, T., and Engel, J. (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, L. G., Bravo, A. I., Alvarez, M. J., Carbone, C., and Podhajcer, O. L. (2007). SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol* *127*, 2618-2628.
- Pungercar, J. R., Caglic, D., Sajid, M., Dolinar, M., Vasiljeva, O., Pozgan, U., Turk, D., Bogyo, M., Turk, V., and Turk, B. (2009). Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J* *276*, 660-668.
- Qi, J., Chen, N., Wang, J., and Siu, C. H. (2005). Transendothelial Migration of Melanoma Cells Involves N-Cadherin-mediated Adhesion and Activation of the {beta}-Catenin Signaling Pathway. *Mol Biol Cell* *16*, 4386-4397.
- Raines, E. W., Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Ross, R., and Sage, E. H. (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.
- Reed, M. J., Vernon, R. B., Abrass, I. B., and Sage, E. H. (1994). TGF- β 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *Journal of Cellular Physiology* *158*, 169-179.
- Reisenauer, A., Eickelberg, O., Wille, A., Heimburg, A., Reinhold, A., Sloane, B. F., Welte, T., and Buhling, F. (2007). Increased carcinogenic potential of myeloid tumor cells induced by aberrant TGF- β 1-signaling and upregulation of cathepsin B. *Biol Chem* *388*, 639-650.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* *24*, 742-752.
- Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Fisher, J. L., Maile, M., and 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, S. A., Hawley, R. C., Gutierrez, J. A., Mouzon, E., Bobbitt, K. R., Lemke, N., Schultz, C. R., Schultz, L. R., Golembieski, W., Koblinski, J., *et al.* (2007). Splenic and immune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of immune response. *Genes Immun* *8*, 262-274.
- Rentz, T. J., Poobalarahi, F., Bornstein, P., Sage, E. H., and Bradshaw, A. D. (2007). SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* *282*, 22062-22071.
- Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatie, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2006a). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* *66*, 7516-7523.
- Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatie, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2006b). SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development
- 10.1158/0008-5472.CAN-05-3189. *Cancer Res* *66*, 7516-7523.

- Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K., and Galappathi, K. (2006a). Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 66, 6699-6707.
- Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K., and Galappathi, K. (2006b). Acidic Extracellular pH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice
10.1158/0008-5472.CAN-06-0983. *Cancer Res* 66, 6699-6707.
- Romberg, R. W., Werness, P. G., Lollar, P., Riggs, B. L., and Mann, K. G. (1985). Isolation and characterization of native adult osteonectin. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 2728-2736.
- Rosenblatt, S., Bassuk, J. A., Alpers, C. E., Sage, E. H., Timpl, R., and Preissner, K. T. (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.
- Roshy, S., Sloane, B. F., and Moin, K. (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 22, 271-286.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., *et al.* (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Rumpfer, G., Becker, B., Hafner, C., McClelland, M., Stolz, W., Landthaler, M., Schmitt, R., Bosserhoff, A., and Vogt, T. (2003). Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol* 12, 761-771.
- Sage, E. H., Bassuk, J. A., Yost, J. C., Folkman, M. J., and Lane, T. F. (1995). Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca²⁺ binding EF-hand sequence. *Journal of Cellular Biochemistry* 57, 127-140.
- Sage, E. H., Johnson, C., and 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, E. H., Vernon, R., Funk, S., Everitt, E., and Angello, J. (1989a). SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading *in vitro* and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 109, 341-356.
- Sage, E. H., Vernon, R. B., Decker, J., Funk, S., and Iruela-Arispe, M. L. (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., Pritzl, P., and Bornstein, P. (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* 1, 427-442.
- Said, N., Najwer, I., and Motamed, K. (2007a). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol* 170, 1054-1063.
- Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D., and Motamed, K. (2007b). Normalization of the Ovarian Cancer Microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 5, 1015-1030.
- Sangaletti, S., Stoppacciaro, A., Guiducci, C., Torrisi, M. R., and Colombo, M. P. (2003). Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med* 198, 1475-1485.
- Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G., and Timpl, R. (1997a). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* 272, 9237-9243.
- Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G., and Timpl, R. (1997b). 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, G. h., and 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.
- Savani, R. C., Zhou, Z., Arguiri, E., Wang, S., Vu, D., Howe, C. C., and DeLisser, H. M. (2000). Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC. *American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology* 279, L743-750.

- Schellings, M. W., Vanhoutte, D., Swinnen, M., Cleutjens, J. P., Debets, J., van Leeuwen, R. E., d'Hooge, J., Van de Werf, F., Carmeliet, P., Pinto, Y. M., *et al.* (2009). Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *J Exp Med* 206, 113-123.
- Schiemann, B. J., Neil, J. R., and Schiemann, W. P. (2003a). SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the TGF-beta-signaling system. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3977-3988.
- Schiemann, B. J., Neil, J. R., and Schiemann, W. P. (2003b). SPARC Inhibits Epithelial Cell Proliferation in Part through Stimulation of the Transforming Growth Factor- β -Signaling System. *Mol Biol Cell* 14, 3977-3988.
- Schwarzbauer, J. E., Musset-Bilal, F., and Ryan, C. S. (1994). Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Enzymology* 245, 257-270.
- Schwarzbauer, J. E., and Spencer, C. S. (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.
- Shevchenko, A., Loboda, A., Ens, W., Schraven, B., and Standing, K. G. (2001). Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 1194-1203.
- Shi, Q., Bao, S., Song, L., Wu, Q., Bigner, D. D., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2007). Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 26, 4084-4094.
- Shiba, H., Uchida, Y., Kamihagi, K., Sakata, M., Fujita, T., Nakamura, S., Takemoto, T., Kato, Y., and Kurihara, H. (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.
- Shibamura, M., Mashimo, J., Mita, A., Kuroki, T., and 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.
- Silye, R., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Poole, S., van Noorden, S., Batchelor, W., Regele, H., Sega, W., Boesmueller, H., Krausz, T., and Pignatelli, M. (1998). E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186, 350-355.
- Sloane, B. F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B. E., Cher, M. L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Dosescu, J., and Moin, K. (2005). Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 15, 149-157.
- Smit, D. J., Gardiner, B. B., and Sturm, R. A. (2007). Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 121, 2653-2660.
- Soderling, J. A., Reed, M. J., Corsa, A., and Sage, E. H. (1997). Cloning and expression of murine SC1, a gene product homologous to SPARC. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45, 823-835.
- Sosa, M. S., Girotti, M. R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J. A., Gallango, S. J., Albar, J. P., Podhajcer, O. L., and Llera, A. S. (2007). Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics* 7, 4123-4134.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M., and Sodek, J. (1983). Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219, 1329-1331.
- Steen, H., and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699-711.
- Stenner, D. D., Romberg, R. W., Tracy, R. P., Katzmann, J. A., Riggs, B. L., and Mann, K. G. (1984). Monoclonal antibodies to native noncollagenous bone-specific proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81, 2868-2872.
- Sturm, R. A., Satyamoorthy, K., Meier, F., Gardiner, B. B., Smit, D. J., Vaidya, B., and Herlyn, M. (2002). Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res* 62, 226-232.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376, 952-965.

- Swaroop, A., Hogan, B. L. M., and 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.
- Sweeney, S. M., Orgel, J. P., Fertala, A., McAuliffe, J. D., Turner, K. R., Di Lullo, G. A., Chen, S., Antipova, O., Perumal, S., Ala-Kokko, L., *et al.* (2008). Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem* 283, 21187-21197.
- Sweetwyne, M. T., Brekken, R. A., Workman, G., Bradshaw, A. D., Carbon, J., Siadak, A. W., Murri, C., and Sage, E. H. (2004). Functional analysis of the matricellular protein SPARC with novel monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 52, 723-733.
- Szpaderska, A. M., and Frankfater, A. (2001). An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* 61, 3493-3500.
- Taghizadeh, F., Tang, M. J., and Tai, I. T. (2007). Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine-induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy-resistant colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 6, 309-317.
- Tai, I. T., Dai, M., Owen, D. A., and Chen, L. B. (2005). Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest* 115, 1492-1502.
- Tai, I. T., and Tang, M. J. (2008). SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 11, 231-246.
- Tarin, D., Thompson, E. W., and Newgreen, D. F. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65, 5996-6000; discussion 6000-5991.
- Termine, J. D., Kleiman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., and Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., and Narechania, A. (2003a). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 13, 2129-2141.
- Thomas, P. D., Kejariwal, A., Campbell, M. J., Mi, H., Diemer, K., Guo, N., Ladunga, I., Ulitsky-Lazareva, B., Muruganujan, A., Rabkin, S., *et al.* (2003b). PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 31, 334-341.
- Thompson, J. F., Scolyer, R. A., and Kefford, R. F. (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365, 687-701.
- Towatari, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., and Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Lett* 280, 311-315.
- Tsao, H., Atkins, M. B., and Sober, A. J. (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 351, 998-1012.
- Unlu, M., Morgan, M. E., and Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Valyi-Nagy, I. T., Hirka, G., Jensen, P. J., Shih, I. M., Juhasz, I., and Herlyn, M. (1993). Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab Invest* 69, 152-159.
- Vernon, R. B., and 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.
- Waerner, T., Alacakaptan, M., Tamir, I., Oberauer, R., Gal, A., Brabletz, T., Schreiber, M., Jechlinger, M., and Beug, H. (2006). ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. *Cancer Cell* 10, 227-239.
- Wang, H., Workman, G., Chen, S., Barker, T., Ratner, B., Sage, E., and Jiang, S. (2005). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC/osteonectin/BM-40) binds to fibrinogen fragments D and E, but not to native fibrinogen. *Matrix Biol*.
- Wasi, S., Otsuka, K., Yao, K. L., Tung, P. S., Aubin, J. E., Sodek, J., and Termine, J. D. (1984). An osteonectinlike protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 62, 470-478.

- Weaver, M. S., Workman, G. A., and Sage, E. H. (2008). The copper-binding domain of sparc mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta 1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 23, 23.
- Welton, J. L., Khanna, S., Giles, P. J., Brennan, P., Brewis, I. A., Staffurth, J., Mason, M. D., and Clayton, A. (2010). Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics* 9, 1324-1338.
- Wendt, M. K., Allington, T. M., and Schiemann, W. P. (2009). Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* 5, 1145-1168.
- Weng, L. P., Wu, C. C., Hsu, B. L., Chi, L. M., Liang, Y., Tseng, C. P., Hsieh, L. L., and Yu, J. S. (2008). Secretome-based identification of Mac-2 binding protein as a potential oral cancer marker involved in cell growth and motility. *J Proteome Res* 7, 3765-3775.
- West BT., W. K. a. G. A. (2007). *Linear Mixed Models: A practical guide using statistical software* (Boca Raton, USA).
- Wiese, A. H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., Ruger, R., and Werner, M. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev* 31, 282-295.
- Wrana, J. L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K. L., Domenicucci, C., and Sodek, J. (1988). Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106, 915-924.
- Wrana, J. L., Overall, C. M., and Sodek, J. (1991). 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.
- Yan, Q., and Sage, E. H. (1999). SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47, 1495-1506.
- Yang, Z., and Cox, J. L. (2007). Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. *Cancer Cell Int* 7, 8.
- Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 159, 609-622.
- Young, B. A., Wang, P., and Goldblum, S. E. (1998). The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251, 320-327.
- Yunker, C. K., Golembieski, W., Lemke, N., Schultz, C. R., Cazacu, S., Brodie, C., and Rempel, S. A. (2008). SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion. *Int J Cancer* 122, 2735-2743.
- Zavadil, J., and Bottinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774.
- Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429-1437.
- Zhou, X., Tan, F. K., Guo, X., and Arnett, F. C. (2006). Attenuation of collagen production with small interfering RNA of SPARC in cultured fibroblasts from the skin of patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 54, 2626-2631.
- Zhou, X., Tan, F. K., Guo, X., Wallis, D., Milewicz, D. M., Xue, S., and Arnett, F. C. (2005a). Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum* 52, 257-261.
- Zhou, Y., Zhang, J., Liu, Q., Bell, R., Muruve, D. A., Forsyth, P., Arcellana-Panlilio, M., Robbins, S., and Yong, V. W. (2005b). The chemokine GRO-alpha (CXCL1) confers increased tumorigenicity to glioma cells. *Carcinogenesis* 26, 2058-2068.