Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

# Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en el crecimiento y diseminación metastásica del cáncer de mama

Benedetti, Lorena Gabriela

2011-12-21

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:
Benedetti, Lorena Gabriela. (2011-12-21). Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en el crecimiento y diseminación metastásica del cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Benedetti, Lorena Gabriela. "Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en el crecimiento y diseminación metastásica del cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011-12-21.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en el crecimiento y diseminación metastásica del cáncer de mama.

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

**Lic. Lorena Gabriela Benedetti**

Director de tesis: Dr. Osvaldo Luis Podhajcer

Consejero de Estudios: Dra. Graciela Lidia Boccaccio

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, Laboratorio de Terapia Molecular y Celular

Buenos Aires, 2011.

Introducción ..... 1

Evolución del concepto de tumor ..... 1

El proceso de transformación maligna no termina en el tumor primario: mecanismos de invasión y metástasis ..... 3

La matriz extracelular ..... 6

Las integrinas y su interacción con la MEC ..... 7

El proceso de adhesión celular ..... 8

Las proteínas matricelulares y su relación con la adhesión ..... 9

SPARC ..... 11

Funciones Biológicas de SPARC: remodelación de la matriz extraceular, proliferación, adhesión y regulación de la respuesta inmune. ..... 17

Interacción de SPARC con otras proteínas ..... 21

El cáncer de mama: origen y evolución ..... 23

SPARC y cáncer ..... 23

SPARC en cáncer de mama ..... 33

Objetivos ..... 37

Hipótesis del trabajo ..... 37

Objetivo general ..... 38

Objetivos específicos ..... 38

Modelos de estudio ..... 40

Capítulo I Búsqueda de modelos y generación de herramientas que nos permitan evaluar el rol de SPARC en el desarrollo del cáncer de mama. ..... 41

Capítulo II Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento del cáncer de mama humano. ..... 50

Capítulo III Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento y la diseminación metastásica en un modelo murino de cáncer de mama en ratones inmunocompetentes. ..... 83

Efecto de la modulación endógena de SPARC sobre el fenotipo maligno del cáncer de mama utilizando un modelo murino inmunocompetente. ..... 84

Capítulo IV Búsqueda de mediadores de la función biológica de SPARC en cáncer de mama, mediante la técnica de microarreglos de ADN. ..... 102

Experimento de microarreglo in vitro. ..... 103

Experimento de microarreglo in vivo. ..... 122

Discusión ..... 158

Capítulo I: Búsqueda de modelos y generación de herramientas para evaluar el rol de SPARC en cáncer de mama ..... 158

Capítulo II Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento del cáncer de mama humano ..... 160

Capítulo III Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento y la diseminación metastásica en un modelo murino de cáncer de mama en ratones inmunocompetentes. ..... 166

Capítulo IV Búsqueda de mediadores de la función biológica de SPARC en cáncer de mama, mediante la técnica de microarreglos de ADN. ..... 167

Conclusiones ..... 176

Materiales y métodos ..... 178

Cultivos Celulares ..... 178

Mantenimiento de líneas celulares ..... 179

Producción y generación de vectores Lentivirales ..... 179

Preparación de plásmidos a mediana escala ..... 179

Generación de los vectores lentivirales ..... 179

Secuenciación de ADN ..... 180

Producción de lentivirus ..... 180

Transducción de células IBH-6 y 4T1 con los vectores lentivirales ..... 180

Clonado de la secuencia de SPARC de ratón en un vector de expresión ..... 181

Western blot de medios condicionados y extractos celulares ..... 181

Obtención de medios condicionados ..... 181

Cuantificación de proteínas totales en medios condicionados ..... 182

Obtención de extractos celulares ..... 182

Western blot ..... 183

Purificación de SPARC a partir de medio condicionado de células de melanoma humano, A375 ..... 184

Obtención de ARN para experimentos de PCR en tiempo real y de microarreglos de ADN. ... 186

Obtención de ARN ..... 186

Cuantificación y control de calidad del ARN ..... 186

Retrotranscripción y cuantificación del ADN copia para RT-PCR y PCR en tiempo real. ..... 188

Ensayos de microarrelgos de ADN ..... 191

Generación de la colonia de ratones transgénicos Nu/Nu SP+/+ y SP-/- ..... 194

Genotipificación de los animales ..... 194

Experimentos *in vivo* ..... 195

Condiciones experimentales de crecimiento tumoral ..... 195

Marcación de las células con CMDiI ..... 196

Ensayo de metástasis experimentales ..... 196

Detección de células circulantes utilizando el bioluminómetro ..... 196

Fijación de pulmones con Bouin ..... 197

Inmunomarcaciones y tinciones histológicas ..... 197

Inmunocitoquímica ..... 197

Inmunohistoquímica ..... 197

Inmunohistoquímica de las muestras incluidas en OCT ..... 198

Ensayo control de especificad del anticuerpo de SPARC por bloqueo con la proteína ..... 199

Tinción Inmunoflourescente ..... 199

Tinción tricrómica de Masson y cuantificación de colágeno ..... 200

Tinción con hematoxilina-eosina ..... 200

Estudios realizados con muestras de pacientes ..... 200

Análisis histopatológico ..... 200

Datos analizados ..... 201

Procesamiento de las imágenes ..... 201

Análisis estadístico ..... 202

Ensayos *in vitro* ..... 202

Ensayo de migración en fibronectina o invasión en Matrigel ..... 202

Ensayos de invasión en esferas de Matrigel ..... 203

Ensayos de proliferación in vitro ..... 203

Citometría de flujo ..... 204

Marcación con BrdU ..... 204

Marcación con Histona H3 fosforilada ..... 205

Análisis estadístico ..... 205

Referencias bibliográficas ..... 206

# Resumen

**“Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en el crecimiento y diseminación metastásica del cáncer de mama”**

El crecimiento tumoral resulta de la interacción de la célula neoplásica y su entorno. SPARC “*Secreted Protein Acid and Rich in Cystein*” es una proteína de matriz extracelular cuya expresión normal se asocia al desarrollo y a tejidos en remodelación. En la mayoría de las neoplasias el aumento de la expresión de SPARC se asocia con un mal pronóstico. Sin embargo, en cáncer de mama la función que cumple la expresión de esta proteína en relación al crecimiento del tumor primario y la diseminación metastásica es controvertida. En este trabajo nos propusimos profundizar las funciones de SPARC, proveniente tanto del estroma como de las células epiteliales en la biología del cáncer de mama.

A partir de los estudios realizados con animales transgénicos (SP-/-) que no expresan SPARC en ninguna de sus células, diferentesmodelos de cáncer de mama humanos con distintos niveles de expresión de SPARC, y la cuantificación de la expresión de la proteína en muestras de pacientes con cáncer de mama, determinamos que la expresión de SPARC en ambos componentes tumorales, epitelio y estroma, favorece el fenotipo maligno. Mientras que la elevada expresión en el epitelio tumoral resultó ser más relevante, encontramos que la expresión de SPARC en el estroma tumoral favorece el crecimiento del tumor sólo si el epitelio es negativo.

Por otro lado, mediante la utilización del modelo murino 4T1, representativo de un tumor humano estadio IV, pudimos establecer una relación positiva entre la expresión de SPARC y la etapa metastásica de la enfermedad. A partir de la tecnología de microarreglos de ADN, encontramos que SPARC es un importante modulador transcripcional del espacio extracelular y de la proliferación celular, así como también de la respuesta inmune. Finalmente identificamosalgunos genes como posibles efectores de SPARC, favorecedores del crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

**Palabras Clave**: SPARC, cáncer de mama, matriz extracelular, estroma tumoral, metástasis, microarreglos de ADN.

# Abstract

**“Role of the matricelullar protein SPARC in the primary tumor growth and metastatic dissemination in breast cancer”**

Tumor growth is the result of the crosstalkbetween neoplastic cells and theirmicroenvironment.SPARC “*Secreted Protein Acid and Rich in Cystein*” is a matricellular protein whose normal expression is associated with remodeling tissues. Despite some authors describe this protein as a marker of bad prognosis, its role during development and breast cancer progression remains controversial.Our goal was to understand the role of SPARC expressed either by the epithelial cells or by the surrounding stroma in tumor growth and metastatic dissemination of breast cancer.

Using SPARC KO mice (SP-/-), human breast cancer lines with different SPARC expression levels, and the quantification of SPARC expression in human breast cancer samples, we were able to determine that both, epithelial and stromal SPARC contributes to tumor progression. While high epithelial SPARC expressionis more relevant, stromal SPARC only facilitates tumor growth in the presence of a SPARC negative epithelium.

Moreover, using 4T1 murine model that very closely models a stage IV human breast carcinoma, we established a positive relation between SPARC expression and the metastatic stage of the disease. DNA microarray data revealed SPARC as an important transcriptional regulator of the extracellular region part, cellular proliferation and an immune response modulator. We identified some new genes as possible effectors of SPARC that regulate tumor growth and metastatic dissemination.



**Keywords**: SPARC, breast cancer, extracellular, tumor stroma, metastasis, DNA microarryas ADN.

# Agradecimientos

Muchas veces imagine este momento, todas ellas me invadió una enorme emoción. Es difícil de explicar lo que se siente cuando uno logra plasmar en unas hojas el trabajo conjunto de varias personas. Todos aquellos que me conocen saben las lágrimas brotan fácilmente de mis ojos. Al finalizar la defensa de este trabajo, lo más probable es que no pueda hablar, con lo cual espero dedicar en este espacio un pequeño homenaje a todas aquellos que colaboraro en mayor o medida, para que esta tesis se concretara.

**Del Lab 107**

-Tengo que comenzar agradeciéndole a "Fede" que fue quien me descubrió hace más de siete años en las clases del laboratorio de QBIIA y me recomendó ante Osvaldo para que pasara a formar parte del actual "Laboratorio de Terapia Molecular y Celular," en aquella época Laboratorio de Terapia Génica. Con Fede compartí los primeros años de mesada, mi primer "paper", largas jornadas en cultivo amplificando fibroblastos, incontables western blots, acaloradas discusiones, horas de clases y muchas cosas más, entre ella una hermosa amistad.

-A Osvaldo, por haberme dado un lugar en el laboratorio, por haberse hecho cargo de marcar el rumbo de esta tesis, y por haberme dado la posibilidad de crecer en mi carrera.

-A Andre, por la invaluable colaboración en la corrección, análisis e interpretación de los resultados. Apoyo moral, oreja y cable a tierra en momentos de elevada tensión. Es por personas como vos, que tratan a sus compañeros con cariño y respeto, que los ayudan a crecer y se preocupan por su futuro, que disfruto cada día de mi trabajo. No tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste, seguiremos en contacto a la distancia… Gracias totales!

-A Romi y Marian, mis amigas del instituto, con quienes compartí horas de trabajo, viajes, risas y llantos. Crecimos juntas laboralmente y construimos una amistad que sigue a la distancia. No sé si volveremos a coincidir en una misma institución en el futuro, cada una tomo un camino diferente pero supimos construir una amistad que va más allá de las distancias, las quiero!

-A Ceci por el trabajo compartido, el beneficio mutuo de los resultados, el cariño y afecto con el que siempre me trato. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, por preocuparte y cuidarme con el cariño de una madre….Ceci te voy a extrañar!

-A Flor, Pía y Lean, con quienes más de cerca alguno de los experimentos de esta tesis. Gracias por estar siempre dispuestos a darme una mano y a aprender juntos, gracias por la buena onda y las horas de trabajo compartidas. Un placer haber trabajado codo a codo en la mesada con ustedes.

-A Caffe por las charlas de ciencia, ocio y radio pasillo, es bueno estar informado….Gracias por ser un "compañero de lujo", compartir tu sabiduría y conocimientos.

-A Ed y Diegote por la ayuda con la instalación de programas, manejo de equipos, comprensión de técnicas. Por mantenerme al tanto de las últimas novedades tecnológicas y en particular a Ed por la ayuda en los experimentos de "microarrays", excelentes compañeros de trabajo.

-A Helga y Felipe, la pata chilena del laboratorio, gracias por ser tan buenos compañeros de trabajo, por compartir sus costumbres y el buen humor de todos los días. Gracias Helguix por el asesoramiento en el cuidado de las plantas!

-A Vero, Mariel, Leo, Santi, Edu por la ayuda, las charlas de pasillo y los ratos de mesada compartidas. En particular a Vero por ser una líder innata y gran compañera, siempre dispuesta a ayudar.

-A la Monica, Juan y toda la gente de biblioteca por la eficiente y excelente labor que realizan.

-A Doris por la sonrisa de cada mañana, el apoyo y el material de lectura! Voy a extrañar los minutos de charla a la mañana, las tardes de compras y los momentos compartidos.

-A Cari y su ojo viejo, gurú de moda y amiga. Portadora de una gran imaginación y fuente inalcanzable de conocimiento y admirable capacidad de almacenar "información útil". Durante esto años descubrí mucho más atributos tuyos, pero la lista se hace casi tan larga como esta tesis….Ferrari, sos una genia!

-A Rodo por las deliciosas recetas compartidas, los asesoramientos de moda e imagen personal. Voy a extrañar tus comentarios objetivos!

-A Marian Berenstein, por los enriquecedores momentos compartidos y el soporte emocional.

-Al running team: Cari, Romi, Marian, Vero y Pato por las gratas horas de trote y actividades al aire libre compartidas.

-A todo el 106, Isa, Vero, Pablo, Cari, Rodo, Pato, Vale por ser tan buenos vecinos y compañeros, y a las chicas que ya no están en el 106, Mariela y Amaicha pero con las que seguimos en contacto.

-A Vanesa y Sabrina por la colaboración en la parte de ciclo celular, en particular a Vanesa por las charlas de anseñanza personal y profesional. Fue un orgullo haber trabajado en colaboración con ustedes.

-A Elmer y Cristóbal por el soporte bioinformático para el análisis e interpretación de los resultados de microarreglos, por la paciencia y las discusiones mantenidas a la distancia.

-A Inés, por todas las horas compartidas frente al microscopio y por haber participado en mi formación histopatológica.

-A “Maxi confocal” por el soporte brindado en la cuantificación de las imágenes.

-A Pancho y Bernabé por los buenos días de cada mañana, y en particular a Pancho por todo lo que haces por nosotros, las ganas de seguir activo y trabajando para los demás. Excelente ejemplo de persona.

-A las chicas del Bioterio, Adriana y Sonia por toda la colaboración en el trabajo con los animales y las infinitas colas cortadas, ya perdí la cuenta pero estaremos por las 400??

-A todas las instituciones que financiaron esta investigación, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el CONYCET y AFULIC.

**Fuera del Lab**

-A mis padres, por haberme enseñado a amar mi profesión y ser responsable con mi trabajo. Por todo el amor y dedicación que pusieron en mi educación, no puedo pedir mejores padres.

-A mis hermanas y a toda mi familia, por el apoyo e interés por saber que estaba haciendo en el laboratorio. Gracias por haber recorrido este camino conmigo y haberme hecho sentir que estaban a mi lado para alentarme en los momentos difíciles. Me siento muy afortunada por la hermosa familia que me toco, y por todo el afecto que me brindan.

-A las chicas de la Facu: Lore I, Liz y Romi, con quienes compartimos exámenes, defensas de tesis, casamientos, hijos, y momentos de grandes alegrías. Amigas que a pesar de todo siempre están, hermanas de la vida, las quiero!!

-A Juli y Pau por esta amistad de toda la vida!

-A Guille y Vani, mi amigos del Roffo, con quienes compartí mis primeros experimentos dentro de un laboratorio, fuente de consulta constante en temas relacionados a lo laboral y excelentes amigos para salir a compartir una cervecita y un momento agradable. En particular gracias Guille por estar siempre para darme una mano en esos momentos en los que más lo necesito!

-A Ale por el aguante, la paciencia, soporte emocional, comprensión, cable a tierra, diseñador 24x24, amo de casa, gran compañero y coautor de esta tesis, no puedo pedir más…..te amo!

*A mis padres,*

*Con todo mi cariño*

# Prólogo

Durante los 7 años que pase en el laboratorio de Terapia Molecular y Celular dirigido por el Dr. Osvaldo Podhajcer, ocurrieron grandes cambios en mi vida personal. Dentro del laboratorio encontré buenos amigos, con los que compartí gratos momentos culinarios, tardes de compras y paseos por el mundo. Fuera del laboratorio, deje las casa de mis padres, conocí al amor de mi vida y tuve hermosas sobrinas. Creo que todas estas experiencias positivas, y de crecimiento de mi vida personal, influenciaron de cierta manera mi crecimiento como profesional. Como me menciono Osvaldo en varias ocasiones, mi forma de pensar y trabajar como "científica" evoluciono muchísimo a lo largo de estos años dentro del laboratorio. Es por ello que estoy sumamente agradecida a todas a las personas que colaboraron para que así sea; dentro del laboratorio compartí momentos inolvidables de risas y llantos pero, lo más importante es que pase la mayor parte de las horas de mis días junto a personas siempre estuvieron dispuestas a ayudarme cuando lo necesite, creo que ese el regalo más valioso que me llevo del "Lab 107."

Esta tesis comenzó con un objetivo que era estudiar el rol de SPARC en cáncer de mama. Para poder alcanzar este objetivo tuve que generar modelos y herramientas, luchar con la biología y aprender variadas metodologías. Creo que tanto trabajo finalmente rindió sus frutos.

Seguramente hay muchas cosas que se relatan en esta tesis, que podrían estar contadas o analizadas de otra manera, quedan varios interrogantes por resolver, pero toda tesis tiene que tener un fin. Espero que los caminos que quedan abiertos puedan ser explorados por los que vengan detrás de mí. Siempre tuve un gran aprecio y respeto por mi trabajo. Mi mayor anhelo es que todo lo realizado a largo de estos años, pueda ser continuado y explotado por otros. En este punto del conocimiento acerca de la evolución del cáncer, puede resultar utópico pensar que vamos a encontrar la "cura contra el cáncer," pero si todos sumamos un pequeño granito de arena, podemos hacer grandes avances en el entendimiento y tratamiento de la enfermedad.

Los resultados producto de esta tesis están en proceso de escritura para su publicación, sin embargo, algunas de las herramientas y modelos desarrollados durante la misma, fueron utilizados en colaboraciones con otros grupos dentro y fuera del laboratorio. Asimismo, parte del conocimiento adquirido en relación a la biología de SPARC fue publicado en dos revisiones.

-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

-Podhajcer, O. L., **Benedetti, L. G.,** Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E., and Llera, A. S. (2008b). *The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host*. Cancer Metastasis Rev *27*, 691-705.

-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

-Atorrasagasti C, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, **Benedetti L**, Friedman SL, Podhajcer OL, Mazzolini GD-*"SPARC down-regulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF-β1 and PDGF"*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Feb 10. Published online before print February 2011, doi: 10.1152/ajpgi.00316.2010

-Girotti, M. R., Fernandez, M., Lopez, J. A., Camafeita, E., Fernandez, E. A., Albar, J. P., **Benedetti, L**. G., Valacco, M. P., Brekken, R. A., Podhajcer, O. L., and Llera, A. S. (2011). *SPARC Promotes Cathepsin B-Mediated Melanoma Invasiveness through a Collagen I/alpha2beta1 Integrin* Axis. J Invest Dermatol *131*, 2438-244

-Lopez, M.V., Viale, D.L., Culleon, C, Kullan, K. Bendetti, L. G, Podhajcer, J.L, Curiel, D. *A tumor-stroma targeted oncolytic adenovirus replicated human ovary cancer samples and cured mice with disseminated solid tumors.*Enviado.

# Abreviaturas

**SPARC (SP)** Secreted protein acidic and rich in cysteine

**MEC** Matriz extracellular

**TEM** transición epitelio mesenquimatica

**CICUAL** Comité para el uso y cuidado de animales de laboratorio

**GO** Gene ontology

**H&E** Hematoxilina y eosina

**FC** Fold change

**P Val** P value

# Introducción

## *Evolución del concepto de tumor*

En el año 1837 Johannes Müller describía que el cáncer "estaba hecho de células", 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.

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. Según este modelo, la masa tumoral se va enriqueciendo de células que adquieren ventajas proliferativas y de sobrevida generadas a partir de alteraciones en genes reguladores del ciclo celular (Nowell, 1976).

Sin embargo, luego de más de un siglo de estudios centrados en la célula tumoral, se produce un cambio en la forma de visualizar a los tumores, cuando se propone que las variaciones que ocurren dentro de la célula tumoral, van acompañadas por alteraciones en la matriz extracelular que es capaz de influenciar la proliferación, invasión y prognosis del tumor (Liotta et al., 1991). Estos descubrimientos, cambian el foco de las investigaciones y llevan a los científicos a pensar en los tumores como redes de interacciones complejas entre células y moléculas.

El siguiente paso fue el descubrimiento de que las células que sufrían la transformación maligna, además de interactuar de madera diferente con la matriz extracelular, eran capaces de modificar otras células. 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, este microambiente tumoral "activado" por el huésped (compuesto por células y componentes extracelulares) modifica el comportamiento proliferativo e invasivo de las células tumorales.

En un intento por explicar el complejo proceso de transformación maligna, Hanahan y Weinberg, en el año 2000, propusieron que existían seis modificaciones en el funcionamiento celular que adquieren las células tumorales, de cualquier origen, durante la transformación maligna: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del

crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), replicación ilimitada, inducción de angiogénesis, activación de mecanismos de invasión de tejidos y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000).

Este año, Hanahan y Weinberg reformularon sus “Hallmarks of Cancer”, agregado dos nuevas alteraciones. Una de ellas implica la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular, a fin de apoyar más eficazmente la proliferación neoplásica. La segunda alteración, permite a las células cancerosas evadir la destrucción inmunológica, mediada principalmente por los linfocitos T y B, los macrófagos y las células NK (Microambiente inflamatorio).

Asimismo, postulan que la adquisición del fenotipo tumoral, es posible gracias a un ambiente permisivo, generado a partir de dos “características habilitantes”: la inestabilidad genómica y mutaciones y la promoción de la inflamación. Además, proponen que las células tumorales deben adquirir otros atributos durante la progresión tumoral. Uno de ellos está relacionado con un ajuste del metabolismo destinado a alimentar el crecimiento y proliferación celular, y el otro, es la activación mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, esta última característica relacionada a la capacidad del sistema inmune de eliminar tumores aún no sido confirmada fehacientemente. (Hanahan and Weinberg, 2011)

La visión general de lo que hoy se conoce como proceso de transformación maligna y los eventos biológicos que contribuyen al establecimiento de un tumor se resumen en la Figura 1 (Adaptada de Hanahan y Weinberg, 2011)

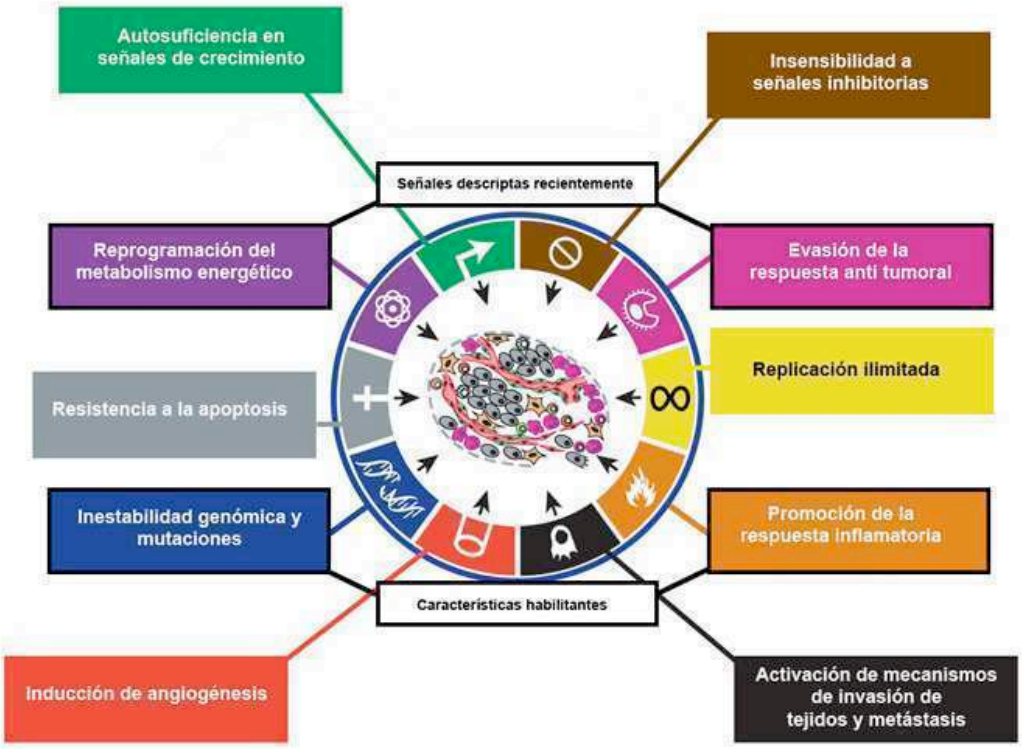



**Figura 1Eventos que llevan a la transformación maligna.**Resumen de las características que adquieren las células epiteliales y estromales durante el proceso de transformación maligna. Imagen adaptada de Hanahan y Weinberg, 2011.

En base a lo descripto anteriormente, los estudios destinados a comprender la biología tumoral, deben estar basados en la comprensión tanto de la propia célula tumoral, como del microambiente que ellas generan durante la transformación maligna.

## *El proceso de transformación maligna no termina en el tumor primario: mecanismos de invasión y metástasis*

A medida que las células epiteliales evolucionan hacia grados patológicos más agresivos, adquieren características que les permiten primero invadir el tejido localmente, degradando la membrana basal, para luego generar metástasis a distancia. Mientras que la resección quirúrgica y la terapia neo-adyuvante logran controlar de manera efectiva el crecimiento del tumor primario, el estadio metastásico de la enfermedad es incurable, debido a su diseminación sistémica y resistencia a agentes quimioterapéuticos.

Es por ello que resulta de suma importancia, para la generación de terapias efectivas, lograr entender los mecanismos moleculares responsables de lo que se conoce como “cascada

metastásica." (Fidler, 2003). Esta cascada describe las etapas por las que debe transitar una célula epitelial que sale del tumor primario, hasta la colonización del órgano blanco para generar una metástasis macroscópica. El proceso comienza con la invasión local del tejido, y continúa con: la entrada de las células tumorales en los vasos sanguíneos y linfáticos (intravasación), sobrevida en el torrente sanguíneo, arresto en el órgano blanco, salida de los vasos hacia el parénquima de tejidos distantes (extravasación), formación de pequeñosnodos de células tumorales (micrometástasis) y finalmente, el crecimiento de estas micrometástasis que terminarán formando las metástasis macroscópicas. Este último paso se denomina "colonización". Cada una de las etapas de la cascada metastásica está orquestada tanto por la activación de diversas vías de señalización dentro de la célula tumoral, como por el establecimiento de interacciones entre la célula tumoral y el estroma al cual la célula neoplásica se ve enfrentado. Si bien el conocimiento de los mediadores moleculares que gobiernan cada uno de estos pasos ha crecido muchísimo durante los últimos cinco años, todavía no se han logrado avances efectivos en el tratamiento molecular. Los mediadores moleculares más relevantes conocidos hasta el momento para cada uno de los pasos de la cascada metastásica se resumen en la Figura 2(Valastyan and Weinberg, 2011).

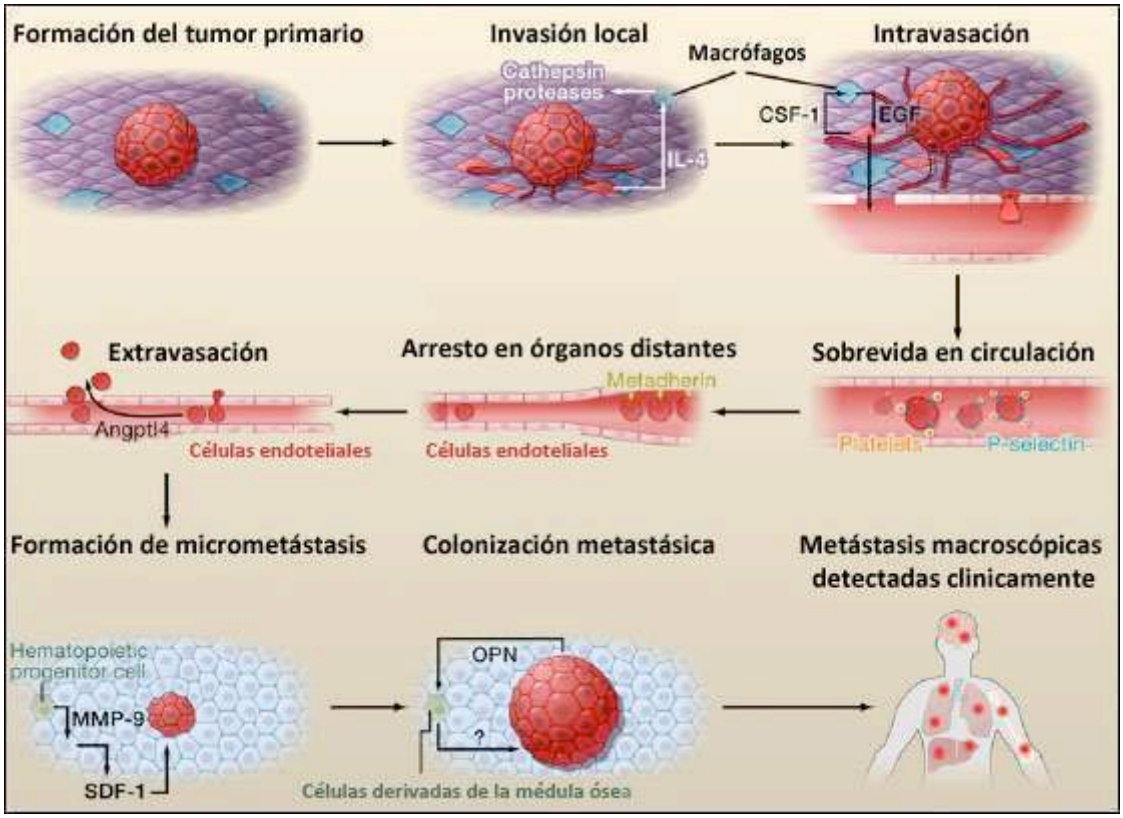



**Figura 2. Mediadores moleculares a lo largo de la cascada metastásica.** Imagen tomada de Valastian, 2011, donde se representan los mediadores moleculares más relevantes conocidos hasta el momento. Durante la etapa de invasión local, la secreción de IL-4 par parte de las células tumorales dispara la actividad de catepsin-proteasas en los macrófagos asociados al tumor (TAM), favoreciendo la invasión de las células tumorales. La intravasación de las células epiteliales tumorales es favorecida por la secreción recíproca de EGF, por parte del epitelio y por la secreción de CSF-1 por parte de los TAM. La sobrevida en circulación y evasión de la detección del sistema inmune se logra gracias a la interacción con plaquetas para formar émbolos y la expresión de P y L-Selectina por parte de las células tumorales. La expresión de Metadherin en las células tumorales favorece la llegada al pulmón y la unión a la vasculatura pulmonar. La disrupción de la vasculatura pulmonar e ingreso al pulmón es facilitada por la expresión de Angptl4. A fin de colonizar el nuevo microambiente, las células tumorales secretan factores que reclutan células progenitoras hematopoieticas, que son las encargadas de generar un microambiente propicio para la formación de las metástasis a partir de la secreción de MMP9 y SDF-1. Se cree que la llegada de las células hematopoieticas al órgano blanco es previa a la llegada de las células tumorales. Finalmente, la colonización del pulmón se logra debido al reclutamiento de células derivadas de la médula ósea en respuesta a la secreción de OPN y SDF-1 por parte de las células tumorales.

En los últimos años, tomó fuerza la idea de que las células podían alterar su genotipo hacia un estado de menor diferenciación, que implica que las células epiteliales tumorales adquieran características de células mesenquimales, que les permitan migrar y colonizar tejidos distantes. Este proceso se denomina Transición Epitelio- Mesenquimal (TEM), y está orquestado por un grupo de factores de transcripción que incluyen a Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 (Thiery et al., 2009). Entre los cambios asociados a la adquisición del fenotipo Mesenquimal se encuentran: la pérdida de uniones adherentes y polaridad celular, mediadas por la pérdida de la expresión de E-Cadherina y la expresión de N-Cadherina, una conversión en la morfología de

poligonal/epitelial a ahusada/fibroblastoidea, expresión de enzimas que degradan la matriz, aumento en la motilidad celular y resistencia a la apoptosis. Todas esta características se encuentran directamente asociadas al proceso de invasión y metástasis (Peinado et al., 2004). Asimismo, las evidencias sugieren que las interacciones heterotípicas entre las células epiteliales y el estroma asociado al tumor serían las responsables de inducir la TEM en las células epiteliales (Karnoub and Weinberg, 2006).

### *La matriz extracelular*

En el año 1850, ya se reconocía que el material fuera de las células era producido por las células, y se lo denominaría 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 comprende la regulación de la proliferación, diferenciación, migración e interacciones intercelulares como así también de soporte mecánico. La red macromolecular, está compuesta básicamente por: colágenos, elastina, glicoproteínas y proteoglicanos que son secretadas por fibroblastos, células epiteliales y endoteliales entre otras, y favorecen la señalización que promueve la supervivencia celular. La abundancia relativa, la distribución de las proteínas y la organización molecular de los componentes de la matriz extracelular varían enormemente entre los tejidos dependiendo de su estructura y función. Además de estas proteínas que cumplen funciones estructurales existe otro grupo de proteínas presentes en la matriz denominadas proteínas matricelulares. Este grupo de proteínas modulan la interacción célula-matriz, favoreciendo un estado de adhesión intermedio caracterizado por la disrupción de los contactos focales de adhesión y reorganización de fibras de estrés. (Bornstein, 2000).

Entre las proteínas matricelulares encontramos a: SPARC, Trombospondina 1 y 2, CCN, Osteopontina y familia de tenascinas.

Existen características comunes a este grupo de proteínas (Sage, 2001):

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

Existe también un tipo especializado de matriz extracelular denominado membrana basal, que es una capa de 50-100 nm compuesta por una compleja mezcla de proteínas de matriz extracelular que se encuentra en forma basolateral a todas las monocapas celulares del organismo: epitelios y endotelios. La membrana basal separa estas monocapas 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. La membrana basal representa una barrera de contención para el tumor primario, el cual debe degradar esta matriz especializada para poder invadir.

## *Las integrinas y su interacción con la MEC*

La importancia de matriz extracelular ha quedado claramente demostrada, asimismo, las interginas revisten igual importancia que la MEC. Estas moléculas funcionan como nexo entre la MEC y el citoesqueleto permitiendo la adhesión y la migración de las células que las expresan (Hynes and Zhao, 2000). Esta familia de proteínas transmembrana, compuesta por 18 subunidades $\alpha$ y 8 subunidades $\beta$, que dimerizan para formar 24 diferentes heterodímeros conocidos (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Estos receptores no sólo reconocen proteínas de la MEC como el colágeno y la laminina sino que, con su dominio extracelular, pueden unirse a otros receptores celulares como VCAM-1 o ICAM-1 promoviendo interacciones célula-célula. Se dice que el sistema es promiscuo, ya que algunos ligandos pueden ser reconocidos por más de una integrina y, al mismo tiempo, ciertas integrinas son capaces de reconocer más de un ligando.

El dominio citoplasmático de las integrinas interacciona, directa o indirectamente, con el citoesqueleto de actina, funcionando de puente entre el citoesqueleto y la MEC (Liu and Burridge, 2000). Dado que se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática y poseen dominios tanto intra como extracelulares, las integrinas funcionan como moléculas transductoras de señales bidireccionales.

## *El proceso de adhesión celular*

La adhesión celular y el consecuente estiramiento sobre un sustrato, son requisitos esenciales para el apropiado crecimiento y supervivencia de las células. La falta de interacción de una célula con un sustrato que le permita adherirse, puede disparar un tipo particular de muerte celular denominada **anoikis**(Frisch and Ruoslahti, 1997).

El proceso de adhesión celular es un proceso reversible que ocurre en tres pasos: **adhesión** propiamente dicha, **estiramiento** y formación de complejos focales de adhesión, y por último, la formación de **contactos de adhesión focal** y fibras de estrés(Murphy-Ullrich et al., 1991)**.**

Durante la **adhesión**, se produce la interacción inespecífica entre ciertos receptores integrales de membrana, de tipo integrinas, con componentes de la MEC. Luego sigue el proceso de **estiramiento,** donde las células aumentan la superficie de contacto con la MEC. Este evento depende del reclutamiento de proteínas citoplasmáticas como Scr, de la fosforilación de paxilina (Richardson et al., 1997) y de la actividad de pequeñas proteínas G como Rac y Cdc42 (Price et al., 1998). Por último, las células organizan los filamentos de actina en grades cordones denominados fibras de estrés, generando una gran tensión sobre los complejos focales, reorganizándolos en los llamados **contactos de adhesión focal**.

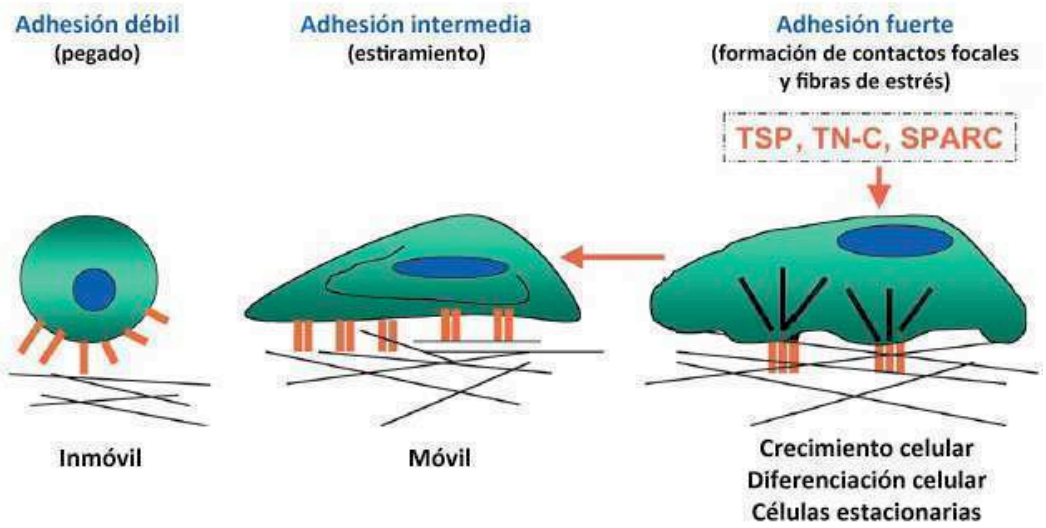



**Figura 3 Las proteínas matricelulares participan del estado de adhesión.** Durante el proceso de adhesión, la célula se pega, se estira y forma fibras de estrés y contactos focales de adhesión. Con cada cambio de estado, la fuerza de adhesión se incrementa. El proceso de de-adhesión es la transición 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)

Como se mencionara anteriormente, las proteínas matricelulares, que actúan como adaptadores o moduladores de la interacción célula-MEC, pueden inducir la adhesión y el estiramiento celular, sin embargo son incapaces de inducir la formación de fibras de adhesiones focales y fibras de estrés (Murphi-Ullrich, 2001). Las proteínas matricelulares pueden encontrarse en solución dentro de la matriz o unidas al sustrato. Cuando se encuentran en forma soluble, poseen actividad anti-adhesiva generada por la reorganización de las fibras de estrés y el desensamblado de las adhesiones focales(Greenwood and Murphy-Ullrich, 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 más 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.

## *Las proteínas matricelulares y su relación con la adhesión celular*

### Tromobospondinas

Las trombosponidas constituyen una pequeña familia de proteínas de secreción formada por 5 miembros (TSP-1 a 5) (Lawler, 2000). Las TSP 1 y 2 son trímeros, las 3 a 5 son pentaméricas. A pesar de la similitud de secuencia y estructura entre TSP-1 y 2, su rol fisiológico parece ser diferente (Lawler, 2000).

**TSP-1**tiene efectos anti-adhesivos *in vitro* cuando es agregada a una matriz como fibronectina (Sage and Bornstein, 1991), y actúa reduciendo el número de adhesiones focales en

fibroblastos y células endoteliales (Murphy-Ullrich et al., 1993) a través de un mecanismo mediado por calreticulina y proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (Gioechea, 2002). TSP-2 también actúa disminuyendo el número de adhesiones focales (Murphy-Ullrich et al., 1993), sin embargo, fibroblastos de ratones nulos para TSP-2 presentaron una menor adhesión a MEC (Yang et al., 2000).

TSP-1 puede tener distintos efectos dependiendo de si se encuentra en solución o asociada a la MEC- TSP-1 en solución inhibe el estiramiento de células endoteliales (Murphy-Ullrich et al., 1993); sin embargo asociada a la MEC, es capaz de estimular el estiramiento y la proliferación de células endoteliales.

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

**Tenascinas**

Si bien la tenascina-citotactina (TN-C) posee un rol preponderante durante el desarrollo, en el adulto está involucrada en procesos de remodelación de tejidos regulando la adhesión celular y los procesos de transducción de señales, principalmente en tejido nervioso (Jones and Jones, 2000).

Funcionalmente, la TN-c desensambla adhesiones focales del citoesqueleto de actina, induciendo la pérdida de adhesión celular y, por lo tanto, comportándose como una proteína anti-adhesiva (Chung et al., 1996; Chung et al., 1997; Fischer et al., 1997; Murphy-Ullrich et al., 1991). Respecto de su actividad sobre la proliferación celular, se ha visto que la regula en forma positiva, actuando como factor de crecimiento y factor de sobrevida en células de músculo liso vascular durante procesos de angiogénesis (Cowan, 2000; Cleek, 1997).

## *SPARC*

La proteína SPARC *(**S**ecreted **P**rotein **A**cidic and **R**ich in **C**ysteins)* 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 se mencionó anteriormente, es una proteína matricelular, no estructural que regula la función celular.

SPARC fue descripta por primera vez en el año 1981 por Termine y colaboradores (Termine et al., 1981), quienes demostraron que SPARC es el principal componente no colagenoso del tejido óseo humano y bovino. Posteriormente Sage y colaboradores (Sage et al., 1984; Sage et al.)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, 1986a; Schwarzbauer, 1993) su expresión se remonta a los primeros organismos multicelulares y se ha mantenido altamente conservada a lo largo de la evolución.

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., 1986; 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., 1986; McVey et al.). 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 **4.**

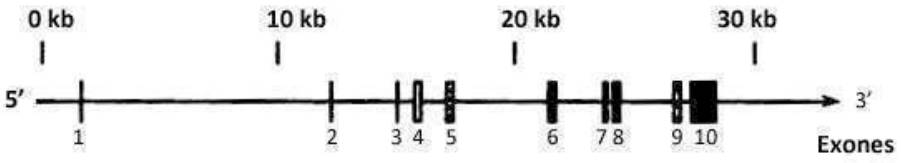



**Figura 4. Representación esquemática del gel de SPARC murino**. Los exones están representados como rectángulos en negro y están numerados desde el extremo 5' del gen. El exón 1 y una porción del exón 2 contribuyen a la región no traducida del ARNm de SPARC. El exón 2 codifica para péptido señal y 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 (Sage and Vernon, 1994).

Un resumen de las características estructurales del gen de SPARC y sus transcriptos es representado en la Tabla 1

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

**Tabla 1. Resumen de las características estructurales del gen de SPARC.** Tomado de Lane and Sage (Sage and Vernon, 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 primeros 17 aminoácidos constituyen el péptido señal, que es removido previo a la secreción de la proteína. La proteína SPARC humana madura, presenta 286 aminoácidos y un punto isoeléctrico de 4,76.Esta variación estructural de SPARC, se debe principalmente a glicosilaciones, las cuales varían dependiendo del tejido de donde proviene la proteína (Kaufmann, 2004; Campo McKnight, 2002). La estructura de SPARC se divide en 3 dominios bien diferenciados(Maurer et al., 1997a; Maurer et al., 1995)que se encuentran representados en la Figura 5y cuyas funciones se resumen en laTabla 2**.**

**Dominio I o Dominio Acídico (aa 3-51):** Este dominio está codificado por los exones 3 y 4, es altamente acídico con un valor de pI cercano a 3. Aunque la estructura de este dominiotodavía no ha sido resuelta, estudios de dicroísmo circular predicen la existencia de regiones de tipo $\alpha$ hélice sensibles a cambios en la concentración de $Ca^{2+}$. 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).

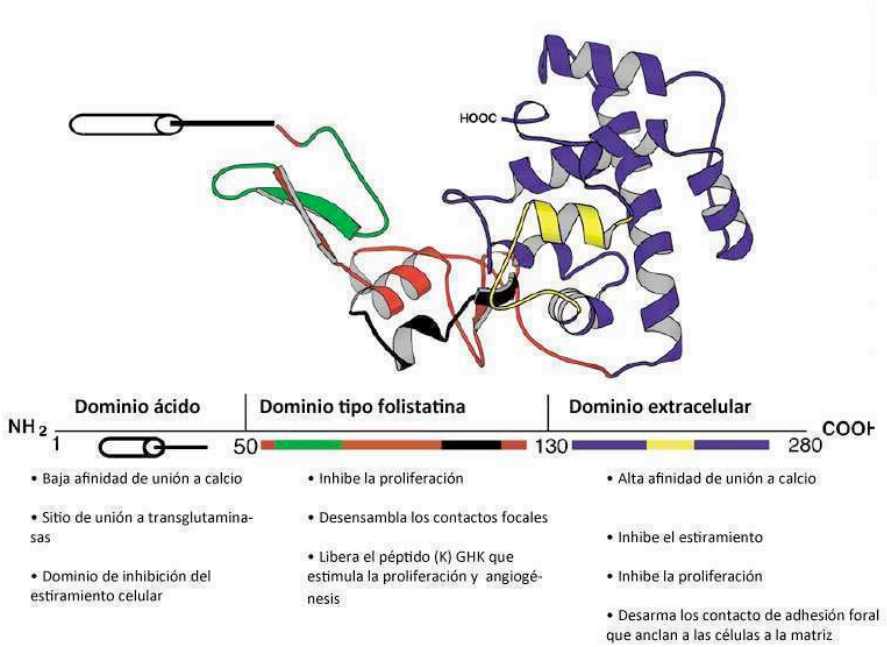



**Figura 5 Estructura de SPARC humana.** La representación deriva de la información obtenida por cristalografía donde se observan 2 dominios (el dominio acídico no pudo ser determinado por esta técnica). El dominio tipo folistatina, desde el aminoácido 57 al 137, está representado en rojo, excepto el 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 extracelular 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. En la parte inferior de cada dominio se detallan las principales características asociadas a cada uno de ellos. Adaptado de Bradshaw.(Bradshaw and Sage, 2001)

**Dominio II o Dominio Similar a Folistatina (FS) (aa 52-132):** Este dominio es codificado por los exones 5 y 6. 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 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.

**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). 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., 1997; 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, MMP3, MMP-2, MMP-13) para clivar a SPARC en la mencionada posición.

| *Dominio I* | *Dominio II* | *Dominio III* |
|---|---|---|
| **Une Ca2+ con baja afinidad** | **Inhibe proliferación** | **Une Ca2+ 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 Cu2+** | **Desensambla adhesiones focales** |
| **Induce producción de PAI-1** | **Une PDFG y VEGF** | **Induce producción de MMP9** |

**Tabla 2 Los tres dominios de SPARC presentan diferentes funciones.** Resumen de las diferentes funciones y propiedades en ensayos *in vitro* que le han sido atribuidas a los 3 dominios de SPARC

Recientemente se ha propuesto que la capacidad de SPRAC de interactuar con numerosas proteínas de la matriz extracelular estaría relacionada a su actividad chaperona. Esta función a su vez, estaría asociada a la capacidad de SPARC de degradar, remodelar y reparar la matriz

extracelular y le permitiría transportar proteínas desde el exterior hacia el interior celular y viceversa, generando importantes modificaciones en la composición del microambiente celular (Chlenski et al., 2011).

**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); (Bradshaw and Sage) 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 asilada 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 acídico N-terminal como se puede observar en la Figura 6**.**

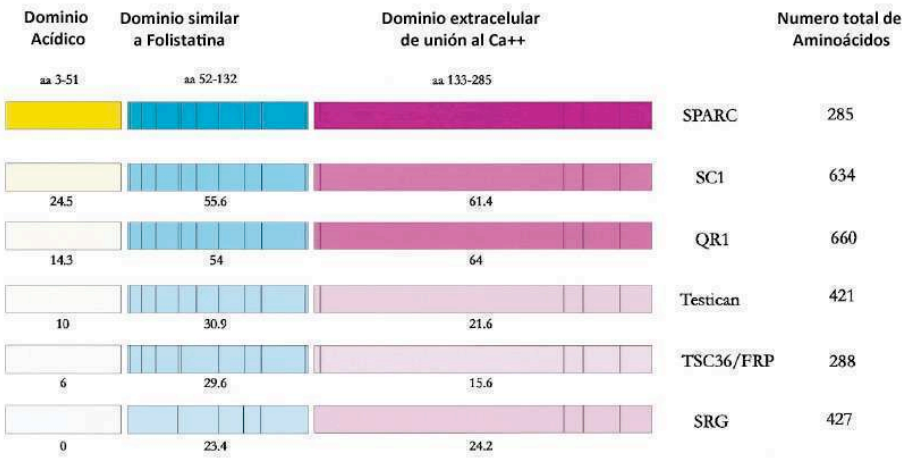



**Figura 6. Esquema estructural de las proteínas homólogas a SPARC.** En la figura se encuentran representadas en forma lineal la homología en cada dominio (el degradé de colores da idea de grado de homología). Los números representan el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a SPARC. Adaptado de Brekken (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 descripta como una proteína anti-adhesiva (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. Recientemente se describió a una nueva proteína de matriz extracelular asociada a SPARC, **Smoc2**(Manabe et al., 2008), para la cual se reportaron funciones reguladoras del ciclo celular (Liu et al., 2008)

**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 el humano, altos niveles de ARNm y de proteína han sido descriptos 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 en procesos de remodelación, como el intestino, hueso y tejidos en reparación, por ejemplo 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 descripta 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, no sólo se la encontró 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: remodelación de la matriz extraceular, proliferación, adhesión y regulación de la respuesta inmune.*

**Regulación de la remodelación de la MEC**

SPARC es une a múltiples componentes estructurales de la matriz con variada afinidad a través de mecanismos altamente regulados. Las interacciones con colágenos, dependen en gran medida, de la glicosilación, la presencia de calcio y la activación de proteasas. SPARC derivada de hueso que posee alta manosa y glicanos bi-antenarios, se une a colágeno tipo I y V. (Chlenski et al., 2004; Kaufmann et al., 2004). SPARC recombinante y derivada de plaquetas, que posee glicanos bi y tri-antenarios se une a colágeno I, III, IV y V (Maurer et al., 1995; Maurer et al., 1997b). Asimismo, SPARC producida por células tumorales posee un patrón único hibrido de glicosilación (Kaufmann et al., 2004; Kelm and Mann, 1991).

SPARC es capaz de modular la deposición del mayor componente estructural de la MEC. Cuando está unida a colágeno, actúa como chaperona que afecta la formación espontánea de fibrillas *in vitro*. Una mutante de SPARC con una deleción en $Val_{196}$-$Phe_{203}$, inhibe casi completamente la formación de fibrillas (Giudici et al., 2008). Asimismo, animales nulos para SPARC presentan en su piel, fibras de colágeno de menor tamaño y de diámetro más uniforme que los animales salvajes. Además presentan menor deposición de colágeno I y mayor deposición de colágeno VI que los ratones salvajes (Bradshaw et al., 2003). Asimismo, Sangaletti y colaboradores reportan que la alteración en el ensamblado de colágeno tipo IV es el mayor defecto asociado al déficit de SPARC (Sangaletti et al., 2003).

SPARC además es capaz de interactuar con moléculas señalizadoras como ILK (Quinasa unida a integrina). La interacción de SPARC con la proteína ILK 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., 2005b).

SPARC no solo puede controlar la deposición de componentes estructurales de la matriz, sino que también es capaz de regular la actividad de metaloproteasas que degradan la matriz. Los macrófagos, que infiltran rápidamente tejidos inflamados o en proceso de cicatrización, son la

principal fuente de metaloproteasas de matriz (MMPs). SPARC es capaz de inducir la secreción de: MMP-1 y MMP9 en monocitos de sangre periférica (Shankavaram et al., 1997), de MMP-1, MMP3 y MMP9 en fibroblastos (Tremble et al., 1993) e induce la activación de MMP-2 células de cáncer de mama con alta capacidad invasiva (Kato et al., 2001). Al mismo tiempo que SPARC induce la activación y secreción de MMPs, es clivada por éstas generando péptidos que aumentan su afinidad por colágeno y modulan la angiogénesis (Sage et al., 2003).

**Efecto sobre la proliferación**

Globalmente, anti-proliferación y anti-adhesión son las dos funciones biológicas principales definidas para SPARC sobre células normales *in vitro,* cada una de las cuales actúa por una vía de señalización independiente (Motamed and Sage, 1998). Las primeras investigaciones relacionadas a SPARC se enfocaron en describir sus funciones biológicas demostrándose que era un importante inhibidor del ciclo celular arrestando fibroblastos en fase $G_1$(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 anti-proliferativa 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 salvaje (Francki et al., 1999).Si bien no están claros los mecanismos a través de los cuales SPARC es capaz de regular la proliferación, se ha demostrado que SPARC inhibe la proliferación de células epiteliales a través de la vía de TGF-β, acoplando su dominio extracelular de unión a calcio al receptor de TGF-β, dependiente de la vía Smad2/3 (Schiemann et al., 2003). Está ampliamente demostrado que SPARC y TGF-β actúan como inhibidores de la progresión del ciclo celular y de la proliferación en varios tipos celulares (Bradshaw and Sage, 2001; Motamed et al., 2002; Yan and Sage, 1999).

Estudios publicados por nuestro grupo demostraron que SPARC exógena posee diversos efectos en función del tipo celular sobre el cual se la esté estudiando. Mientras que inhibe la proliferación de células endoteliales, posee un efecto bifásico sobre la proliferación de fibroblastos y carece de efecto en células tumorales de diversa estirpe. Llamativamente el silenciamiento de SPARC endógeno en células de melanoma las sensibiliza al tratamiento de SPARC exógeno, generando una inhibición tanto de la proliferación como de la migración (López Haber et al., 2007). Los mecanismos a través de los cuales SPARC está ejerciendo estos

efectos se desconocen, pero resaltan la necesidad de generar modelos que permitan comprender mejor la interacción entre SPARC y los distintos componentes del microambiente tumoral.

El efecto biológico de SPARC es altamente dependiente del contexto y del tipo celular que la está expresando, es por ello que no resulta sorprendente encontrar abundante evidencia del efecto anti-proliferativo de SPARC en células normales y algunos tipos tumorales, así como también encontramos abundante evidencia del efecto favorecedor de la proliferación sobre diversos tipos tumorales. Estos efectos son atribuidos tanto a la regulación de la expresión de factores de crecimiento como bFGF, PDGF, VEGF, IGF y TGF-b (Francki et al., 2004; Francki et al., 2003; Hasselaar et al., 1991; Kupprion et al.; Raines et al., 1992) de manera directa o indirecta por parte de SPARC, como a la modulación de diversas fases del ciclo celular y de la apoptosis (Dhanesuan et al., 2002; Fenouille et al., 2011a; Fenouille et al., 2011b; Horie et al., 2010; Tai et al., 2005a).

**Efecto sobre la adhesión y migración**

Adhesión y migración son dos mecanismos sumamente relacionados, para que una célula pueda migrar, es necesario que adquiera un estado de adhesión intermedio, que le permita reestructurar su citoesqueleto y migrar, al mismo tiempo que mantiene cierto grado de adhesión al sustrato.

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 regiones 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).

Como se mencionara anteriormente, las comunicaciones entre la célula y la matriz extracelular, son mediadas por las integrinas. Numerosos estudios sugieren que SPARC regula la señalización y la habilidad de las integrinas de interactuar con componentes no estructurales

de la matriz. SPARC induce el estado de adhesión intermedio en células endoteliales y mesenquimales *in vitro*(Bradshaw et al., 1999; Sage et al., 1989a). Asimismo, numerosos estudios contribuyen a la idea de que SPARC es capaz de influenciar moléculas río debajo de la señal iniciada por integrinas. En particular, se observó que fibroblastos aislados de ratones SP-/- presentaban deficiencias en la activación de la quinasa unida a integrina (ILK) y en la formación de fibras de estrés inducidas por fibronectina. La expresión forzada de SPARC es capaz de restablecer esta vía de señalización (Barker et al., 2005a). En relación con estos resultados, recientemente se reportó que SPARC se une a la integrina β1, a través de su dominio de unión a cobre, activando directamente la señalización integrina/ILK (Nie et al., 2008; Weaver et al., 2008).

La influencia de SPARC sobre la vía integrina/ILK también se observó en varias líneas tumorales. El silenciamiento de SPARC utilizando pequeños ARN de inteferencia, reduce la sobrevida y la invasión, al mismo tiempo que atenúa la actividad de ILK, kinasa de adhesión focal (FAK) y protein kinasa B (Akt) (Shi et al., 2007). En cáncer de ovario, SPARC inhibe la proliferación, adhesión e invasión a partir de la reducción de la localización y/o reclutamiento de las integrinas αv, β1, β3 y β5 (Said et al., 2007a). Asimismo, células de cáncer de ovario se adhieren más rápidamente a células mesoteliales y explantos peritoneales de ratones SP-/- en comparación con ratones salvajes (Said et al., 2007a). Este efecto es bloqueado por anticuerpos anti integrinas αvβ3 y β1 (Said et al., 2007a).

Recientemente en nuestro grupo demostramos que SPARC es capaz de modular la invasión mediada por catepsina B a través del eje TGFβ1/ colágeno tipo I/ integrinas α2β1(Girotti et al., 2011).

**Efecto sobre la respuesta inmune**

La utilización de animales transgénicos SP-/-, sugieren que SPARC puede tener un rol importante en la inmunidad tumoral. Modelos de cáncer de pulmón creciendo en ratones SP-/- presentaron un menor infiltrado de macrófagos y un mayor crecimiento tumoral que su contraparte salvaje (Brekken et al., 2003); asimismo, en modelos de cáncer de mama, la expresión de SPARC regula el reclutamiento de leucocitos. La ausencia de SPARC en el estroma del tumor, se asoció a un incremento en el infiltrado leucocitario productor de TNFα e INFγ dentro del parénquima tumoral, concomitantemente con una reducción en el tamaño del tumor. (Sangaletti et al., 2003). El efecto de SPARC sobre el sistema inmune también recae

sobre células del sistema inmune adaptativo; la menor deposición de colágeno observada en ratones SP-/- acelera la migración de células dendríticas hacia el nódulo linfático drenante y la activación de linfocitos T en modelos de dermatitis química y de hipersensibilidad retardada. Estos animales también presentan mayor reclutamiento de células CD45+ en sitios de injuria, lo que sugiere una respuesta inmune exacerbada en estos animales en comparación con animales salvajes (Sangaletti and Colombo, 2008) y resalta el efecto de SPARC como proteína anti-inflamatoria.

Por otro lado, resultados de nuestro grupo, muestran que SPARC secretada por células de melanoma, inhibe la activación de polimorfonucleares que capaces de inhibir el crecimiento del tumor (Alvarez et al., 2005; Ledda et al., 1997b; Prada et al., 2007).

Estos resultados sugieren que SPARC debe funcionar, ya sea sobre el estroma de la médula ósea liberando a circulación células hematopoyéticas, o sobre el estroma tumoral, donde modula el infiltrado, diferenciación y sobrevida de células del sistema inmune. Esta propiedad inmunomoduladora, también ha sido conferida otras proteínas matricelulares como osteopontina, TSP-1 y TN-C (Framson and Sage, 2004).

### *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). Asimismo se postula que la interacción de SPARC con proteínas de la matriz estaría dada en función de la concentración de $Ca^{2+}$. En el interior de la célula donde la concentración de $Ca^{2+}$ es baja, SPARC posee baja afinidad por sus moléculas blanco, en el espacio extracelular, donde hay altas concentraciones de $Ca^{2+}$ se activa la unión de SPARC a numerosas proteínas de la matriz extracelular (Chlenski et al., 2011). 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 descripto 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-β1 (Bassuk et al., 2000; Ford et al., 1993; Francki et al., 1999; Reed et al., 1994).

Como ya se mencionó, SPARC interactúa también con proteínas involucradas en vías de señalización como ILK.

La Tabla 3 presentada a continuación, resume las evidencias científicas que demuestran las interacciones de SPARC con otras proteínas y cationes.

| ***Ligandos*** | ***Referencias bibliográficas*** |
|---|---|
| ***Cationes*** | |
| Ca2+ | Maurer et al. 1992, 1995 |
| Cu2+ | Lane et al 1994 |
| Fe2+ | 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 3 Resumen de la interacción de SPARC con otras moléculas.** Adaptado y actualizado de Yan y Sage(Yan and Sage, 1999).

## *SPARC y cáncer*

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 nos lleva a proponer que la expresión de SPARC es necesaria para la promoción y progresión tumoral. Sin embargo, se ha demostrado también, 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 (Podhajcer et al., 2008a).

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, favoreciendo o reprimiendo el crecimiento 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 puede variar dependiendo del tipo tumoral, 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 presentan 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 más 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 la disrupción de los contactos focales de adhesión y reorganización de fibras de estrés. Estas proteínas son secretadas en forma transciente a la MEC, y no se vuelven parte de la red de proteínas presentes en ella. 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 tumorales humanos. Como se describe en la Tabla 4, 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 que el mecanismo a través del 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 MMP9 (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 que degradan la matriz extracelular (Gilles et al., 1998). Las evidencias reportadas en cuanto al rol de SPARC en la progresión del cáncer de mama se detallarán en el próximo apartado.

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 la transición hacia un efecto más agresivo.

| 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]; Rumpler 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 al1998[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] |
| **Tirotides** | | Takano et al 2000 [105] |
| **Cabeza y cuello** | | Chin et al 2005 [106] |
| **Piel** | | Aycock et al 2004 [107] |

**Tabla 4 SPARC favorece el crecimiento de cierto tipo tumores.** 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(Podhajcer et al., 2008b). Las referencias señaladas corresponden a las referecias presentes en el Review.

**SPARC: también una proteína antitumoral**

La expresión de SPARC también ha sido asociada con buen pronóstico en ciertos tipos de cáncer. En la **Tabla 5**, se encuentran listados los tipos tumorales en donde se encontró que SPARC actúa como proteína anti-tumorigénica. Como se puede ver en las Tabla 4 y **Tabla 5**, para un mismo tipo tumoral, SPARC se puede comportar tanto como una proteína pro como anti tumorigénica, según el sistema experimental que se utilice. El caso particular de cáncer de mama será retomado en el próximo apartado.

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 células de cáncer de ovario *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. El análisis genómico de líneas celulares de cáncer colorrectal resistentes a agentes quimioterapeuticos mostraron que los niveles de SPARC se encuentran fuertemente disminuidos (Tai et al., 2005b). 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 se 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). Aunque parecen 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 demostrado recientemente, que 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). En el mencionado trabajo, del cual fuimos colaboradore, se demostró además que 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 TEM).

| 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 5 SPARC puede inhibir el crecimiento de cierto tipo de tumores**. Resumen de evidencias en la literatura que muestran a SPARC como una proteína antitumorigénica. *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., 2008b). Las referencias indicadas se encuentran en el Review.

## *El cáncer de mama: origen y evolución*

A nivel mundial, el cáncer de mama es una de las principales causas de muerte debidas a neoplasias malignas en mujeres(Kamangar et al., 2006). A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y el tratamiento, todavía existen problemas de índole clínica y científica por resolver. Estos están relacionados con la detección de potenciales pacientes susceptibles de tratamientos preventivos, la determinación de las causas de la progresión y la recurrencia, la selección del tratamiento adecuado y la prevención de la resistencia a la terapia.

**Clasificación clinicopatológica**

A fines de los años 50, se desarrolló un sistema de clasificación, aceptado mundialmente, que permitió agrupar a las pacientes según las características histopatológicas de la enfermedad (Denoix, 1959). De acuerdo a este criterio, TNM, los tumores se diagnostican en función de 3 parametros: Estadio T, que considera el tamaño del tumor primario. Estadio N, que considera la presencia de metástasis axilares. Estadio M, que considera la presencia de metástasis a distancia. Según esta clasificación, podemos dividir a los tumores de mama en:

| Estado T | Estado N | Estado M | Estado total |
|---|---|---|---|
| Tis | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | IA |
| 0-1 | 1 | 0 | IIA |
| 2 | 0 | 0 | IIA |
| 2 | 1 | 0 | IIB |
| 3 | 0 | 0 | IIB |
| 0-2 | 0 | 0 | IIIA |
| 3 | 0-1 | 0 | IIIA |
| 4 | 0 | 0 | IIIB |
| Cualquier T | 1 | 0 | IIIC |
| Cualquier T | Cualquier N | 0 | IV |

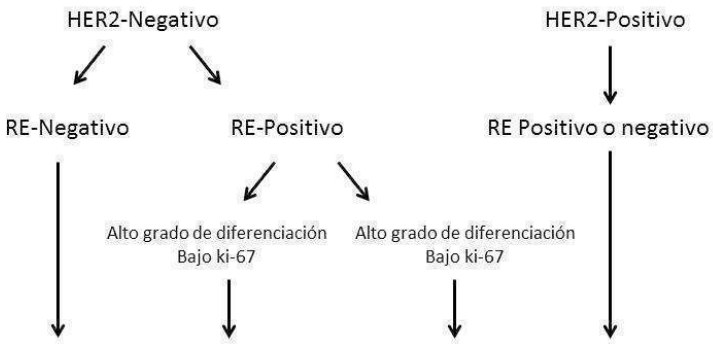
**Tabla 6 Clasificación TNM del cáncer de mama:** Los estados IA y IIA corresponden a tumores *in situ,* los estados IIB a IIIC corresponden a tumores localmente infiltrantes, y el estado IV corresponde a un tumor metastásico.

A partir de la implementación de nuevas tecnologías para el diagnóstico utilizadas por los patólogos para detectar la presencia de metástasis axilares, fue necesario realizar modificaciones al criterio TNM a fin de lograr un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. En el año 2006, se propuso una modificación en la clasificación del estado N, en la cual se propuso subdividirlo en N1 (pacientes con 1-3 nodos positivos), N2 (pacientes con 4-9 nodos positivos) y N3 (pacientes con más de 9 nodos positivos). Esta modificación se hizo a partir de datos clínicos en los que se observó que las pacientes que tenían menor número de nódulos positivos tenían una mejor evolución de la enfermedad. Asimismo, se considera que la determinación del número de nódulos axilares positivos es uno de los factores más importantes a considerar para definir la conducta terapéutica y estimar la sobrevida (Escobar et al., 2007).

**Clasificación molecular**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea tanto a nivel molecular como celular, en la cual, un gran número de genes gobiernan las distintas etapas de progresión de la

enfermedad. Es por ello que el estudio sistemático de perfiles de expresión génica de cientos de tumores, resulta ser una herramienta sumamente valiosa para la compresión y clasificación de la enfermedad. En el año 2000, Perou y colaboradores propusieron cuatro tipos moleculares de cáncer de mama basándose en perfiles de expresión génica: 1) de tipo basal o triples negativos debido a que no expresan: receptores de estrógeno, de progesteriona y HER-2; 2) luminal A, agrupa tumores de bajo grado histológico y receptor de estrógenos positivos; 3) luminal B, agrupa tumores también receptor de estrógeno positivos pero los niveles de expresión de receptores hormonales son menores y por lo general son de alto grado histológico; 4) HER2 positivos que agrupa tumores con alta expresión y amplificación de ERB2, estos tumores a su vez son negativos para el receptor de estrógeno. (Perou et al., 2000). En base a los conocimientos actuales en relación a clasificaciones moleculares y patológicas, se puede clasificar a los tumores de mama teniente en cuanta los parámetros mencionados en la Figura 7. (Sotiriou and Pusztai, 2009)




| Variables patológicas | Tipo basal (%) | Luminal A (%) | Luminal B (%) | Tipo HER2 |
|---|---|---|---|---|
| HER2-positivo (IHQ) | 10 | 12 | 20 | 100 |
| RE-positivo (IHQ) | 12 | 96 | 97 | 46 |
| Grado III | 84 | 19 | 53 | 74 |
| Tamaño >2 cm | 75 | 53 | 69 | 74 |
| Nódulo positivo | 40 | 52 | 65 | 66 |

**Figura 7 Clasificación molecular y clinicopatológica del cáncer de mama.** RE significa receptor de estrógeno y KI-67 hace referencia al antígeno nuclear KI-67. En la tabla se resumen el porcentaje de casos cada una de las variables patológicas presentes en cada tipo molecular. (Imagen adaptada de Sotiriou, 2009)

**Evolución de la enfermedad**

Si bien en el apartado anterior se mencionó que los distintos tipos de tumores de mama evolucionan a partir la activación de mecanismos independientes, también se propone una evolución lineal de la enfermedad. Según este modelo lineal, la carcinogénesis de los tumores de mama ductales (que son los más abundantes) comienza con la hiperproliferación de una única célula, evoluciona hacia un carcinoma *in situ* (CDIS), luego hacia una carcinoma invasivo (CDI) y hasta terminar en tumor metastásico. (Figura 8). Uno de los eventos críticos y menos comprendidos en la progresión del cáncer de mama es la transición entre el CDIS hacia el CDI y metastásico. Hasta ahora no se encontraron evidencias de componentes genéticos subyacentes en dicha transición, lo que sugiere modificaciones epigenéticas y/o factores paracrinos aportados por el estroma.

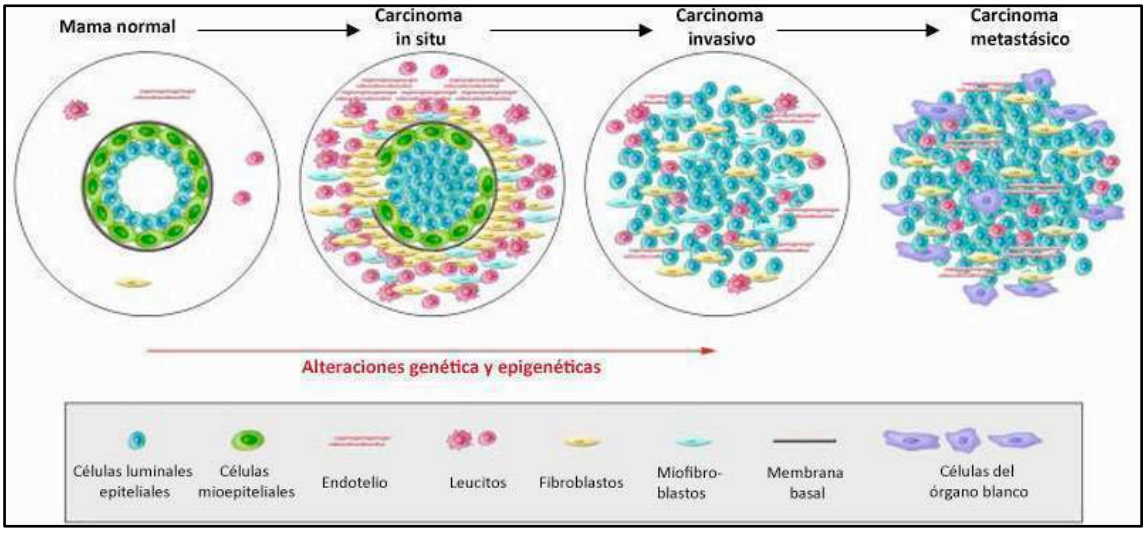



**Figura 8 Modelo hipotético acerca de la progresión del cáncer de mama:** De izquierda a derecha se representa un ducto normal compuesto por una membrana basal conteniendo una capa de células luminales y células mioepiteliales, el estroma incluye varios tipos de leucocitos, fibrblastos, miofibrblastos y algunas células epiteliales. En los carcinomas in situ, las células mioepiteliales, se alteran genética y fenotípicamente y disminuyen, potencialmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo aumenta el número de fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y células epiteliales. La pérdida de membrana basal y de células mioepiteliales, genera carcinomas ductales invasivos, en los cuales las células tumorales pueden invadir tejidos cercanos y migrar hacia órganos lejanos donde ocasionalmente crecerán metástasis. (Polyak, 2007)

## *SPARC en cáncer de mama*

Sin bien existe un importante número de trabajos que asocia la expresión de SPARC en cáncer de mama a un fenotipo más agresivo y metastásico, recientemente se han publicado numerosos trabajos que proponen que su expresión podría tener un efecto anti tumoral, y hasta en algunos casos, podría correlacionarse con una mejor respuesta al tratamiento.

Dada la complejidad de la biología de la proteína y la diversidad de metodologías utilizadas para estudiarla, decidimos resumir los datos reportados en relación a la expresión de SPARC en cáncer de mama en las Tabla 7 y Tabla 8 . En las próximas secciones de la tesis se abordaran algunos de los resultados más relevantes de los trabajos mencionados.

| | SPARC del epitelio | SPARC del estroma |
|---|---|---|
| **Muestras humanas (IHQ y microarreglos)** | Helleman, 2008; Sarrió, 2008; Min,2008; Lien, 2007; Jansen, 2005*; Lakhani, 2005*; Watkins, 2005; Amastschek, 2004; Dairkee, 2004; Woelfle, 2003; Jones, 2004; Graham, 1997; Bellahcene, 1995 | Witkiewicz, 2010; (Trujillo et al., 2011);(Hsiao et al., 2010) Van beijnum, 2009; Barth, 2005; Jones, 2004; Parker, 2004; Iacobuzio-Donahue, 2002; Podhajcer, 1996; Porter, 1995 |
| **Modelos *in vitro* e *in vivo*** | (Olmeda et al., 2007); Lien, 2007; Minn, 2005; Briggs, 2002; Zajchowski, 2001; Gilles, 1998 | Sangaletti, 2003; Sangaletti, 2008 |

**Tabla 7 Evidencias acerca del rol pro tumoral de SPARC en cáncer de mama.** En la tabla se resumen las evidencias relacionadas al rol de SPARC, tanto del epitelio como del estroma, como favorecedor de la progresión tumoral. * El trabajo no especifica si los niveles de SPARC que correlacionan con mal pronóstico se deben a SPARC del epitelio o del estroma

| | SPARC del epitelio | SPARC del estroma |
|---|---|---|
| **Muestras humanas (IHQ y microarreglos)** | Nagai, 2011 | Beck, 2008; Bergamaschi, 2008 |
| **Modelos *in vitro* e *in vivo*** | Desai, 2008; Koblinski, 2005; Dhanesuan, 2002 | Defresne, 2011 |

**Tabla 8 Evidencias acerca del rol anti tumoral de SPARC en cáncer de mama.** En la tabla se resumen las evidencias relacionadas al rol de SPARC, tanto del epitelio como del estroma, como proteína anti tumoral.

### El rol de SPARC en la motilidad de las células y capacidad metastásica en modelos de cáncer de mama

Los ensayos reportados tendientes a demostrar el efecto de SPARC sobre la capacidad migratoria in vitro son contrapuestos, mientras que utilizando el modelo de MDA-MB-213: Campo McKinght (Campo McKnight et al., 2005) muestran que SPARC exógeno, a través de su efecto anti-adhesivo, induce la migración hacia hueso, Dhanesuan y col. (Dhanesuan et al., 2002) muestran que la sobre-expresión endógena de SPARC, utilizando un vector de expresión, inhibe la migración en un ensayo de cierre de heridas a partir de su efecto anti-proliferativo.

Asimismo, utilizando el modelo de MCF-7, Briggs y col. (Briggs et al., 2002) mostraron que la sobre-expresión endógena de SPARC, utilizando un vector adenoviral, no tiene ningún efecto sobre la capacidad migratoria. Sin embargo, la sobre-expresión endógena de SPARC como consecuencia de la sobre-expresión de c-Jun, potencia el fenotipo migratorio e invasivo de las células. Estos resultados marcan una clara diferencia entre el rol de SPARC endógeno y exógeno sobre la capacidad migratoria de las células, al mismo tiempo que sugieren diversos efectos en función del contexto en el cual se está expresando la proteína.

Los datos reportados utilizando modelos *in vivo* tampoco muestran resultados concluyentes. Utilizando el mismo modelo de MDA-MB-213, Koblinski y col. (Koblinski et al., 2005) muestran que la sobre-expresión endógena de SPARC inhibe la capacidad metastásica en modelos de metástasis experimentales (principalmente hacia hueso pero también a pulmón) debido a la inhibición del agregado de plaquetas y el impedimento de la formación de trombos pro-metastáticos. Por el contrario, Minn y col.(Minn et al., 2005)demostraron en el mismo tipo celular y luego de la selección de clones agresivos que expresan SPARC, que dicha proteína es uno de los genes de virulencia que favorecería el crecimiento de las metástasis pulmonares. Recientemente, Defresne y col. (Defresne et al., 2011) demostraron, en un modelo que intenta simular el efecto paracrino del tumor sobre células progenitoras de médula ósea, que la interacción de clones altamente agresivos derivados de la línea MDA-MB-213 con células progenitoras endoteliales (Kmieciak et al.), disminuye la expresión de SPARC en estas últimas y aumenta la diseminación metastásica. Estos autores proponen que en contraposición con el efecto pro-invasivo de SPARC expresado por las células tumorales, SPARC expresado por células estromales, en particular EPC, favorece la interacción y eliminación de células tumorales circulantes.

En abierto contraste con estas observaciones, existe evidencia sólida de que SPARC expresada por células estromales, en particular macrófagos, sería en parte responsable de favorecer el fenotipo migratorio e invasivo de las células tumorales (Sangaletti et al., 2008). Sin embargo, otros autores utilizando dos modelos espontáneos de cáncer de mama y próstata murinos, proponen que la pérdida de SPARC del estroma no es suficiente para promover o inhibir la progresión tumoral (Wong et al., 2007).

Los datos presentados en esta sección resaltan la necesidad de realizar estudios integrales que evalúen tanto la expresión de SPARC del epitelio como del estroma que permitan establecer

no sólo el rol de SPARC como favorecedor o inhibidor de la progresión tumoral sino que también permitan explorar los mecanismos a través de los cuales SPARC está ejerciendo ese efecto.

# Objetivos

## *Hipótesis del trabajo*

Nuestro laboratorio se encuentra enfocado en dilucidar los mecanismos mediante los cuales la proteína SPARC (SP) actúa sobre la progresión tumoral. El particular interés que se la ha dado a esta proteína surge de la observación de que se encuentra sobre expresada en una amplia mayoría de tumores (Podhajcer et al., 2008a). Estudios seminales de nuestro grupo han demostrado que la disminución de la expresión de SPARC en células de melanoma mediante la expresión de una secuencia antisentido inhibe por completo la capacidad tumorigénica en ratones atímicos (Ledda et al., 1997b).

Sin bien la evidencia de que SPARC como proteína pro tumorigénica en melanoma es relevante, los datos reportados acerca de la participación de SPARC en la progresión del cáncer de mama son contradictorios. Mientras que algunos trabajos postulan la sobreexpresión de SPARC en muestras de cáncer de mama como un marcador independiente de mal pronóstico (Amatschek et al., 2004; Dairkee et al., 2004; Helleman et al.; Jansen et al., 2005; Jones et al., 2004; Zajchowski et al., 2001), otros estudios en modelos animales sugieren que un aumento en su expresión llevaría a un fenotipo menos maligno (Koblinski et al., 2005) y a una mejor respuesta al tratamiento con taxanos (Desai et al., 2009). Asimismo, en estudios realizados con muestras de pacientes se determinó que su expresión en el estroma sería un marcador de respuesta positiva al tratamiento (Beck et al., 2008). Recientemente se publicó, en un estudio realizado con más de 900 pacientes que una baja expresión de SPARC correlaciona con un peor pronóstico (Nagai et al., 2011).

A partir de esta evidencia, proponemos como hipótesis que el establecimiento del tumor y su diseminación metastásica en cáncer de mama son procesos regulados por SPARC y que los datos contradictorios pueden deberse tanto a la diversidad de modelos utilizados como al componente tumoral que la está expresando, ya sea el epitelio, el estroma o ambos.

## *Objetivo general*

Los tumores son masas heterogéneas de células diversas donde sobresalen las células epiteliales, que son las que sufren la transformación maligna y generan las metástasis, así como las células del estroma (endotelio, fibroblastos y células del sistema inmune) que acompañan y promueven los procesos que llevan a la progresión maligna.

Se sugiere que SPARC posee un rol en diversas etapas del crecimiento tumoral (Figura 9). En este trabajo nos propusimos profundizar las funciones de SPARC en el cáncer de mama, focalizándonos en el rol de SPARC producido por el estroma y las células epiteliales tanto en el crecimiento del tumor primario como en la diseminación metastásica.

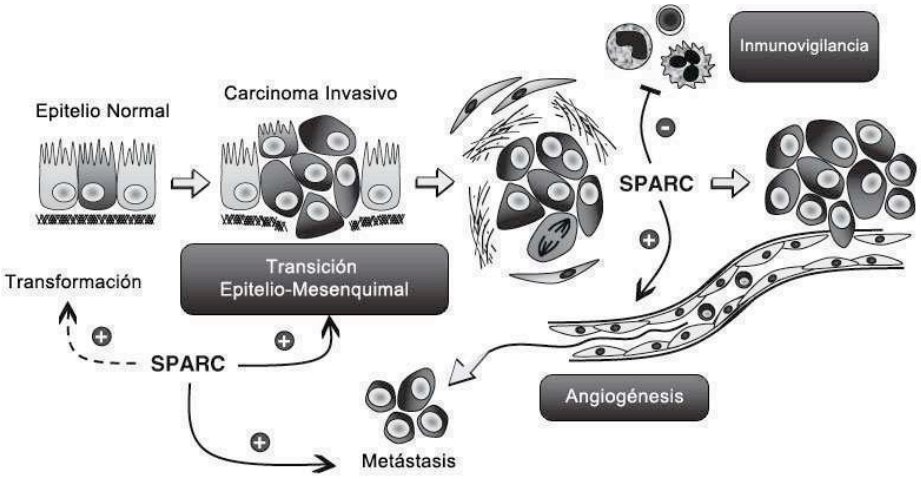



**Figura 9 (Imagen adaptada de Podhajcer, 2008) Participación de SPARC en diversas etapas de la progresión tumoral.** SPARC participa en diversas etapas del crecimiento tumoral: 1-favoreciendo la transición epitelio mesenquimal y transformación maligna inicial. 2-inhibiendo la respuesta inmune antitumoral. 3-Estimulando la angiogénesis y 4-favoreciendo la diseminación metastásica.

## *Objetivos específicos*

- Silenciar la expresión de SPARC en las líneas celulares de cáncer de mama humano IBH-6 y murino 4T1, utilizando vectores lentivirales que expresen pequeños ARNs de interferencia (siARN).
- Estudiar parámetros de malignidad *in vitro* tales como proliferación, migración e invasión en ambos modelos tumores, IBH-6 y 4T1 con diferentes niveles de expresión de SPARC.

- Caracterizar el crecimiento *in vivo* de la línea celular de cáncer de mama humano IBH-6, con diferentes niveles de expresión de SPARC, en ratones Nu/Nu salvajes (SP+/+), comparado con el crecimiento en ratones Nu/Nu nulos para SPARC (SP-/-), a fin de evaluar el rol de SPARC producido tanto por las células epiteliales como por el estroma del huésped. A partir de la utilización de este modelo nos centraremos particularmente en el crecimiento del tumor primario, dada la escasa capacidad de generar metástasis de la línea IBH-6.
- Evaluar la expresión de SPARC en el epitelio maligno y el estroma de muestras de tumores primarios y metástasis ganglionares de carcinomas mamarios humanos incluidos en parafina, con el objetivo de determinar si existe una relación entre los niveles de expresión de SPARC en el tumor primario y la aparición de metástasis axilares, única posibilidad disponible para evaluar la participación de SPARC en la diseminación tumoral en pacientes.
- Estudiar el crecimiento *in vivo* de células 4T1 con diferentes niveles de expresión de SPARC en ratones inmunocompetentes a fin de probar, en un modelo experimental de metástasis espontáneas, si existe una relación entre la expresión de SPARC y la diseminación metastásica.
- Utilizar la tecnología de microarreglos de ADN en el modelo 4T1 con el objetivo de identificar genes y vías de señalización a través de los cuales SPARC afecta la progresión tumoral.

## *Modelos de estudio*

A los efectos de abordar los objetivos mencionados, es necesario contar con una serie de herramientas y/o modelos que nos permitan modular los niveles SPARC en ambos componentes tumorales, epitelio y estroma (Figura 10). Para silenciar SPARC en las líneas tumorales humana y murina, diseñamos vectores lentivirales que llevan un ARN de interferencia. Por otro lado contamos con ratones transgénicos Nu/Nu con expresión nula de SPARC (SP), donde inoculamos las líneas celulares y podemos estudiar el aporte de SPARC producido por el estroma. Los resultados obtenidos en relación a los efectos de expresión de SPARC por parte del epitelio o del estroma tumoral, se correlacionaron con los datos obtenidos de muestras de pacientes con cáncer de mama.

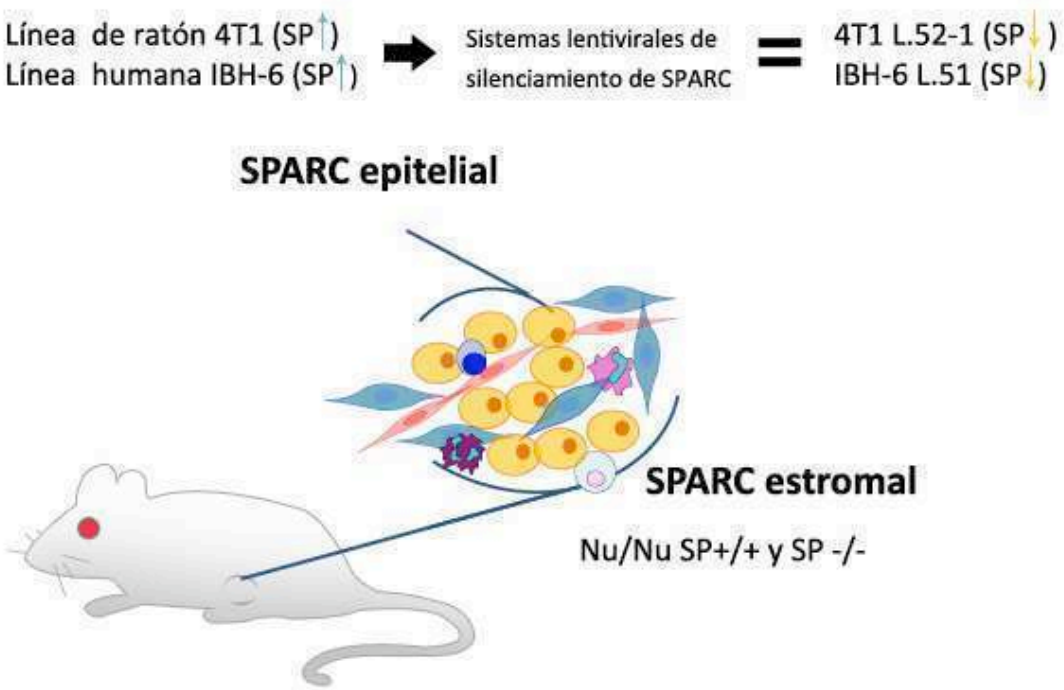



**Figura 10Esquema general de las herramientas y modelos utilizados para abordar los objetivos de esta tesis.** Para estudiar el rol de SPARC (SP) por parte del epitelio, la silenciamos en líneas de carcinomas mamarios humano, IBH-6, y murino, 4T1, utilizando vectores lentivirales que llevan un pequeño ARN de interferencia. La utilización de animales transgénicos nulos para SPARC, nos permitió estudiar el aporte de SPARC por parte del estroma al crecimiento de los tumores.

# Capítulo I Búsqueda de modelos y generación de herramientas que nos permitan evaluar el rol de SPARC en el desarrollo del cáncer de mama.

La primera etapa de esta tesis doctoral estuvo enfocada en la búsqueda de líneas celulares y modelos animales donde poner a prueba nuestras hipótesis. En particular, el primer objetivo fue encontrar líneas de carcinomas mamarios altamente agresivos que naturalmente expresen SPARC donde pudiéramos modular su expresión, a fin de evaluar el efecto que posee sobre la progresión tumoral.

Si bien en la literatura hay reportados numerosos trabajos que utilizan muestras de pacientes donde se hacen correlaciones entre los niveles de SPARC y el grado de agresividad de los mismos, al momento de iniciar esta tesis no se habían reportados modelos de líneas celulares que naturalmente expresen SPARC sobre los cuales profundizar acerca de los mecanismos de acción de ésta proteína durante el proceso de transformación maligna.

## *Expresión de SPARC en líneas de cáncer de mama*

Dado que el principal objetivo de esta tesis consistió en estudiar el efecto de SPARC durante la evolución del cáncer de mama, definimos como primera meta la búsqueda de líneas de carcinomas mamarios que naturalmente expresaran SPARC. Estas líneas celulares serán utilizadas como modelo de estudio donde poder evaluar qué sucede con la agresividad del tumor al silenciar SPARC.

Para detectar la expresión de SPARC en diferentes líneas de cáncer de mama humana y murina, utilizamos la técnica de RT-PCR.

Entre las líneas seleccionadas para el estudio de la expresión de SPARC se encontraban la línea murina 4T1. Esta línea resulta interesante por su alto grado de agresividad y su capacidad de generar metástasis espontáneas en el pulmón, luego de inyectar las células en la glándula mamaria (Aslakson and Miller, 1992). Entre las líneas humanas con las que contábamos se

encontraban las líneas IBH-4, IBH-6 e IBH-7 obtenidas recientemente en nuestro país por el grupo de la Dra. Isabel Luthy (Bruzzone et al., 2009; Vazquez et al., 2004) (Figura 11) y las líneas MDA-MB-213, MCF-7 y T47D.

Como controles positivos de la expresión de SPARC se utilizaron la línea murina de cáncer de colon CT26 y la línea de cáncer de mama humana 578T. Cabe aclarar que esta línea no será utilizada como modelo de estudio debido a que no es tumorigénica en ratones Nu/Nu, salvo cuando es inyectada en alto número y en presencia de matrigel. Como control negativo de la reacción se utilizó la mezcla de PCR sin templado.

Como se puede ver en la Figura 11, encontramos que las líneas 4T1, IBH-4 e IBH-6 expresaban el mensajero de SPARC. No encontramos expresión de SPARC en las otras líneas humanas analizadas.

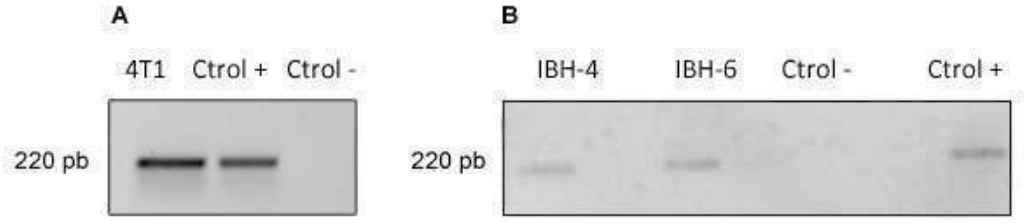



**Figura 11Las líneas 4T1, IBH-4 e IBH-6 expresan SPARC.** A. Resultado de la RT-PCR en las líneas de ratón analizadas, B. Resultado obtenido para la RT-PCR en las líneas humanas IBH. Como control positivo de la expresión de SPARC murino se utilizó la línea CT 26 y como control positivo de la expresión de SPARC humano se utilizó la línea 578T. En ambas reacciones el control negativo fue la mezcla de PCR sin templado. A la izquierda de cada imagen se señala el tamaño del fragmento obtenido.

Para confirmar que efectivamente el producto amplificado en la línea 4T1 correspondía a SPARC, se procedió a la restricción del fragmento amplificado. Si el fragmento corresponde al gen de SPARC, el mismo debe contener un sitio de clivaje para la enzima AvaII y generar dos fragmentos de 125 y 95 pares de bases (Chin et al.). Como se observa en la Figura 12, luego de la restricción del producto de PCR, obtenemos los dos fragmentos esperados para el amplicon de SPARC, confirmando su identidad.

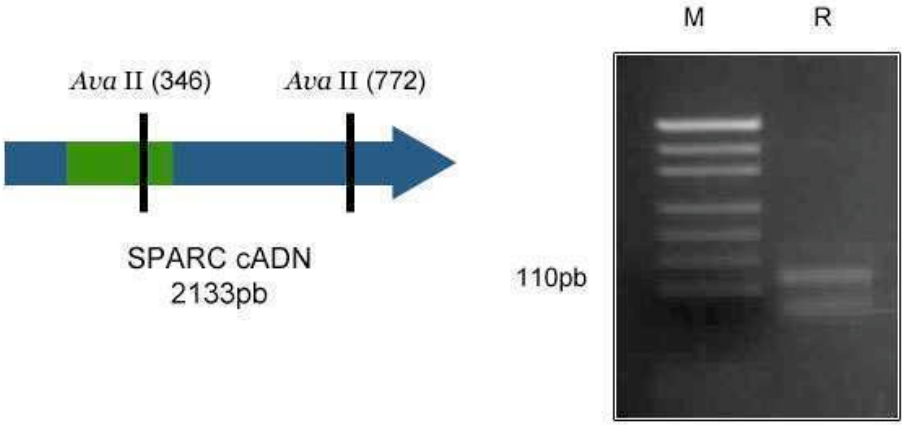



**Figura 12: El fragmento amplificando en la PCR de las líneas de ratón corresponde al gen de SPARC.** A la izquierda, la fecha azul representa el mensajero de SPARC, en verde se señala el producto de PCR obtenido. El producto de PCR contiene un sitio de corte para la enzima AvaII que genera dos fragmentos de 125 y 95pb. A la derecha se muestra la restricción del producto de PCR con la enzima AvaII (R). M es el marcador de peso molecular, la banda de menor peso del marcador posee 110 pb.

Por otro lado, para determinar la identidad del fragmento amplificado en la línea IBH-6, el mismo se purificó y fue enviado a secuenciación. Finalmente se corroboró la identidad de la secuencia obtenida alineándola con la secuencia del gen SPARC (Ver resultado en el Anexo III).

Dado que el fragmento amplificado es de 200 pb, como control adicional utilizamos la herramienta BLAST para determinar que dicha secuencia correspondiera únicamente al gen de SPARC. Encontramos que la secuencia amplificada sólo corresponde al mensajero de SPARC

Una vez confirmada la expresión de SPARC en las líneas 4T1, IBH-4 e IBH-6, se procedió a la cuantificación de los niveles de expresión por PCR en tiempo real (Figura 13).

Encontramos que la línea 4T1 expresa aproximadamente un 45% menos de SPARC que la línea CT26 que se utilizó como control positivo. Por otro lado, de las líneas humanas tumorigénicas de mama con las que contábamos en el laboratorio, la línea IBH-6 era la que mayores niveles de SPARC presentaba.

A partir de estos datos definimos como líneas modelo para seguir adelante con nuestros estudios, las líneas 4T1 e IBH-6.

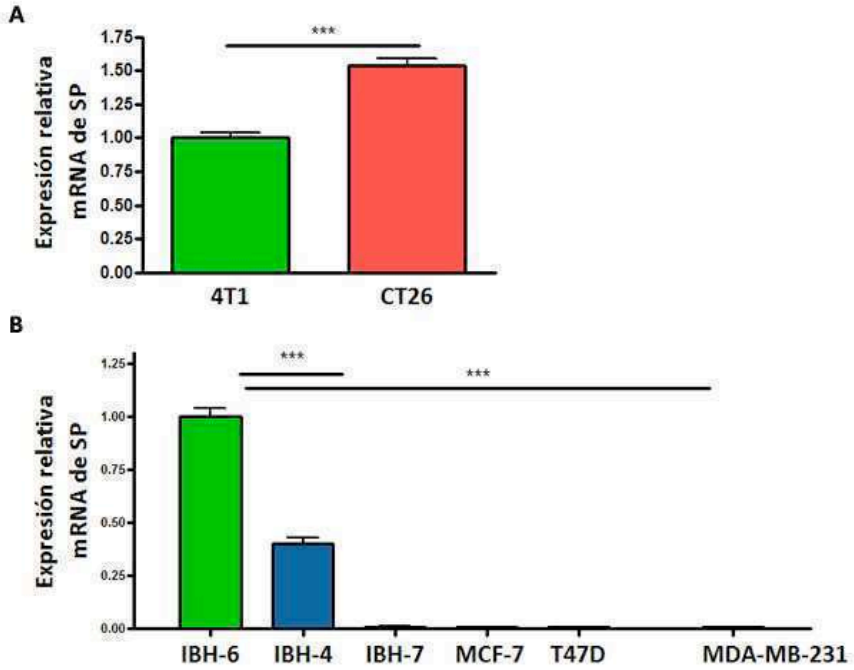



**Figura 13 A.El nivel de expresión de SPARC (SP) en la línea murina de cáncer de mama 4T1 es aproximadamente un 45% menos que el nivel observado en la línea CT26 utilizada como control positivo.** PCR en tiempo real comparando los niveles de expresión de SPARC entre la línea 4T1 y la línea CT26. Como gen normalizador se utilizó $\beta_2$microglobulina, y se determinó arbitrariamente como 1 el nivel de expresión, el observado en la línea 4T1. ***P<0.01 **B. De las líneas tumorales de mama humanas analizadas, la línea IBH-6 es la que mayor nivel de SPARC (SP) expresa**. PCR en tiempo real comparando los niveles de expresión de SPARC en líneas de cáncer de mama humano tumorigenicas en ratones Nu/Nu. Como gen normalizador de la reacción se utilizó HPRT y se determinó arbitrariamente como nivel 1 de expresión el observado en la línea IBH-6. ***P<0.01

## *Silenciamiento de SPARC utilizando vectores lentivirales*

Una vez definidos como modelos de trabajo las líneas 4T1 e IBH-6, el paso siguiente fue la generación de vectores lentivirales que lleven un ARN de interferencia pequeño, siARN, contra el gen de SPARC humano o murino, según corresponda.

Para el silenciamiento de SPARC se utilizó el vector lentiviral pRNATin H1.4 de GenScript, en el cual se clonaron por lo menos 3 secuencias de interferencia de SPARC murina y una secuencia de interferencia contra SPARC humana, que ya había sido testeada previamente en el laboratorio y había resultado efectiva en el silenciamiento de SPARC. Una vez clonadas las secuencias se procedió al armado de los vectores lentivirales y la transducción de las líneas.

Como se observa en la Figura 14, de las tres secuencias evaluadas para silenciar SPARC murina, sólo la secuencia 52-1 resultó efectiva. Como vector control se utilizó la secuencia 52-1

mezclada aleatoriamente (*scramble* o SCR). Como control de la eficiencia de transducción, se evaluó la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) que está contenida en el vector pRNATin H1.4, mediante microscopía de fluorescencia de las células (Figura 15D).

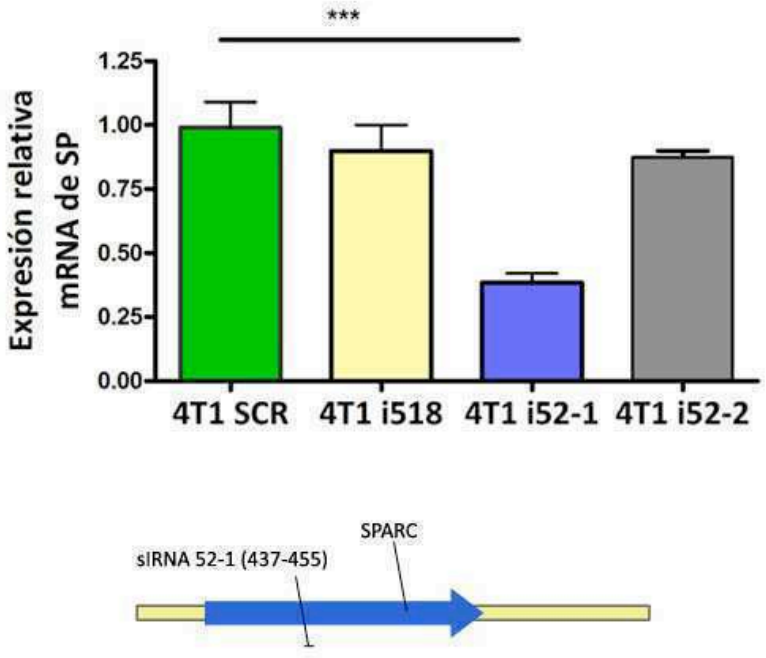



**Figura 14 La secuencia 52-1 resulta efectiva para silenciar SPARC murina.** PCR en tiempo real para SPARC en la línea 4T1 transducida con tres secuencias de ARN de interferencia contra SPARC. Como virus control se utilizó la secuencia 52-1 mezclada al azar, SCR. Como gen normalizador se utilizó $\beta_2$ microglobulina, y se determinó de manera arbitraria como nivel 1 de expresión el observado en la línea 4T1 SCR.*** P<0.001. En la parte inferior se señala la región del mensajero de SPARC contra la que se diseñó la secuencia 52-1.

El porcentaje de silenciamiento alcanzado con el siARN 52-1 fue evaluado por PCR en tiempo real, Western blot del medio condicionado (dado que SPARC es una proteína clásica de secreción) y del extracto celular, y por inmunofluorescencia (Figura 15). Obtuvimos aproximadamente un silenciamiento del 70% en la expresión del mensajero de SPARC utilizando la secuencia 52-1 respecto de la secuencia control, SCR.

A partir de este resultado, se decidió trabajar con la línea 4T1 SCR como control y con la línea 4T1 L.52-1 como modelo de SPARC silenciado.

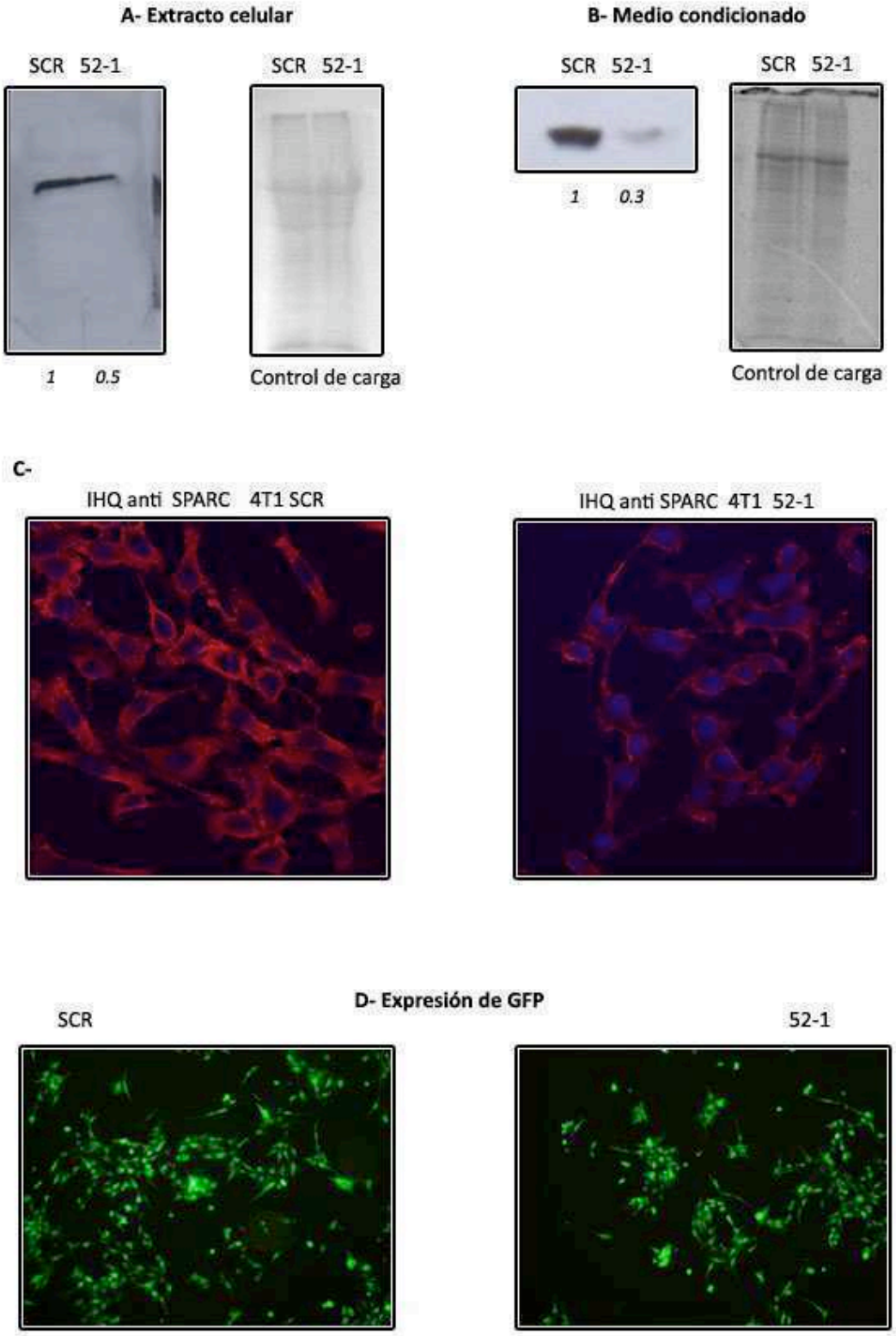



**Figura 15La secuencia 52-1 inhibe la expresión de SPARC en aproximadamente un 70%**.A y B corresponden a western blot de extracto celular y medio condicionado, respectivamente, de las líneas 4T1 control (SCR) y con

SPARC silenciado (52-1). En la parte inferior de cada Western blot se señala la cuantificación de la señal relativizada a la línea control (de intensidad 1), y normalizada según el control de carga que se muestra a la derecha de cada western blot. C- En rojo se marca la expresión de SPARC por inmunofluorescencia, en las líneas 4T1 SCR y 52-1. (60x) D- En verde se marca la expresión de GFP en las líneas 4T1 SCR y 52-1 indicando que ambas líneas fueron transducidas de manera eficiente con el lentivirus. (20x)

Para evaluar la eficiencia de silenciamiento de SPARC en la línea IBH-6 luego de la transducción con el L.51 (Figura 16), se realizó PCR en tiempo real e inmunocitoquímica; como virus control se utilizó la secuencia 51 mezclada al azar. Obtuvimos aproximadamente un 70% de inhibición en la expresión del mensajero de SPARC.

Cabe aclarar que en la línea IBH-6 no pudimos detectar *in vitro* por western blot, la expresión de SPARC ni en el extracto ni en el medio condicionado concentrado más de 500 veces. Sin embargo si pudimos detectar su expresión por western blot en los tumores inoculados en ratones Nu/Nu SP-/- (ver más adelante).

Para evaluar la eficiencia de transducción de los lentivirus, se evaluó la expresión de GFP ya que el vector que contiene el siARN también contiene el gen de la proteína GFP. Como se puede observar en la Figura 16b, más de un 95% de las células fueron transducidas de manera eficiente.

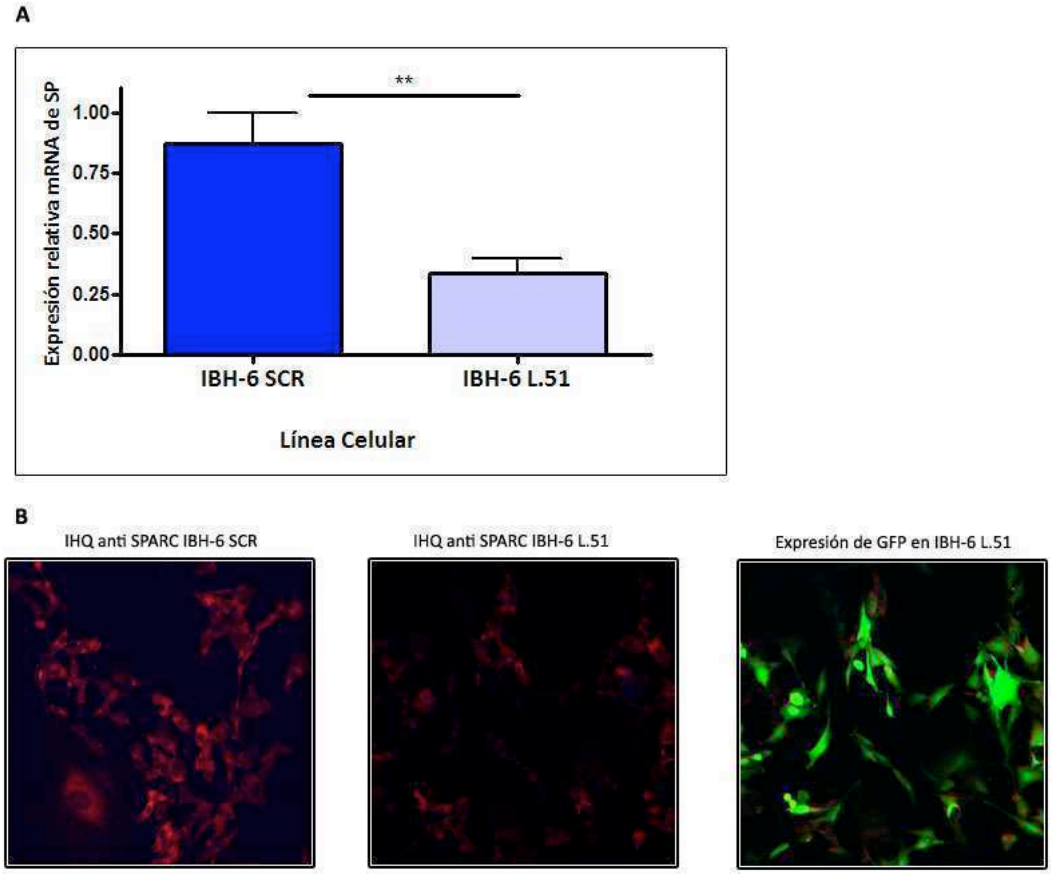



**Figura 16. La secuencia 51 resulta efectiva para silenciar SPARC humana**. A- Niveles de expresióndel mensajero de SPARC en las líneas IBH-6 SCR versus IBH-6 L.51, como gen normalizador de la reacción se utilizó HPRT, y se determinó de manera arbitraria como nivel 1 de expresión, el observado en la línea IBH-6 SCR. (** $p < 0.01$). B- Expresión de SPARC (Rojo) evaluada por microscopía de inmunofluorescencia (20x).Como control de eficiencia de transducción se evaluó la expresión de GFP (Verde) (40x).

En base a esto se decidió trabajar con la línea IBH-6 L.51 como modelo de SPARC silenciado y con la línea IBH-6 SCR como control.

## *Obtención de los modelos de ratón nulos para la expresión de SPARC, ratones (SP-/-)*

Para estudiar el efecto que posee SPARC por parte del estroma, las líneas IBH-6 SCR y L.51 fueron inoculadas en ratones inmunodeficientes Nu/Nu (SP+/+) y en ratones Nu/Nu nulos para SPARC (SP -/-), los cuales fueron gentilmente donados por la Dra. Koblinski en el año 2006. En este punto es importante aclarar que los ratones Nu/Nu generalmente utilizados en investigación tienen como fondo genético N:NIH (s)-FoxnI, que es diferente al fondo genético

de los ratones SP-/- (N:NIH (s)-FoxnIy C57 BL foxn1-wt/SP-ko). Por ello, antes de comenzar los experimentos debimos realizar retrocruzas entre los ratones N:NIH (s)-FoxnIy C57 BL foxn1-wt/SP-ko y los ratones N:NIH (s)-FoxnI . Luego de la primer retrocruza obtuvimos animales heterocigotos para SPARC (SPARC+/-), los cuales fueron a su vez apareados entre sí por lo menos durante 5 generaciones para obtener machos y hembras SPARC+/+ y SPARC-/- con el mismo fondo genético. En la Figura 17 se ilustra el resultado obtenido en una camada de genotipificación típica.

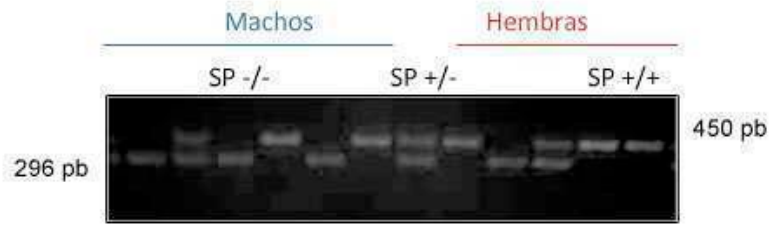



**Figura 17. En la colonia de ratones Nu/Nu contamos con ratones nulos, salvajes y heterocigotas para SPARC.** Resultado de una PCR de ADN genómico obtenido de la cola de los ratones transgénicos SPARC +/+, SPARC -/- y SPARC +/-.

# Capítulo II Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento del cáncer de mama humano.

Los datos publicados para diversos tipos tumorales en general y en cáncer de mama en particular, ya sea a partir de muestras de pacientes o de modelos animales, asocian la expresión de SPARC con tumores más agresivos, aunque recientemente aparecieron discrepancias al respecto. En base a esto nos propusimos evaluar:

1-El efecto que posee SPARC secretado por el estroma en la biología del cáncer de mama humano. Para lo cual utilizamos el modelo de ratones Nu/Nu SP-/- en los que inyectamos células de cáncer de mama humano IBH-6, donde evaluamos la cinética de crecimiento y las características histopatológicas de los tumores.

2- El efecto que posee la expresión de SPARC por parte del epitelio en la adquisición de características de malignidad y el crecimiento del tumor primario para lo cual silenciamos la expresión de SPARC en la línea IBH-6 y evaluamos parámetros de malignidad in vitro e in vivo.

3-El efecto combinado que ejerce la expresión de SPARC por parte del epitelio y del estroma al crecimiento tumoral. Esto fue evaluado integrando los datos obtenidos en los experimentos realizados con la línea IBH-6 con alto y bajos niveles de SPARC con el modelo de ratones nulos para SPARC.

4-La relación que existe entre los niveles de expresión de SPARC en el tumor primario de diferentes estadios de evolución y la presencia de metástasis axilares en muestras de pacientes con cáncer de mama. Estos datos fueron evaluado utilizando arboles binario de decisión a fin de determinar cuáles de los parámetros evaluados era el de mayor peso predictivo de la aparición de metástasis.

## *1-Efecto de la modulación exógena de SPARC sobre el fenotipo maligno de la línea IBH-6*

### SPARC se expresa durante el crecimiento in vivo de la línea IBH-6

En esta parte de la tesis nos propusimos determinar, utilizando el modelo experimental de generación de tumores de la línea IBH-6 en ratones, si SPARC secretada por el epitelio tumoral o por el estroma disparan diferentes mecanismos que favorecen o inhiben el crecimiento de un tumor.

Para ello, primero confirmamos que SPARC se expresaba durante el crecimiento de tumores derivados de la línea IBH-6, no sólo en el epitelio tumoral, sino que también en los diferentes tipos celulares que acompañan la evolución del tumor.

Experimentalmente se inyectaron células IBH-6 SCR en la glándula mamaria de ratones inmunodeficientes. Se obtuvo ARN de dos tumores a las 24hs, 7 y 14 días post inyección y se analizó la expresión de SPARC por RT-PCR. Se diseñaron oligonucléotidos cebadores específicos que permitieran amplificar por PCR el mensajero de SPARC humana o murina en forma diferencial.

Como controles de especificidad de los cebadores de SPARC murino se utilizó ADNc (ADN copia) de dos líneas humanas, A375 e IBH-6 (controles negativos) y de dos líneas murinas 4T1 y CT26 (controles positivos para SPARC murino). La señal observada en la calle correspondiente a la línea A375 se considera una señal inespecífica. Como controles de especificidad de los cebadores de SPARC humano, se utilizó ADNc de dos líneas murinas, CT26 y 4T1 (controles negativos).

Como se puede ver en la Figura 18 A, la expresión de SPARC por parte del epitelio se mantiene desde el momento de la inyección, hasta por lo menos los 14 días post inyección.

La expresión de SPARC por parte del estroma se detecta a partir de los 7 días cuando el estroma ya es prominente (Figura 18B). Cabe aclarar que no se evaluaron tiempos mayores a 14 días debido que los tumores presentaban un gran porcentaje de necrosis.

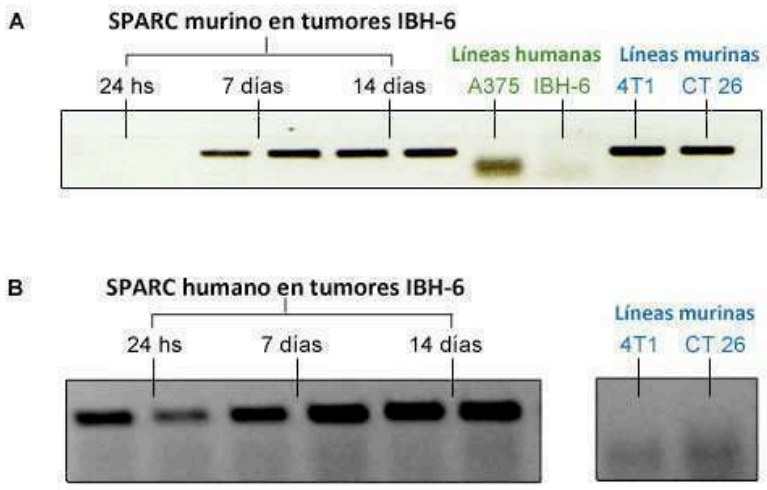



**Figura 18 La expresión de SPARC del epitelio se mantiene durante el crecimiento tumoral y es acompañada por la expresión de SPARC del estroma**. (A) RT-PCR para detectar específicamente la expresión de SPARC murino (B) RT-PCR para detectar específicamente SPARC humano. Como controles de la especificidad de los partidores, se usaron dos líneas humanas A375 e IBH-6 y dos de ratón 4T1 y CT26

Para confirmar estos resultados, evaluamos la expresión de SPARC en cortes histológicos de tumores de ratones Nu/Nu inoculados ortotópicamente con la línea IBH-6 SCR. Los animales fueron sacrificados a las 24hs, 7 y 14 días postinoculación de las células y se extrajeron los tumores para su posterior análisis histológico. La tinción inmunohistoquímica mostrada en la Figura 19, muestra una importante marca para SPARC en las células epiteliales humanas en todos los tiempos analizados, confirmando así el resultado obtenido por RT-PCR.

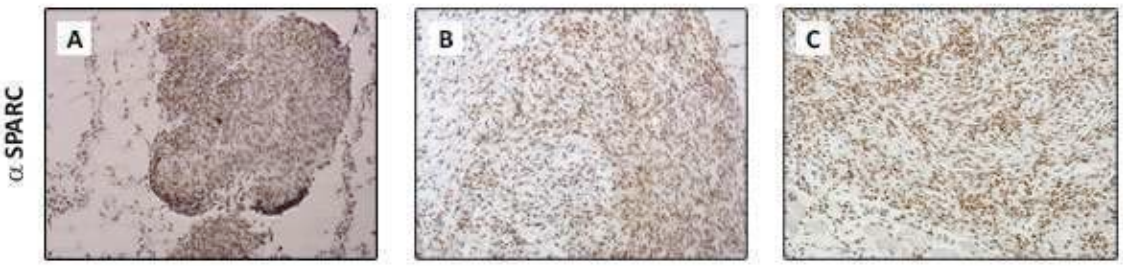



**Figura 19 SPARC se expresa durante el crecimiento in vivo de la línea IBH-6.** Tinción Inmunohistoquímica para SPARC humana en tumores de 24 horas (A), 7 días (B) y 14días(20x).

Cuando realizamos el análisis histológico de los tumores por tinción con Hematoxilina Eosina (H&E), a fin de evaluar el tipo de células del estroma que acompañan el crecimiento del tumor

encontramos, a los 15 días post inyección de las células, un gran número de vasos sanguíneos en la periferia del tumor (Figura 20 A). Asimismo, observamos un importante número de fibroblastos y algunos macrófagos. La reacción inmunohistoquímica (IHQ) confirmó que ese estroma que acompaña el crecimiento del tumor expresa SPARC (Figura 20 B y C).

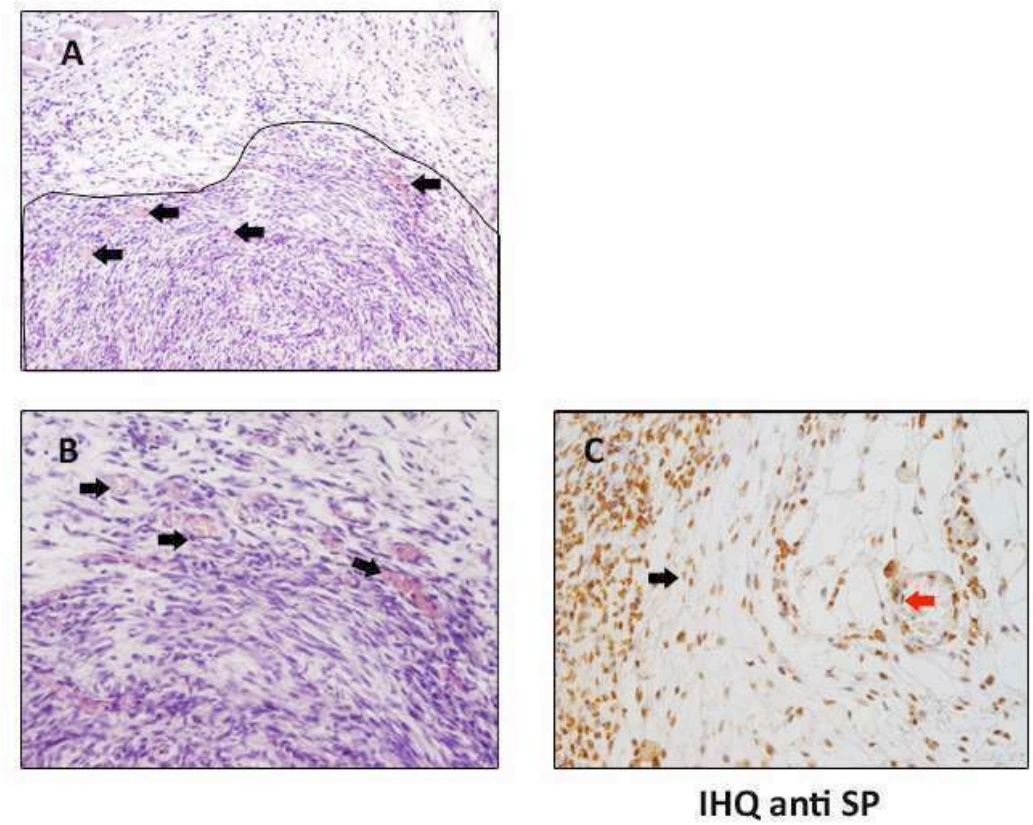



**Figura 20 La expresión de SPARC en el estroma en los tumores de la línea IBH-6 se detecta en fibroblastos, y endotelio.** A.Tinción con hematoxilina y eosina donde se señalan algunos vasos sanguíneos presentes en la periferia del tumor, la línea negra señala el borde del tumor. (20x) B.Imagen aumentada de A donde se muestran con mayor detalle los vasos sanguíneos de la periferia, (40x). C. tinción inmunohistoquímica para SPARC donde se señalan con flechas negras fibroblastos positivos y con flechas rojas, endotelio positivo. (40x)

## SPARC del estroma posee un leve efecto favorecedor del crecimiento tumoral.

Una vez confirmada la expresión de SPARC en el estroma de los tumores generados mediante el modelo antedicho, pasamos a estudiar su efecto en el crecimiento tumoral. Para ello inyectamos células de la línea IBH-6 SCR (que expresa SPARC) en la glándula mamaria de ratones salvajes Nu/Nu (SP+/+) y SPARC null (SP-/-), y comparamos la cinética de crecimiento en ambos genotipos (Figura 21). Para todos los ensayos realizados con la línea IBH-6 determinamos que el punto final del experimento sería cuando los tumores del grupo control

alcanzaran un volumen de sacrificio aproximado de entre 2000 y 2500 $mm^3$, siguiendo las normas del CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio).

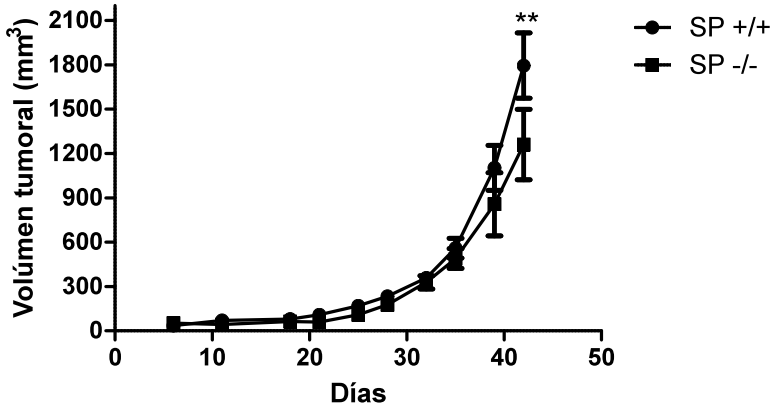



**Figura 21 SPARC del estroma favorece levemente el crecimiento del tumor.** Crecimiento in vivo de la línea IBH-6 SCR en ratones SP+/+ y SP-/-. Se muestra un ensayo representativo de las 3 réplicas biológicas realizadas con un n = 4 animales por grupo experimental. (** $p < 0.01$)

Si bien no encontramos diferencias en la velocidad de crecimiento de la línea IBH-6 en ambos genotipos, a tiempo final, los tumores IBH-SCR creciendo en los ratones SP-/- eran de un tamaño levemente menor, aunque estadísticamente significativo, que los obtenidos en los ratones SP+/+. Este resultado nos lleva a postular que SPARC producida por el estroma contribuye levemente al crecimiento del tumor.

Dado que no obtuvimos diferencias relevantes a nivel macroscópico en cuanto a la velocidad de crecimiento del tumor primario, decidimos hacer un detallado análisis histológico, para determinar si existían cambios en la arquitectura del tumor; en la literatura no se han reportado todavía estudios de crecimiento de tumores de mama humanos en este tipo de ratones Nu/Nu SP-/-. El análisis histológico incluyó la evaluación de parámetros relacionados con funciones biológicas conocidas para SPARC tales como la deposición de colágeno, el infiltrado inflamatorio y la angiogénesis.

Comenzamos estudiando la histopatología de los tumores por tinción con Hematoxilina Eosina (H&E). Como se puede observar en la Figura 22, en ambos genotipos se observa una

importante necrosis central temprana, presente tanto a las 48 como a las 120hs, de aproximadamente un 60% del campo observado, donde la región de células viables se encuentra en la periferia del tumor.

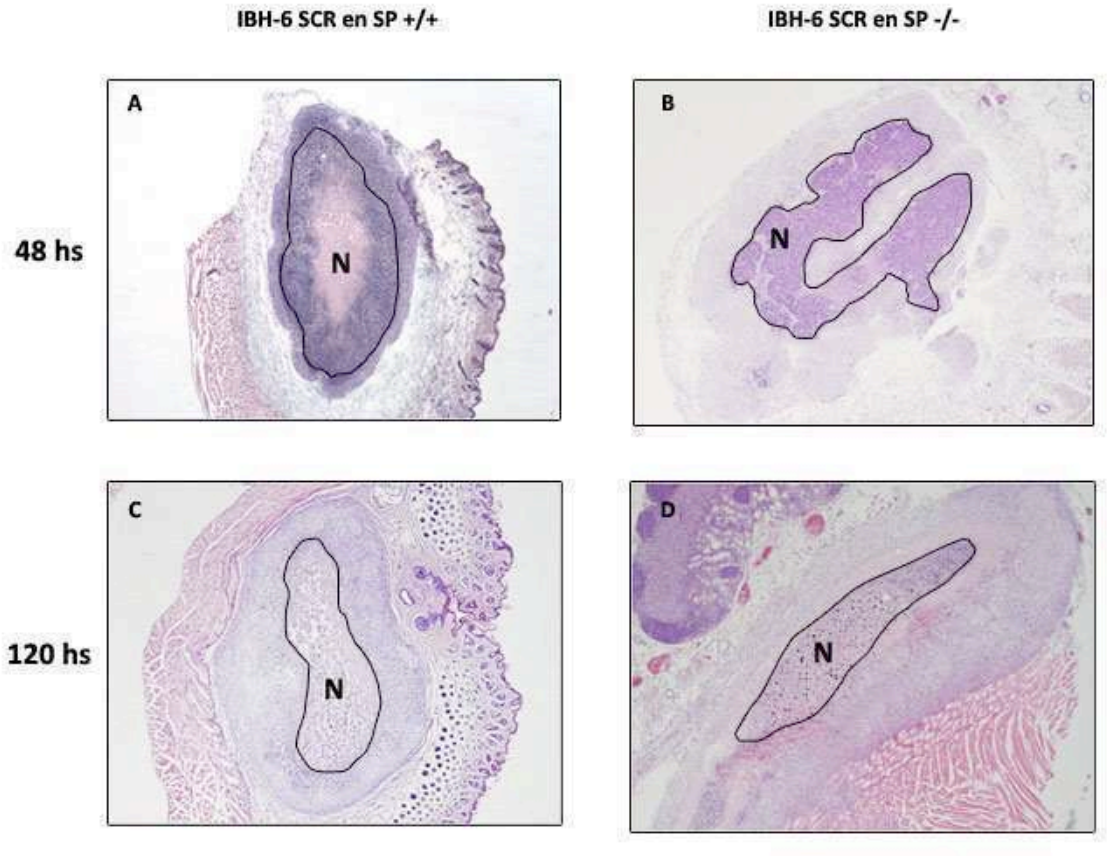



**Figura 22La línea IBH-6 presenta características histológicas similares creciendo en ratones SP+/+ o SP-/-.**A. y B. Imágenes de H&E de tumores de 48 horas de la línea IBH-6 SCR en ratones SP +/+ y SP-/- respectivamente. C y D Imágenes de H&E de tumores de 120 horas de la línea IBH-6 SCR en ratones SP +/+ y SP-/- respectivamente. En todos los casos se observa un importante porcentaje de necrosis, señalado como N. Todas las imágenes tienen un aumento de 20x

Diversos trabajos (tanto en cáncer como en modelos de fibrosis) reportan que SPARC puede cumplir una función anti inflamatoria (Ledda, 1993; Alvarez, 2005; Sangaletti, 2008; Sangaletti, 2011; Atorrasagasti, 2011; Wang, 2010), fue por ello que caracterizamos el tipo y cantidad de infiltrado inflamatorio en nuestro modelo. Observamos un 50% más de neutrófilos por campo en la periferia de los tumores inyectados en los ratones SP-/- (aproximadamente 75 neutrófilos por campo) en comparación con los inyectados en los ratones SP +/+ (aproximadamente 50

neutrófilos por campo). Esta diferencia se observó tanto a las 48 como a las 120 horas (Figura 23). No obtuvimos diferencias en el número de macrófagos por campo en ninguno de los tiempos y tratamientos analizados. Estos resultados indican que la ausencia de SPARC en el estroma promueve un reclutamiento mayor de neutrófilos que permanecen en la periferia y que podrían tener un rol eventual en las ligeras diferencias en cuanto al tamaño de los tumores a tiempo final. Este aspecto y las diferencias con estudios previos de nuestro grupo se discuten más adelante.

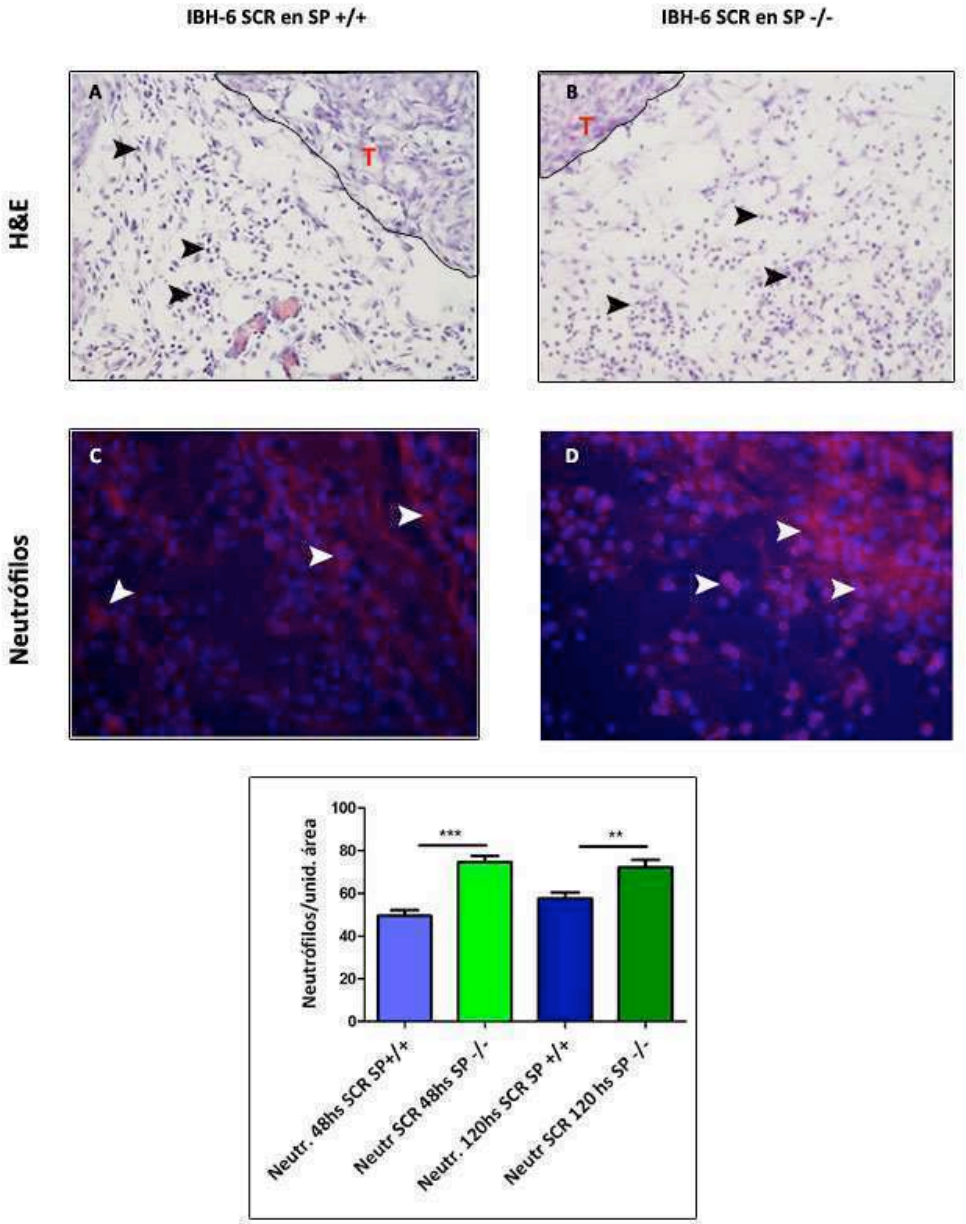



**Figura 23 Los tumores creciendo en los ratones SP-/- poseen mayor cantidad de neutrófilos por campo comparado con los tumores creciendo en los ratones SP+/+.** A. y B corresponden a imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina de tumores de 48 horas. Con la letra T se señala la zona del tumor y con puntas de flecha se hace referencia células del sistema inmune presentes en la periferia del tumor (40x). C. y D. corresponden a imágenes representativas de la tinción inmunofluorescente contra neutrófilos. En la parte inferior se cuantifica el número de neutrófilos a las 48 y 120 horas post inyección. Se cuantificaron 4 campos de tres tumores por tiempo por tratamiento (*** $p < 0.001$, **$p<0.01$)

Otro parámetro relacionado con la presencia de SPARC en la matriz extracelular es la deposición de colágeno. Para evaluar la presencia de colágeno tipo I, tanto intra como peri tumoral, utilizamos la tinción Tricromico de Masson. La intensidad de la señal azul y el porcentaje de área marcada se cuantificaron utilizando un algoritmo implementado en el

programa MatLab. Cuanto más denso en cuanto a fibras de colágeno es el tejido, más intensa es la coloración azul obtenida. Realizando este análisis, encontramos que en los ratones SP-/- a las 48 horas post inyección del tumor, existe un fuerte edema peritumoral, que es reemplazado en tiempos posteriores por colágeno. La cuantificación del área marcada y de la intensidad de la señal azul, mostró que a tiempos tempranos (48 horas) tanto el porcentaje del área positiva para colágeno como la intensidad de la señal es mayor en ratones SP+/+. A las 120 horas, si bien la intensidad de la señal sigue siendo mayor en los ratones SP+/+, el área positiva es mayor en los ratones SP-/-, posiblemente debido a que la matriz es más laxa (Figura 24).

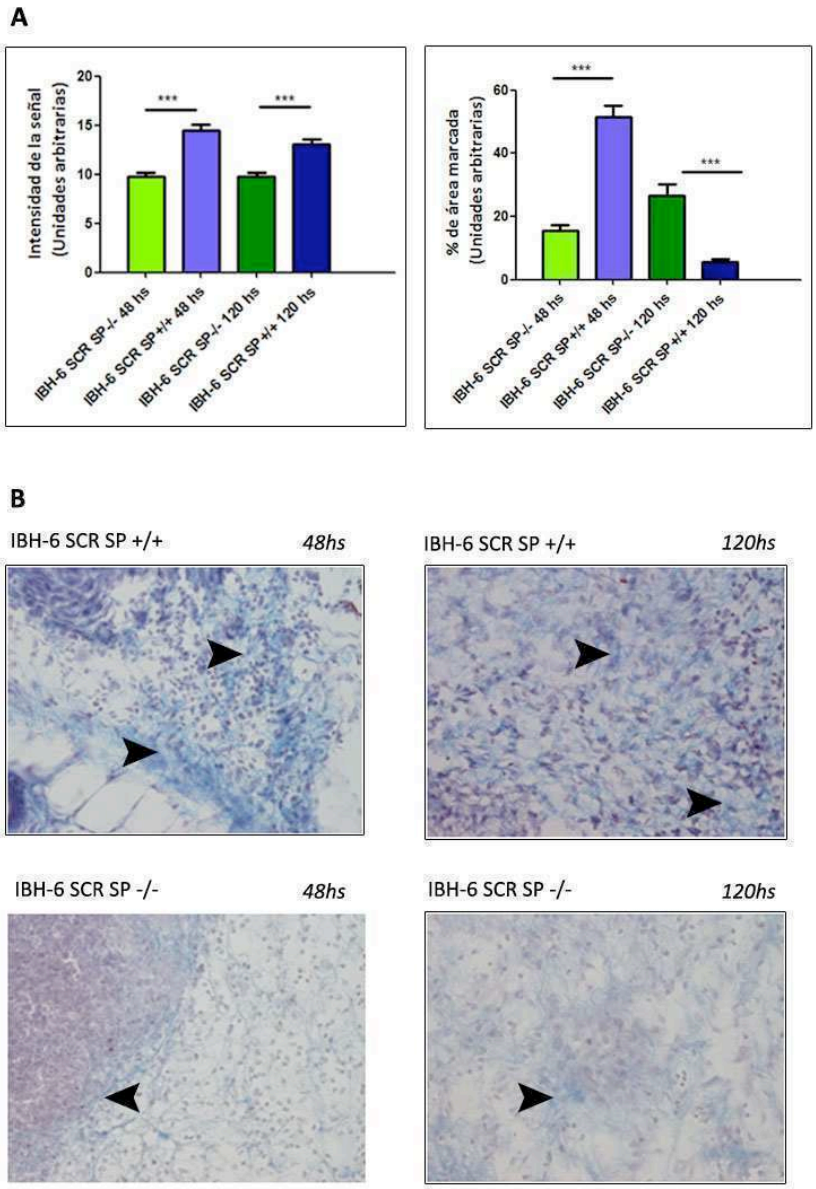



**Figura 24 La deposición de colágeno es diferente en ratones SP+/+ versus SP-/-.** A Cuantificación de la intensidad de la señal y el % de área positiva para colágeno. B Imágenes representativas de la tinción Tricromico de Masson en tumores de 48 y 120 horas de la línea IBH-6 SCR en ratones SP+/+ y SP-/- (20x). Se cuantificaron 4 campos de tres tumores por tiempo por tratamiento (*** $p < 0.001$)

No se observaron cambios significativos en el número de vasos presentes en los tumores de ambos genotipos, evaluada por inmunotinción contra CD31 (dato no mostrado).

En resumen, pudimos detectar la presencia de SPARC en los tumores de la línea IBH-6, tanto en células del epitelio como del estroma tumoral, de los tumores crecidos en ratones SP+/+. Al

igual que en otros trabajos de la literatura que utilizan modelos de cáncer de mama (Sangaletti, 2008, Wong 2008), en nuestro modelo, no encontramos importantes cambios en el crecimiento de los tumores, aunque a tiempo final observamos una pequeña diferencia estadísticamente significativa que señala que los tumores creciendo en los ratones SP+/+ son de mayor tamaño. Sin embargo, observamos diferencias histopatológicas asociadas a la ausencia de SPARC tales como un aumento en el número de neutrófilos reclutados y una disminución en la deposición de colágeno a tiempos tempranos post inyección del tumor. En otros modelos como cáncer de páncreas, estos cambios generados en el microambiente tumoral poseen importantes efectos en el crecimiento del tumor. No podemos descartar que aunque no haya efectos apreciables en el crecimiento del tumor primario, la diferencia de expresión de SPARC por parte del estroma no tenga efecto a nivel de la progresión tumoral metastásica. Este modelo no nos permite evaluar dicha progresión, y por ello es un modelo de respuesta limitada. En la Discusión retomaremos el análisis de estos resultados.

## *2-Efecto de la modulación endógena de SPARC sobre el fenotipo maligno de la línea IBH-6.*

Las evidencias experimentales mostradas hasta el momento dan cuenta de que el nivel de expresión de SPARC en células del estroma tumoral, si bien es estadísticamente significativo, no parece tener relevancia biológica en relación al crecimiento del tumor IBH-6. En una segunda etapa silenciamos la expresión de SPARC y evaluamos parámetros relacionados con malignidad tumoral como proliferación, invasión y migración*in vitro*.

### a) Proliferación

Para evaluar si la modulación de SPARC en el epitelio posee algún efecto en la capacidad proliferativa de nuestras células *in vitro*, utilizamos la técnica de MTS (Cory et al., 1991). Sevaluó el número de células presentes cada 24 horas desde el tiempo 0 hasta las 72 horas postsiembra en presencia o no de 1 μg/ml de proteína SPARC agregada al medio (Figura 25). Cantidades mayores de SPARC no modificaron este comportamiento (no mostrado).

En general no encontramos cambios apreciables en el comportamiento de la línea IBH-6 con o sin siARN para SPARC, en lo que se refiere a proliferación *in vitro*. Sin embargo, se observa una tendencia al aumento en la capacidad proliferativa de las células que expresan menores

niveles de SPARC endógeno (Figura 17A), que no fue modificada por el agregado exógeno de SPARC (Figura 17B). Por otro lado, SPARC exógeno posee un leve efecto favorecedor de la proliferación en la línea que mayores niveles de SPARC expresa (Figura 17C). Aunque estadísticamente significativo, el efecto no parece ser de magnitud suficiente como para ser de significancia biológica.

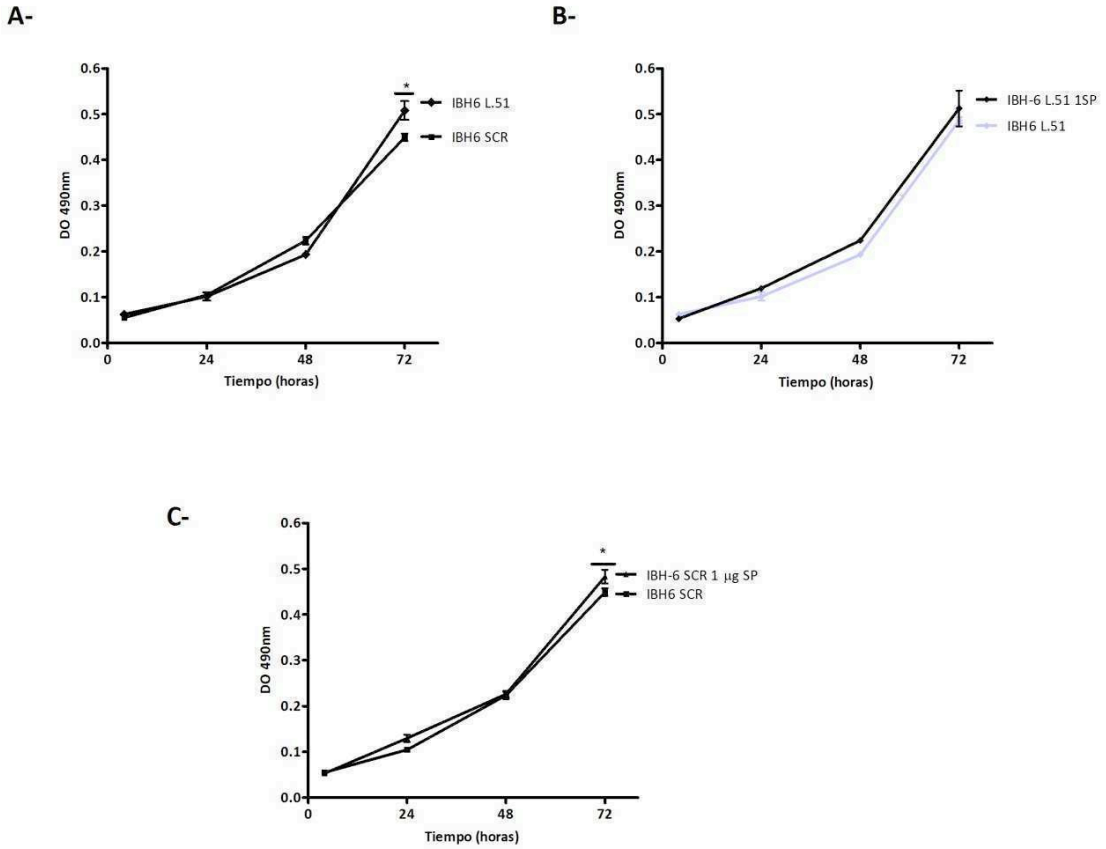



**Figura 25 La modulación de SPARC afecta levemente la proliferación in vitro.** A- Cinética de proliferación in vitro medida por MTS de las líneas IBH-6 SCR e IBH-6 L.51 (*P<0.05). B- Cinética de proliferación de la línea IBH-6 SCR L.51 con el agregado de 1μg/ml de SPARC al medio de cultivo (*P<0.05). C- Cinética de proliferación de la línea IBH-6 SCR con el agregado de 1μg/ml de SPARC al medio de cultivo.

**b) Migración e invasión**

El siguiente parámetro que analizamos fue la capacidad migratoria e invasiva *in vitro*. Para ello, utilizamos un ensayo funcional en cámara de Boyden modificada, utilizando membranas cubiertas con fibronectina (ensayo considerado de migración), o de Matrigel (ensayo considerado de invasión). Como se puede ver en Figura 26 A y B, la disminución forzada de la expresión de SPARC en las células IBH-L.51 suprime fuertemente la capacidad migratoria e invasiva de las mismas. El hecho de que haya diferencias significativas en la movilidad de las células, en ausencia de quimioatractante (0%SFB), estaría indicando que la disminución de SPARC está inhibiendo el movimiento basal de las células (quimioquinesis).

Para confirmar la disminución en la capacidad invasiva de las células luego de la disminución forzada de la expresión de SPARC, utilizamos una variante del ensayo de invasión recientemente publicada (Wiggins and Rappoport, 2010). En este ensayo se coloca en una placa de 6 pocillos gotas de Matrigel (esferas), se dejan solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se siembran las células. Luego de 48 horas se evalúa la capacidad de las células de degradar el Matrigel y e invadir hacia el interior de la esfera. A partir de la marcación de los núcleos con el colorante de Hoechst y posterior recuento utilizando el programa ImageJ podemos determinar, no solo la cantidad de células que invaden el Matrigel, sino también la distancia que recorren dentro de la gota. Como se observa en la Figura 26 C, las células que presentan menores niveles de expresión de SPARC no solo poseen menor capacidad invasiva, sino que una vez establecido el frente de invasión, la distancia que pueden recorrer es menor.

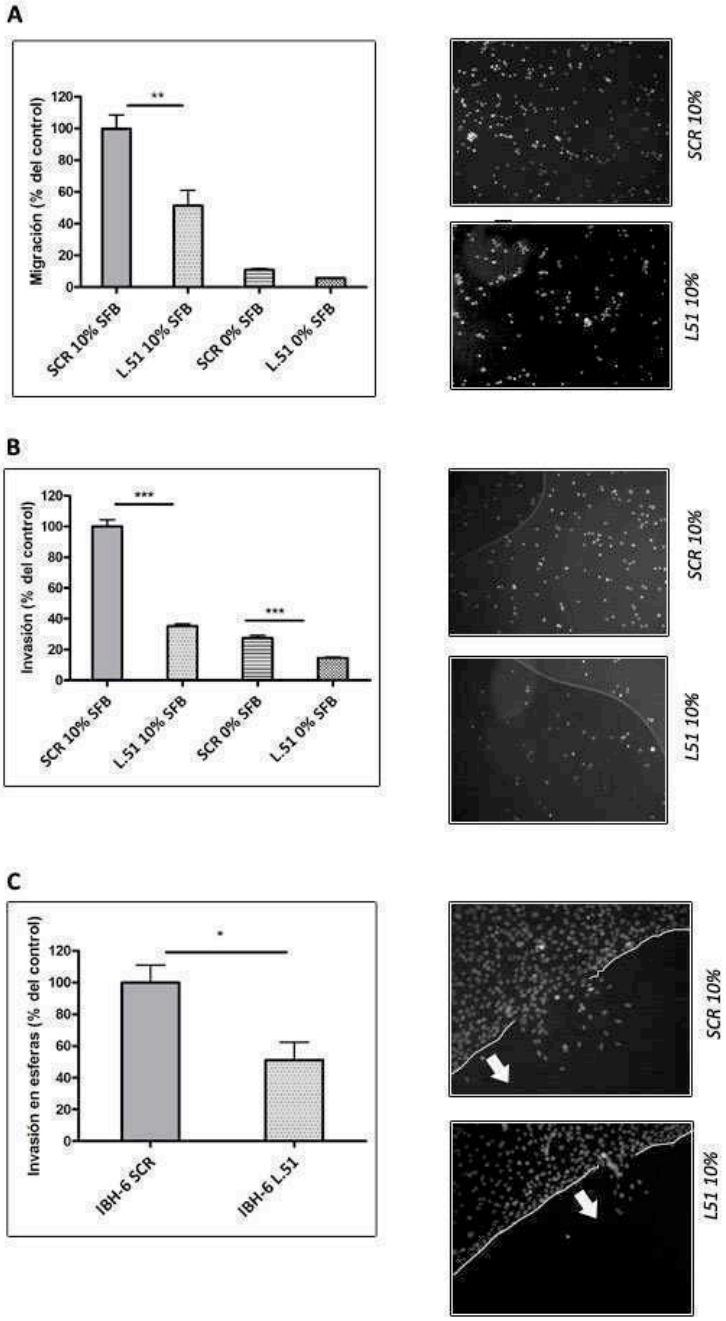



**Figura 26La inhibición de SPARC reduce la capacidad invasiva y migratoria de las células de cáncer de mama.** A-Ensayo de migración en fibronectina utilizando la cámara de boyden modificada, se graficó el % de migración respecto del control IBH-6 SCR. a la derecha se muestran imágenes representativas de los gráficos en presencia de quimioatractante. (20x), B-Ensayo de invasión en Matrigel utilizando la cámara de Boyden modificada,se graficó el % de invasión respecto del control IBH-6 SCR, a la derecha se muestran imágenes representativas de los gráficos en presencia de quimioatractante. (20x). C-Ensayo de invasión en esferas de matrigel, ,se graficó el % de invasión respecto del control IBH-6 SCR a la derecha se muestran imágenes representativas de los gráficos, donde se señalan el borde de la esfera de Matrigel y con flechas se indica el sentido hacia el cual las células invaden. (40x). ***p<0.001;**p<0.01, *p<0.05

Un trabajo recientemente publicado describió que la línea IBH-6 presenta claros signos de transición epitelio-mesenquimal (TEM) ya que presenta altos niveles de Twist y bajos niveles de E-Cadherina (Lapyckyj et al., 2010). Debido a que SPARC es una proteína capaz de favorecer la TEM(Girotti et al., 2011), decidimos evaluar si la modulación de la expresión de SPARC podía generar cambios en los niveles de expresión de marcadores de TEM.

Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real muestran que la disminución forzada de SPARC induce una disminución en la expresión de factores claves en la TEM como Twist y SNAIL. Estos resultados nos permiten concluir que la inhibición de la capacidad invasiva observada luego de la disminución en la expresión de SPARC, es coincidente con la pérdida de marcadores TEM (Figura 27).

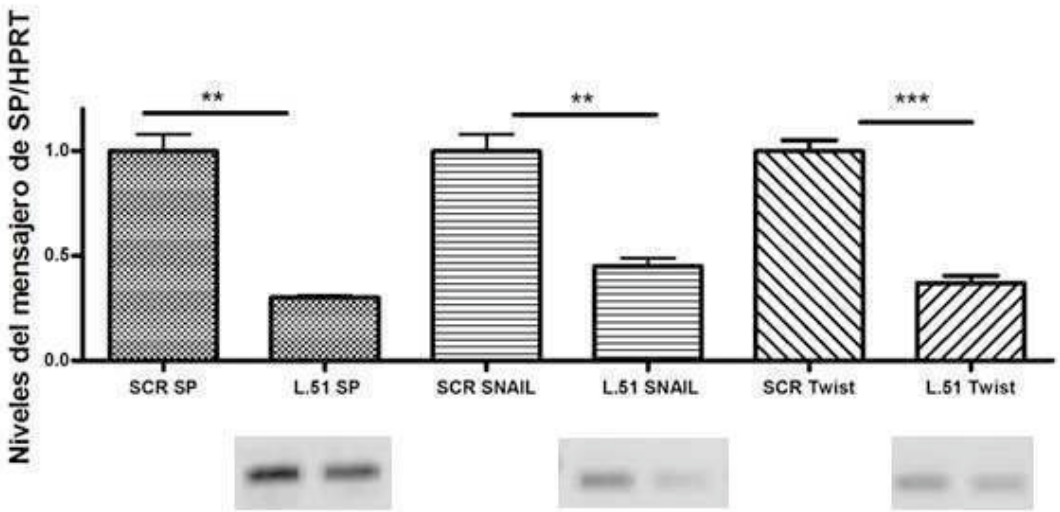



**Figura 27 Los factores de transcripción Snail y Twist dismunuyen su expresión junto con SPARC.** En la parte superior se muestran los niveles de cambio de SPARC, Snail y Twist en las líneas IBH-6 SCR y L.51 en la parte inferior se muestran los amplicones obtenidos. ***p<0.001;**p<0.01

Posteriormente analizamos la expresión por inmunocitoquímica de dos genes blanco de Snail, E y N-Cadherina. Snail induce un cambio en la expresión de E por N-Cadherina durante la TEM. Como se observa en la Figura 28, junto con la disminución en la expresión de SPARC se produce un aumento en la expresión de E-Cadherina, consistente con la disminución de Snail. Como ya había sido previamente reportado, no detectamos la expresión de N-Cadherina en esta línea celular (Lapyckyj et al., 2010).

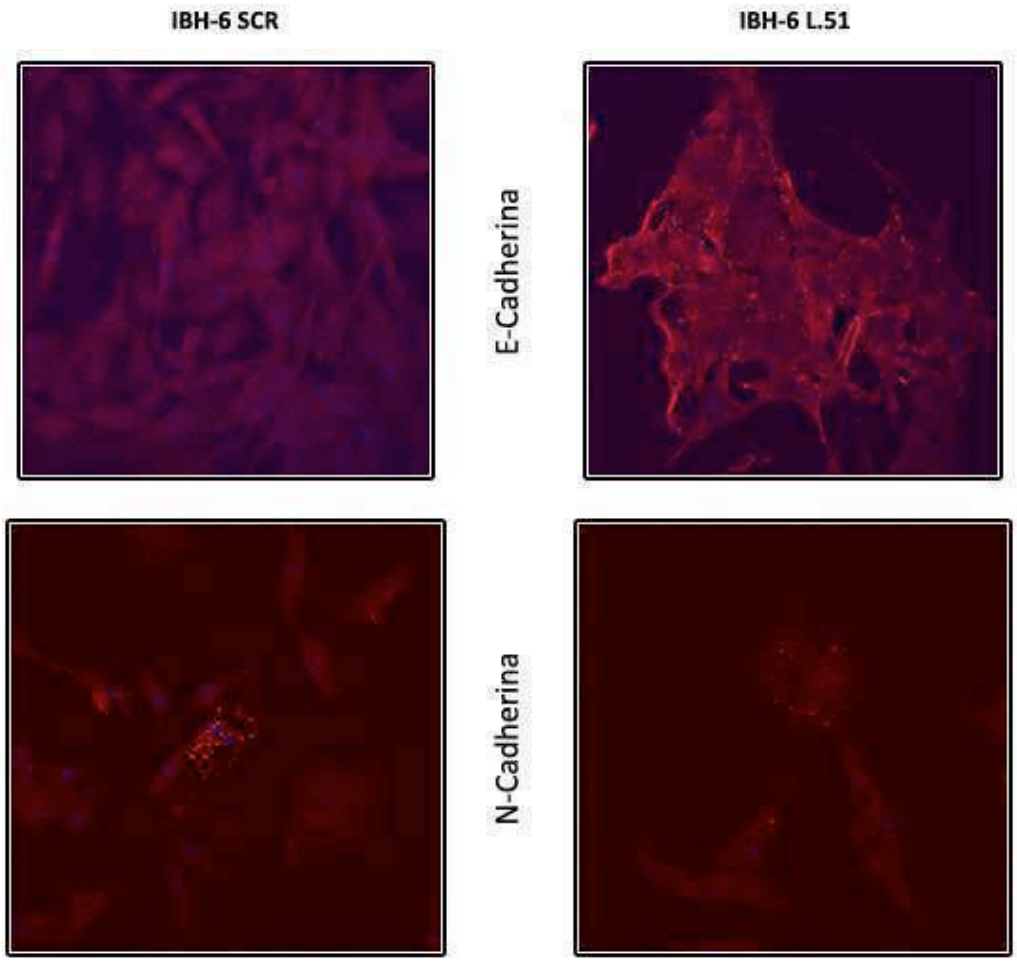



**Figura 28La disminución en la expresión de SPARC genera un aumento en la expresión de E-Cadherina**. En el panel superior se observa la expresión de E-Cadherina en las líneas IBH-6 SCR y L.51, en el panel inferior se muestra la expresión de N-Cadherina.

En resumen, podemos decir que si bien la expresión de SPARC no posee un efecto significativo sobre la capacidad proliferativa*in vitro* de las células IBH-6, disminuye la capacidad invasiva en forma coincidente con la reducción en los niveles de expresión de marcadores mesenquimales, confirmando que la expresión de SPARC correlaciona con un fenotipo más agresivo.

**Caracterización *in vivo***

Se evaluó posteriormente el crecimiento de las células IBH-6 L.51, con expresión disminuida de SPARC, en el modelo *in vivo* de ratones inmunodeficientes SPARC+/+. La disminución forzada de la expresión de SPARC indujo un aumento en el ritmo de crecimiento *in vivo* en ratones nude SP +/+ comparado con las células control IBH-6 SCR (Figura 29), demostrando que las células de cáncer de mama, con disminución forzada de la expresión de SPARC, pierden su capacidad de migración y de invasión *in vitro,* pero son capaces de proliferar *in vivo* en mayor medida que los controles; esta observación coincide con datos previamente reportados para SPARC en glioma (Rempel et al., 2001).

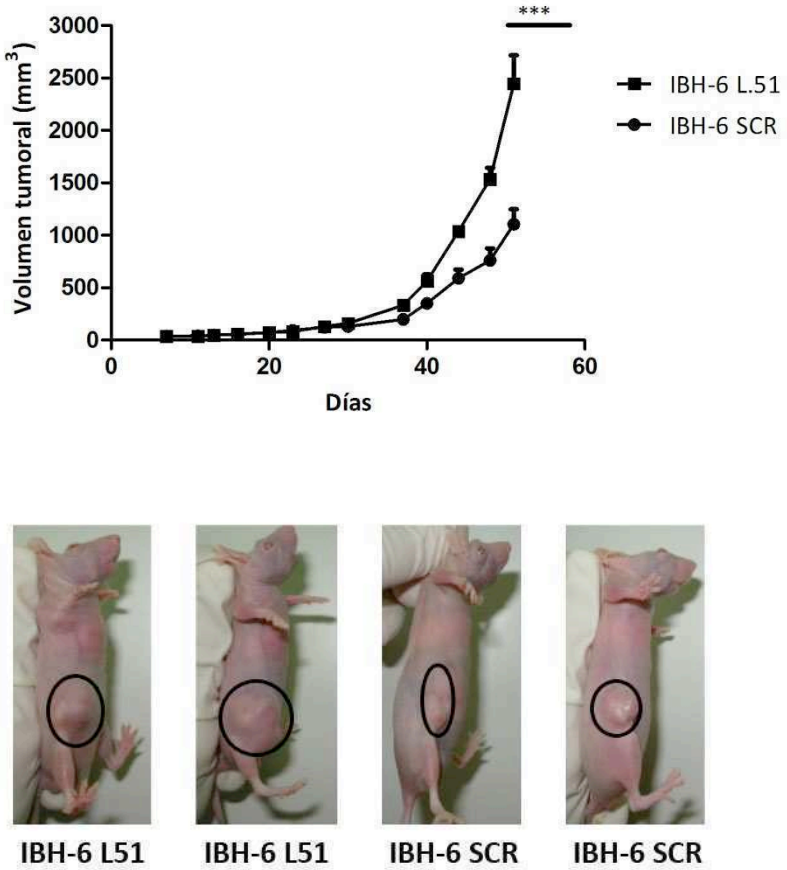



**Figura 29La línea con menores niveles de SPARC muestra una velocidad de crecimiento mayor in vivo en ratones SP+/+.** En la parte superior se indica la cinética de crecimiento de las líneas IBH-6 SCR e IBH-6 L.51 inyectadas en la glándula mamaria de ratones SP+/+. Se muestra un ensayo representativo de las 3 réplicas biológicas realizadas con un n = 4 animales por grupo experimental. En la inferior se muestran imágenes representativas de los tumores. ***P<0.001

Acompañamos el estudio de cinética de crecimiento con un detallado estudio histológico de los tumores que incluyó la evaluación de la presencia de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatorio, deposición de colágeno e índice de proliferación, a fin de poder encontrar una explicación a las diferencias observadas en el gráfico anterior.

Para corroborar si el aumento en el tamaños de los tumores IBH-6 L.51 en relación a los tumores IBH-6 SCR *in vivo,* se debían a un aumento en el número de células en proliferación, realizamos una inmuno-tinción utilizando el anticuerpo KI-67. El antígeno nuclear ki67, se expresa en células durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular, pero no en la fase $G_0$. La Figura 30, muestra que los tumores generados por la línea IBH-6 L.51 presentan un mayor número de células epiteliales proliferando, tanto a las 48 como a las 120 horas post inyección, que los tumores IBH-6 SCR.

Cabe aclarar que si bien el mayor número de células proliferando eran células epiteliales, a las 120 h también se detectaron fibroblastos positivos para Ki-67; sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto al número de fibroblastos proliferando entre ambos grupos experimentales.

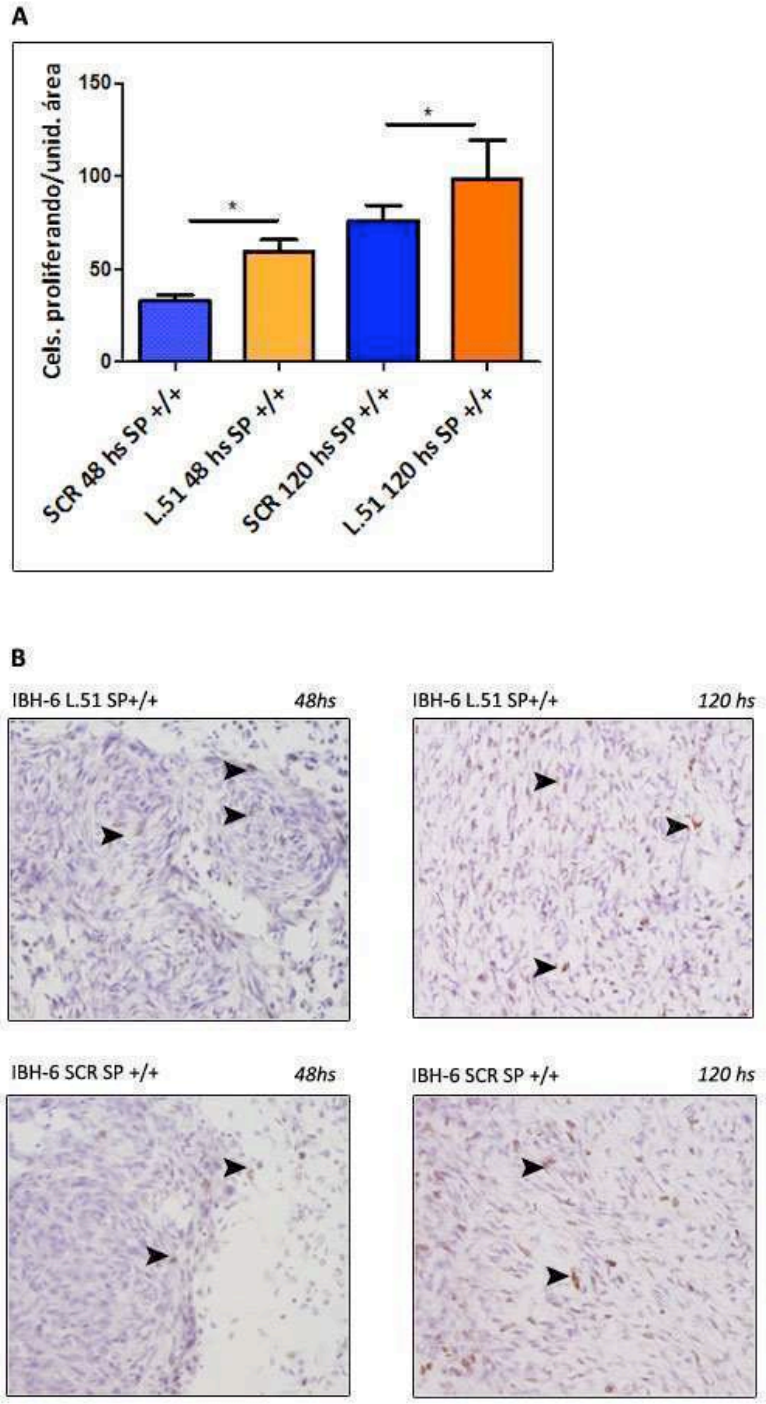



**Figura 30. El número de células proliferando es mayor en los tumores IBH-6 L51 que en los tumores IBH-6 SCR.**

A-Cuantificación de la Inmuno marcación para Ki-67 en tumores generados por las líneas IBH-6 SCR e IBH-6 L.51 a las 48 y 120 h post inyección de las células en la glándula mamaria de ratones SP+/+. *P< 0.05, ** P< 0.01. B-Imágenes representativas de los campos analizados, Se contaron entre 5 y 10 campos por tumor, dependiendo del tamaño de los tumores de 3 tumores por tiempo por tratamiento. Con flechas se señalan algunos núcleos positivos para ki-67. (20x)

La línea IBH-6 presenta la capacidad de invadir el peritoneo (Bruzzone et al., 2009), al disminuir niveles de expresión de SPARC, los tumores IBH-6 L51 pierden parcialmente dicha capacidad Figura 31, dato que coincide con la pérdida de capacidad migratoria e invasiva observada *invitro* (Figura 26).

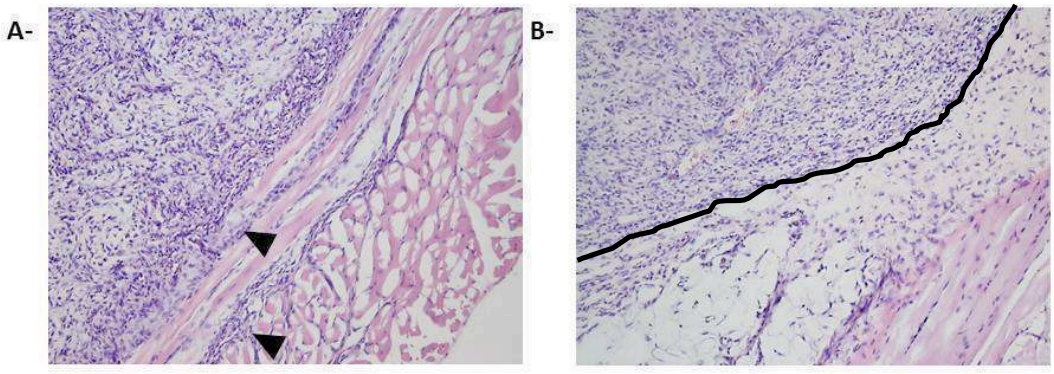



**Figura 31 La reducción en los niveles de expresión de SPARC genera pérdida de la capacidad invasiva *in vivo*.** A- Imagen representativa del borde de un tumor IBH-6 SCR 20 días post inyección. Se señalan con flechas, zonas de invasión. B- Imagen representativa del borde de un tumor IBH-6 L.51 20 días post inyección. (20x)

El análisis de la deposición de colágenomostró importantes diferencias en cuanto a la intensidad del color azul y el porcentaje de área positiva. La mayor intensidad y área positiva, se observó en los tumores generados por la línea IBH-6 SCR en comparación con los tumores generados por la línea IBH-6 L.51 a las 48 h postinyección del tumor. A las 120 h post inyección, la intensidad del color azul seguía siendo mayor en los tumores generados por la línea IBH-6 SCR, aunque las áreas positivas en ambos tipos tumorales no mostraron diferencias.Podíamos presuponer que el hecho de que los tumores de la línea IBH-6 L.51, generasen una matriz de colágeno más laxa podría favorecer el crecimiento del tumor. Sin embargo esta hipótesis no fue confirmada con la utilización de los ratones SP-/-. Lo que podemos presumir es que la disminución en los niveles de expresión de SPARC del estroma genera señales en el microambiente tumoral que afectan de manera distinta al crecimiento del tumor, que las señales generadas por la disminución en los niveles de SPARC del epitelio.

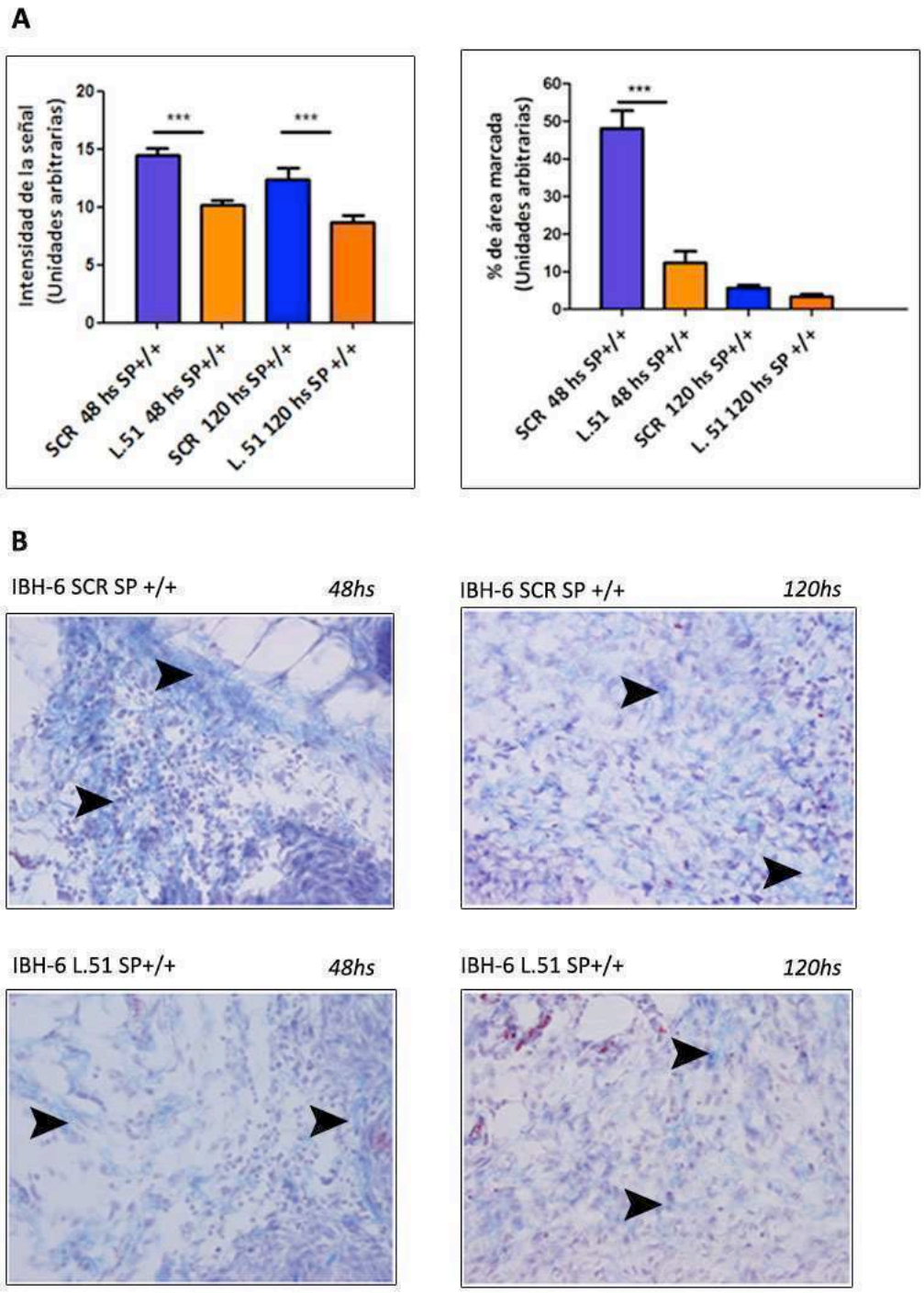



**Figura 32 La deposición de colágeno en mayor en lo tumores generado por la línea IBH-6 SCR.** A- Cuantificación de la intensidad del color azul indicativa de la maduración de las fibras de colágeno y del % del área de la foto positiva para colágeno. ***P<0.001. B- Imágenes representativas de los campos cuantificados. Con flechas se señalan fibras de colágeno. Para la cuantificación se tomaron 4 imágenes de cada tumor, de tres tumores por tiempo por tratamiento. (20x).

Finalmente, cuando cuantificamos el infiltrado inflamatorio, observamos un mayor reclutamiento de neutrófilos en los tumores IBH-6 L.51 comparados con los tumores IBH-6 SCR sólo a las 48 horas post inyección del tumor,dejando de ser esta diferencia estadísticamente significativa a las 120h.

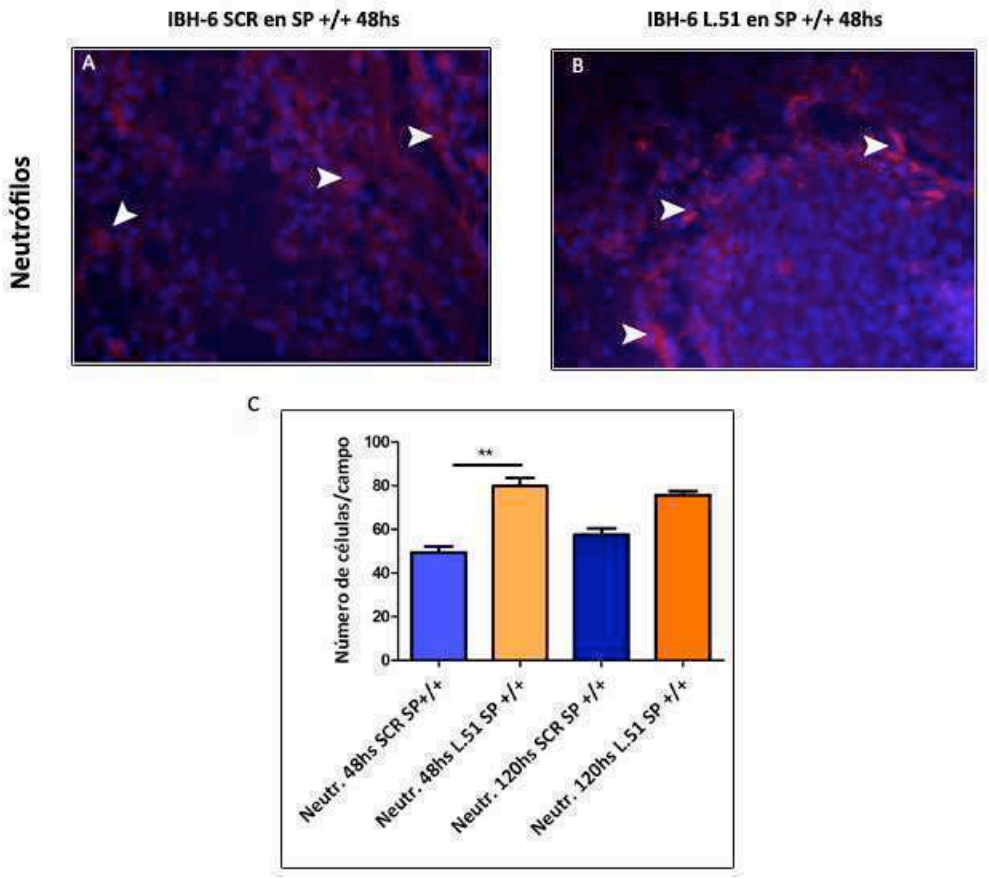



**Figura 33 El número de neutrófilos reclutados a las 48 horas post inyección del tumor es mayor en los tumores IBH-6 L.51 que en los tumores IBH-6 SCR.** A.y B Imágenes representativas de la tinción inmunofluorescente para neutrófilos. C. Cuantificación del número de neutrófilos por campo de los tumores IBH-6 SCR e IBH-6 L.51 a las 48 y 120 horas post inyección. Se cuantificaron 4 campos de tres tumores por tiempo por tratamiento analizado. **P<0.01.

El análisis del número de macrófagos por campo no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos a ninguno de los tiempos analizados.

En resumen, al bajar los niveles de SPARC en el epitelio encontramos, *in vivo,* una menor producción de colágeno y un mayor reclutamiento de neutrófilos a tiempos tempranos.

Asimismo, el número de células proliferando y el volumen tumoral, es mayor con respecto a la línea control que presenta altos niveles de SPARC. La vía a través de la cual todas estas características generan un mayor crecimiento del tumor no ha sido analizada, pero será discutida más adelante.

### *3-Efecto de SPARC secretada por el epitelio tumoral y el estroma sobre el crecimiento tumoral in vivo*

Cuando pasamos a evaluar el comportamiento *in vivo* de las células IBH-6 L.51 en ratones SP-/- encontramos que las diferencias de crecimiento se invierten fuertemente en relación al crecimiento en ratones SP+/+. Como se muestra en la Figura 34, se observa un importante retraso en la velocidad de crecimiento de los tumores IBH-6 L51, comparado con los tumores control IBH-6 SCR. Estas diferencias comienzan a detectarse en la fase de crecimiento exponencial de tumor, luego de 40 días de crecimiento tumoral. Si comparamos este resultado con el de la Figura 21, es evidente que hay una interacción entre la expresión de SPARC del epitelio y del huésped que modula la proliferación tumoral, de manera tal, que la disminución concomitante de SPARC en el estroma y en el epitelio tumoral reduce significativamente el crecimiento de estos tumores.

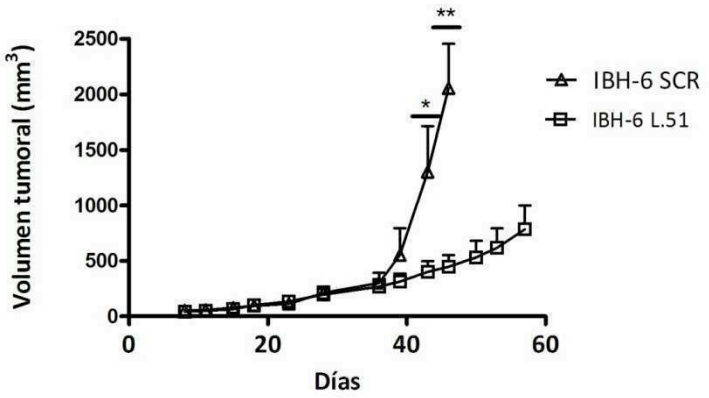



**Figura 34 La línea con menores niveles de SPARC muestra una cinética de crecimiento menor in vivo en ratones SP-/-.** A- Cinética de crecimiento de las líneas IBH-6 SCR y L.51 inyectadas en la glándula mamaria de ratones SP-/-. B- Curva de sobrevida.*P<0.05. Se muestra un ensayo representativo de las 3 réplicas biológicas realizadas, con un n = 4 animales por grupo experimental

A fin de confirmar este resultado, medimos los niveles de SPARC en los tumores por Western blot a los 20 días post inyección del tumor. Como se puede ver en la Figura 35, los niveles de SPARC en el tumor IBH-6 L.51 son menores que los presentes en los tumores IBH-6 SCR.

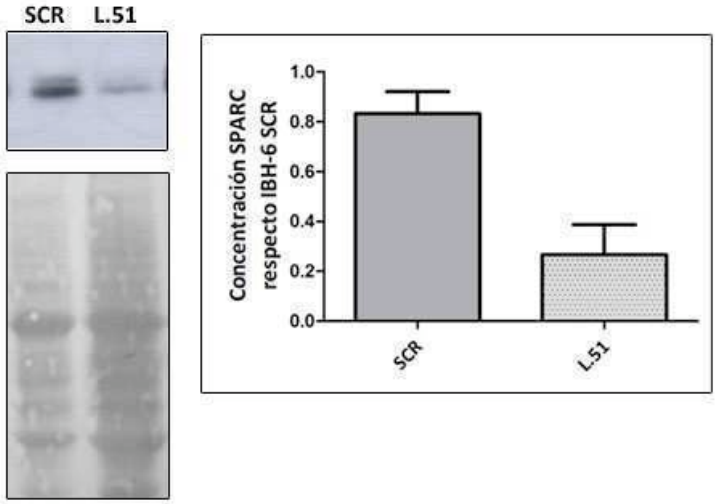



**Figura 35La línea IBH-6 L.51 sigue expresando bajos niveles de SPARC in vivo.** Western blot contra SPARC de 3 tumores de 120 horas de cada una de las líneas inoculadas en la glándula mamaria de ratones Nu/Nu SP-/-. Los valores numéricos mostrados corresponeden a la intensidad de la señal corregida por la carga

El análisis histológico reveló una fuerte necrosis inicial de aproximadamente el 90% en los tumores de las células IBH-6 L51 a las 48 horas post inyección de las células mientras que en los tumores de las células IBH-6 SCR la necrosis inicial fue de aproximadamente el 60% (Figura 36 A y B). Probablemente, esta fuerte respuesta antitumoral que genera una necrosis inicial tan importante en los tumores IBH-6 L.51, se deba al reclutamiento y activación de neutrófilos, ya que encontramos que el número de neutrófilos reclutados por los tumores IBH-6 L51 es de aproximadamente el doble al encontrado en los tumores IBH-6 SCR tanto a las 48 como a las 120 horas (Figura 36 G). Asimismo, y a diferencia de lo que ocurre en los tumores IBH-6 SCR donde los neutrófilos reclutados permanecen en la periferia del tumor, en el tumor IBH-6 L.51, los neutrófilos se dispersan e infiltran más el parénquima tumoral (Figura 36 C y D) .

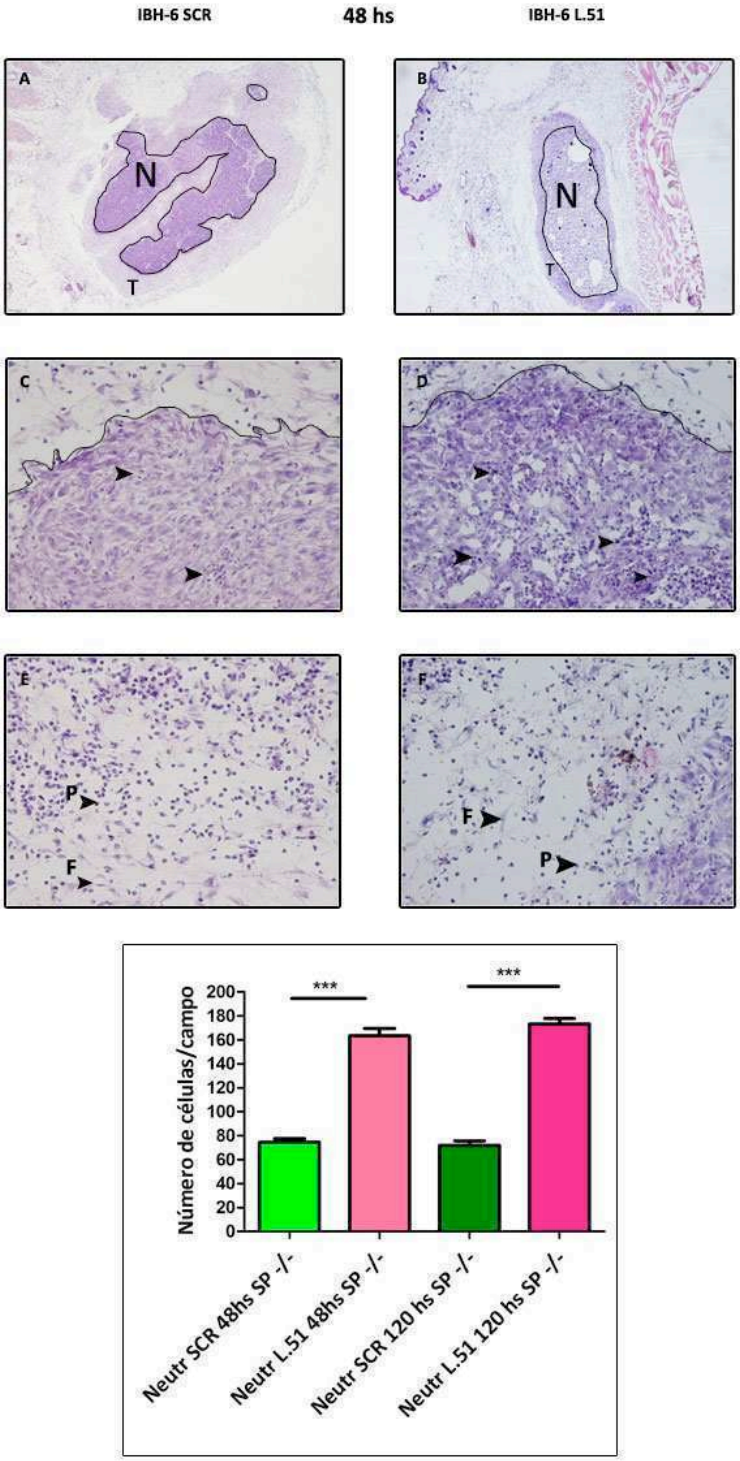



**Figura 36 Los tumores de la línea que expresa menores niveles de SPARC presentan una importante necrosis central y polimorfonucleares infiltrando el tumor.** Las letras N y T señalan las zonas de necrosis y tumor. Con flechas se señalan los polimorfonucleares infiltrando el tumor. A y B Imágenes tomadas a bajo aumento (5x) donde se señalan las áreas de necrosis. C y D Imágenes representativas del borde el tumor donde se observa que los polimorfonucleares infiltran más los tumores IBH-6 L.51 (D) que los tumores IBH-6 SCR (C) (20x). E y F, imágenes representativas de la periferia de ambos tumores, las letras F y P señalan fibroblastos y polimorfonucleares

periturmorales (40x) Cuantificación de polimorfonucleares a las 48 y 120 hs. post inyección del tumor. Se cuantificaron 4 campos de 3 tumores de cada tratamiento por tiempo analizado ***P<0.001.

A las 120 horas la diferencia en el grado de necrosis entre ambos tumores se mantiene, reforzando la idea de que el silenciamiento de SPARC en el epitelio combinada con la ausencia de SPARC en el estroma permite la generación de una fuerte respuesta anti tumoral (No mostrado).

La evaluación de colágeno solo mostró diferencias significativas a las 48 horas post inyección, donde se observa un mayor porcentaje de área marcada en los tumores de la línea IBH-6 SCR. (

Figura 37). Si comparamos estos datos, con los datos de intensidad de colágeno en los tumores inoculados en ratones SP+/+, podemos ver que la intensidad de colágeno, medida en unidades arbitrarias, es mucho mayor en los tumores generados en los ratones SP+/+ respecto de los ratones SP-/-, lo que nos llevan a proponer que SPARC del estroma es la principal fuente de deposición de colágeno.

En resumen, el estroma negativo para SPARC, combinado con la disminución de SPARC en el epitelio, genera un importante retraso en el crecimiento del tumor concomitantemente con un aumento en el número de neutrófilos reclutados. Este aumento de neutrófilos, que también se observó al bajar los niveles de SPARC sólo en el epitelio, parece ser activado diferencialmente en ausencia de SPARC del estroma contribuir a la disminución del tamaño tumoral. Esta última observación concuerda con lo reportado por nuestro grupo en modelos de melanoma (Leda, 1997; Alvarez, 2005; Prada, 2007), en donde describimos que la expresión de SPARC modula la activación de polimorfonucleares capaces de inhibir el crecimiento del tumor.

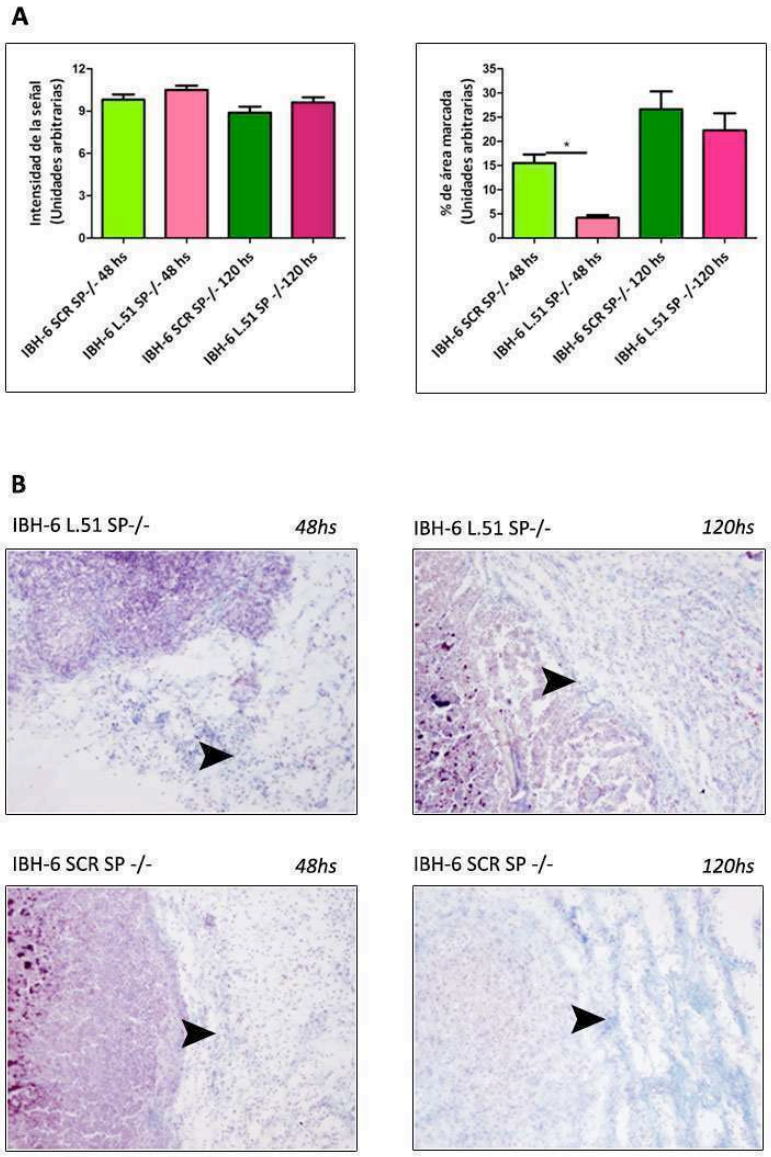



**Figura 37 Los tumores de la línea IBH-6 SCR y L51 similares áreas de colágeno a las 48 y 120 horas post inyección presentan.** A- Cuantificación de la intensidad del color azul indicativa de la maduración de las fibras de colágeno y del % del área de la foto positiva para colágeno. *P<0.05. B- Imágenes representativas de los campos cuantificados. Con flechas se señalan fibras de colágeno. Para la cuantificación se tomaron 4 imágenes de cada tumor, de tres tumores por tiempo por tratamiento. (20x).

En resumen, a lo largo de este capítulo, evaluamos el crecimiento de los tumores IBH-6 en presencia/ausencia de SPARC del estroma, modulando los niveles de SPARC del epitelio en presencia de SPARC del estroma, y modulando los niveles de SPARC en el epitelio en ausencia de SPARC del estroma. Los resultados obtenidos en cuanto a tamaño tumoral y características histopatológicas de los tumores se resumen en la Tabla 9.

| **Epitelio SP (+)**<br>**Estroma SP (-)** | **Epitelio SP (-)**<br>**Estroma SP (+)** | **Epitelio SP (-)**<br>**Estroma SP (-)** |
|---|---|---|
| No hay diferencias | Aumenta | Fuertemente inhibido |
| Aumenta | Aumenta (sólo a las 48hs) | Aumenta (y penetra en el parénquima tumoral) |
| Disminuye la intensidad y el % de área tanto a las 48 como a las 120hs | Disminuye la intensidad y el % de área sólo a 48hs | Disminuye la intensidad tanto a las 48 como a las 120hs, el % de área es mayor a las 48hs pero menor a las 120hs |
| | Pérdida de característica mesenquimales y de capacidad invasiva | |

**Tabla 9 Resumen de los resultados obtenidos respecto de las funciones de SPARC expresada por el epitelio y el estroma en el crecimiento tumoral. NOTA: el epitelio SP (-) no es completamente negativo para la expresión de SPARC. [1] las comparaciones se realizaron contra el modelo epitelio SP (+)/estroma SP (+)**

Como conclusiones generales, podemos decir que:

- En presencia de altos niveles de expresión de SPARC en el epitelio, SPARC del estroma modifica las características histopatológicas del tumor pero no afecta significativamente el crecimiento del tumor primario.
- La expresión de SPARC en el epitelio está asociada a características mesenquimales que favorecen la capacidad invasiva de las células tumorales.
- SPARC del estroma solo favorece el crecimiento del tumor en presencia de bajos niveles de expresión de SPARC en el epitelio.
- En todos los casos donde se redujo la expresión de SPRAC ya sea en el epitelio como en el estroma, aumentó el reclutamiento de neutrófilos y la matriz de colágeno resultó más laxa.
- La ausencia de SPARC en el estroma, combinada con bajos niveles de expresión de SPARC en el epitelio, inhibe fuertemente el crecimiento del tumor e induce un importante reclutamiento e infiltrado de los neutrófilos dentro del parénquima tumoral. Efecto que va acompañado por una matriz de colágeno más laxa.

En la próxima sección trataremos de corroborar algunas de estas observaciones en muestras de pacientes.

## *4-Efecto de la expresión de SPARC en la evolución y malignidad de tumores de mama humanos.*

Diversos trabajos intentan asignar un rol a SPARC en cáncer de mama utilizando diversas metodologías. Estudios basados en tinción inmunohistoquímica contra SPARC en muestras de pacientes, encuentran su expresión tanto en el epitelio como en el estroma tumoral. Algunos autores sugieren que la expresión de SPARC en el estroma sería un marcador de mal pronóstico en carcinomas mamarios, de pulmón, hígado y ovario, entre otros (Porter et al., 1995); Barth reportó que la expresión de SPARC y SMA sólo se detecta en fibroblastos de lesiones malignas, mientras que en la mama normal los fibroblastos son negativos para SPARC (Barth et al., 2005); más recientemente se correlacionó la expresión en el estroma con un menor tiempo de recurrencia en tumores ductales in situ (Witkiewicz et al., 2010). Sin embargo, se propone que la expresión de SPARC en el epitelio sería un marcador de buen pronóstico (Nagai et al., 2010), aunque otros autores proponen que la expresión de SPARC en células tumorales correlaciona con un fenotipo más invasivo y con una menor sobrevida (Watkins et al., 2005).

Estudios realizados con muestras de pacientes utilizando la tecnología de microarreglos de ADN, reportan que la expresión de SPARC en el estroma correlaciona con una mejor sobrevida (Beck et al., 2008), mientras que otros correlacionan la expresión de SPARC con una menor sobrevida libre de metástasis (Helleman et al., 2008), con la resistencia al tratamiento con tamoxifeno (Jansen et al., 2005) y como parte de la firma molecular de tumores metaplásicos altamente agresivos (Lien et al., 2007);(Sarrio et al., 2008).

Dado que en los experimentos realizados con el modelo IBH-6 encontramos que la expresión de SPARC (del epitelio y del estroma) favorece la invasividad de las células epiteliales y el crecimiento tumoral, decidimos confirmar estos datos utilizando muestras de pacientes. Para ello, cuantificamos la intensidad y localización de SPARC por inmunohistoquímica en carcinomas mamarios humanos de distinto tipo histológico: ductales y lobulillares, *in situ* e infiltrantes y analizamos su correlación con la presencia o no de metástasis axilares. Para esta

evaluación contamos con 96 carcinomas mamarios humanos. Las características histopatológicas de los tumores analizados se resumen en Tabla 10.

| Origen | Evolución | Nº casos evaluados |
|---|---|---|
| DUCTAL | In situ | 22 |
| | Infiltrante | 62 |
| LOBULILLAR | In situ | 2 |
| | infiltrante | 10 |

**Tabla 10. Resumen los tipos histológicos utilizados para evaluar la expresión de SPARC por Inmunohistoquímica.**

De los 96 casos analizados, 52 presentaban metástasis axilares. Para cuantificar la intensidad de la señal de SPARC tanto en el epitelio como en el estroma utilizamos un algoritmo implementado en el programa MatLab (ver detalles en materiales y métodos). A partir de la utilización de esta herramienta, pudimos asignar un valor numérico a la intensidad del color marrón obtenido en la marcación inmunohistoquímica para SPARC. La intensidad asignada a cada tumor fue el promedio de por lo menos 4 regiones, los valores de intensidad obtenidos variaron de 3 a 30.

Se correlacionó la presencia de metástasis axilares con: la intensidad en la expresión de SPARC, el tipo de tumor (ductal o lobulillar), su evolución (in situ o infiltrante), la expresión de SPARC por parte del estroma, la presencia de leucocitos, la localización de SPARC (nuclear o citoplasmática) y el porcentaje de área positiva para SPARC.

Encontramos que SPARC se expresa, en el epitelio del tumor en aproximadamente el 95% de los casos. Asimismo, también detectamos su expresión en los fibroblastos, endotelio e infiltrado inflamatorio en el 63 % de los casos. Sin embargo, ninguno de los casos donde la señal de SPARC fue positiva en el estroma, superó la intensidad de la señal que presentaba el epitelio. Aquellos tumores con ganglios axilares positivos presentaron una señal global (epitelio más estroma) para SPARC más intensa. Para analizar los datos, utilizamos un modelo de clasificación de árboles binarios de decisión (Quinlan, 1996). Esta herramienta no paramétrica de clasificación permite determinar cuáles son las variables que mejor explican la

población estudiada, en otras palabras, cuál de los parámetros evaluados explica mejor la presencia de metástasis axilares. El dato más relevante fue que una intensidad en la expresión global de SPARC (sin discriminar si es expresada por el epitelio o el estroma) mayor al valor 13,5 (unidades arbitrarias para la medición de la intensidad de la señal para SPARC) es la que mejor explica la presencia de metástasis axilares. De 43 casos con intensidad de SPARC mayor a 13,5, el 80% presentaron metástasis axilares (Figura 38). El resto de las variables analizadas sólo explican la población estudiada y no pueden ser considerados como factores predictivos. Para asignarle un valor pronóstico a los resultados obtenidos, resulta necesario aumentar el número de casos. Otros resultados relevantes, pero de menor poder clasificatorio, que se desprenden de este grafico son que, para intensidades de expresión de SPARC menores a 13,5 la presencia de infiltrado inflamatorio correlaciona con la presencia de metástasis axilares en el 100% de los casos (2/2). Asimismo, si la localización de la proteína es celular y el estroma es positivo, encontramos metástasis axilares en un 62,5% (5/8) de los casos, y si el estroma es negativo, sólo encontramos metástasis axilares en el 17,6 % de los casos (3/17).Esta última observación sugiere que la expresión de SPARC por parte del tumor está correlacionada con la progresión de la enfermedad, pero que el nivel de SPARC estromal sólo sería relevante para la progresión si el epitelio muestra baja expresión de SPARC. En la Figura 39se muestran imágenes representativas de la expresión de SPARC por inmunohistoquímica en los distintos tipos tumorales analizados.

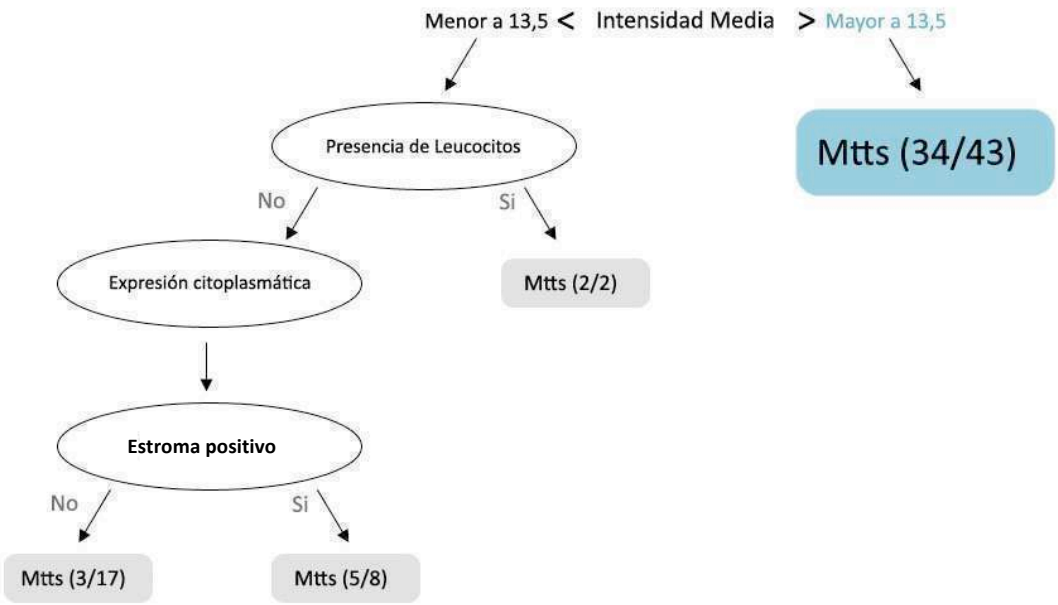



**Figura 38 La intensidad en la expresión de SPARC es la variable que mejor clasifica los datos como metástasis axilares positivas o negativas.** Árbol de decisión binario que clasifica los casos de tumores de mama analizados. La variable que mejor explica la aparición de metástasis en una intensidad promedio para SPARC mayor a 13,5, el 80% de los casos presenta metástasis axilares. La siguiente variable con poder clasificatorio que incluye los casos con señal de SPARC menor a 13,5, es la presencia de leucocitos, el 100% de los casos (2/2) que presentan leucocitos en el tumor también tienen metástasis axilares. Las últimas dos variables analizadas con poder clasificatorio para nuestra población fueron la localización celular de la señal y el estroma positivo: Si el estroma es positivo, encontramos metástasis en el 62,5% (5/8) de los casos, mientras que si es negativo, encontramos metástasis en el 17,6% de los casos (3/17).

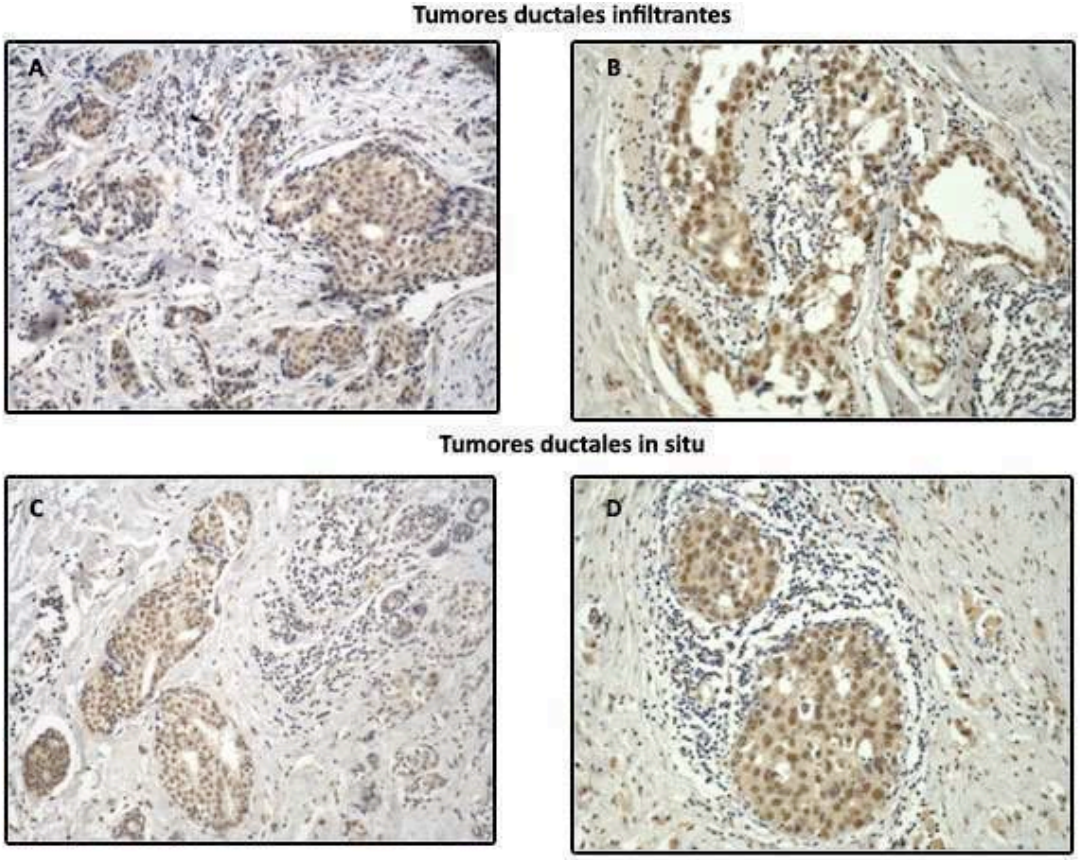



**Figura 39 La mayor intensidad en la expresión de SPARC se detecta en el epitelio tumoral.** A y B Tinción Inmunohistoquímica para SPARC en tumores ductales infiltrantes con estroma negativo (A) y levemente positivo (B). C y D Tinción Inmunohistoquímica para SPARC en tumores ductales in situ con estroma negativo (C) y levemente positivo (D). (20x)

Si bien estos datos no son concluyentes, nos llevan a pensar que la expresión de SPARC en el entorno tumoral puede ser un factor determinante para la capacidad invasiva de las células y la generación de metástasis. Esta hipótesis, será abordada en el próximo capítulo.

# Capítulo III Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento y la diseminación metastásica en un modelo murino de cáncer de mama en ratones inmunocompetentes.

La mortalidad del cáncer está asociada a la progresión metastásica de la enfermedad. Por ello, si bien es importante determinar los genes involucrados en el establecimiento del tumor primario, es sumamente importante determinar qué genes favorecen la progresión de la enfermedad y la evolución hacia un fenotipo invasivo capaz de metastatizar.

Los modelos animales son esenciales para el estudio de los mecanismos que dominan la cascada metastásica. Sin embargo, el campo de estudio de mecanismos metastásicos en cáncer de mama está dominado por el uso de modelos murinos que involucran la inyección de líneas de cáncer de mama humano, directamente en el sistema circulatorio de ratones inmunodeficientes. Si bien este tipo de ensayos son muy valiosos para estudiar las etapas finales de la colonización del órgano blanco, dejan de lado interacciones críticas entre la célula tumoral y el estroma tanto que permiten el escape de las células del tumor primario hacia los órganos blanco. Asimismo el hecho de utilizar ratones inmunodeficientes no permite analizar el aporte de la respuesta inmune adaptativa a la cascada metastásica.

Es por ello que en nos propusimos evaluar si el efecto protumoral de SPARC que demostramos en el capítulo anterior, está relacionado no solo con el crecimiento del tumor primario, sino que también con la generación de metástasis espontáneas in vivo. Para ello, utilizamos el modelo de cáncer de mama murino 4T1, representativo de un tumor de cáncer de mama estadio IV, muy similar en cuanto a su inmunogenicidad, capacidad proliferativa y metastásica (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001).

Cuando las células de la línea 4T1 se inyectan de manera ortotópica en la glándula mamaria, son capaces de entrar en circulación a los 7 post implantación, y generar metástasis en pulmón, hígado y hueso. (Aslakson and Miller, 1992)

## *Efecto de la modulación endógena de SPARC sobre el fenotipo maligno del cáncer de mama utilizando un modelo murino inmunocompetente.*

**La modulación de los niveles endógenos de SPARC inhibe fuertemente la proliferación, migración e invasión de las células 4T1 *in vitro*.**

Como ya demostramos en el capítulo 1, las células 4T1 expresan SPARC. Generamos una línea estable, 4T1 52-1, que expresa aproximadamente un 70% menos de esta proteína que el control, 4T1 SCR. Los primeros ensayos de este capítulo fueron orientados a la caracterización in vitro del comportamiento de las líneas celulares obtenidas.

En primer lugar, realizamos un ensayo de proliferación evaluado mediante la técnica de MTS/PMS, a fin de comparar la capacidad de crecimiento de la línea 4T1 SCR, con la nueva línea, 4T1 52-1.

Para los ensayos de proliferación sembramos iguales cantidades de células de las líneas 4T1 SCR y 52-1 en placas de 96 pocillos, donde se evaluó el número de células presentes cada 24 horas mediante la técnica de MTS.

Como se puede observar en laFigura 40, y a diferencia de lo observado en condiciones similares en células las IBH-6, la capacidad proliferativa in vitro de la línea 4T1 52-1 se vio significativamente inhibida a partir de las 48 horas posteriores al plaqueo. Estas diferencias se acentuaron a lo largo del tiempo hasta las 120 horas, tiempo en el cual se alcanza la confluencia del cultivo. Estos resultados coinciden con datos recientemente publicados que asocian al silenciamiento de SPARC con un arresto en el ciclo celular en células de melanoma que expresan SPARC (Fenouille, 2010; Horie, 2010).

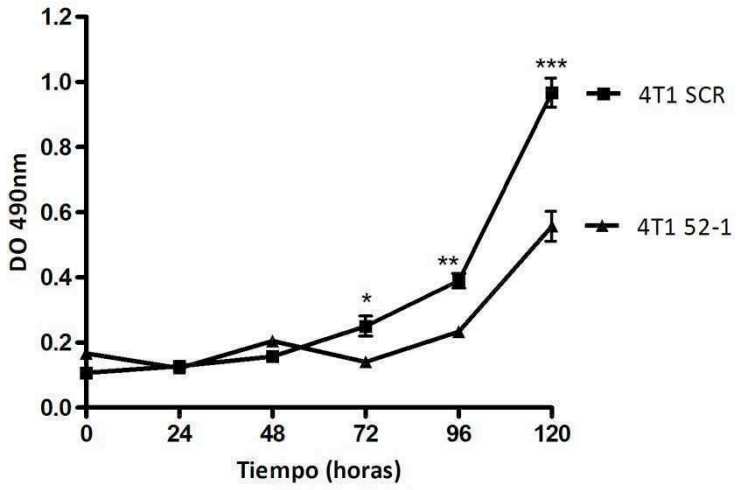



**Figura 40 El silenciamiento parcial de SPARC genera un importante retraso en la velocidad de proliferación.** Ensayo de proliferación evaluado mediante MTS que compara la velocidad de crecimiento de la línea 4T1 SCR versus la línea 4T1 52-1. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Luego evaluamos el efecto que posee el silenciamiento forzado de SPARC sobre la motilidad in vitro, utilizando el sistema de migración a través una membrana porosa cubierta de fibronectina en cámaras de Boyden. Observamos que, al igual que en caso de las células IBH-6, la disminución forzada de SPARC en la línea 4T1 inhibió aproximadamente en un 50% la capacidad migratoria de las células, cuando se utilizó como quimioatractante 10% de suero fetal bovino y casi un 70% cuando se utilizó como quimioatractante 2,5% de suero fetal bovino.. Por el contrario, no observamos disminución alguna en la capacidad migratoria de la línea 4T1 SCRestimulada por 10 o 2,5% de suero fetal bovino, dato que refleja la alta motilidad que presenta esta línea.

Asimismo, cuando evaluamos la capacidad invasiva tanto en ensayos de cámaras de Boyden utilizando membranas recubiertas con Matrigel, como en esferas de Matrigel, observamos una importante pérdida de la capacidad invasiva de la línea 4T1 52-1. En el ensayo en cámaras de Boyden, la inhibición de la capacidad, invasiva en comparación con la línea 4T1 SCR, fue de aproximadamente el 50%, cuando se utilizó tanto 10% como 2,5% de suero fetal bovino como Figura 41 B). El ensayo de invasión en esferas de Matrigel muestra que la reducción en los niveles de expresión de SPARC en la línea 4T1 52-1, provoca no solo una importante inhibición de la capacidad de degradar la membrana basal (Matrigel) de aproximadamente el 70% con respecto a la línea control, sino que también genera una reducción importante de la distancia

que pueden recorrer las células a medida que avanzan hacia el interior de la esfera (Figura 42).

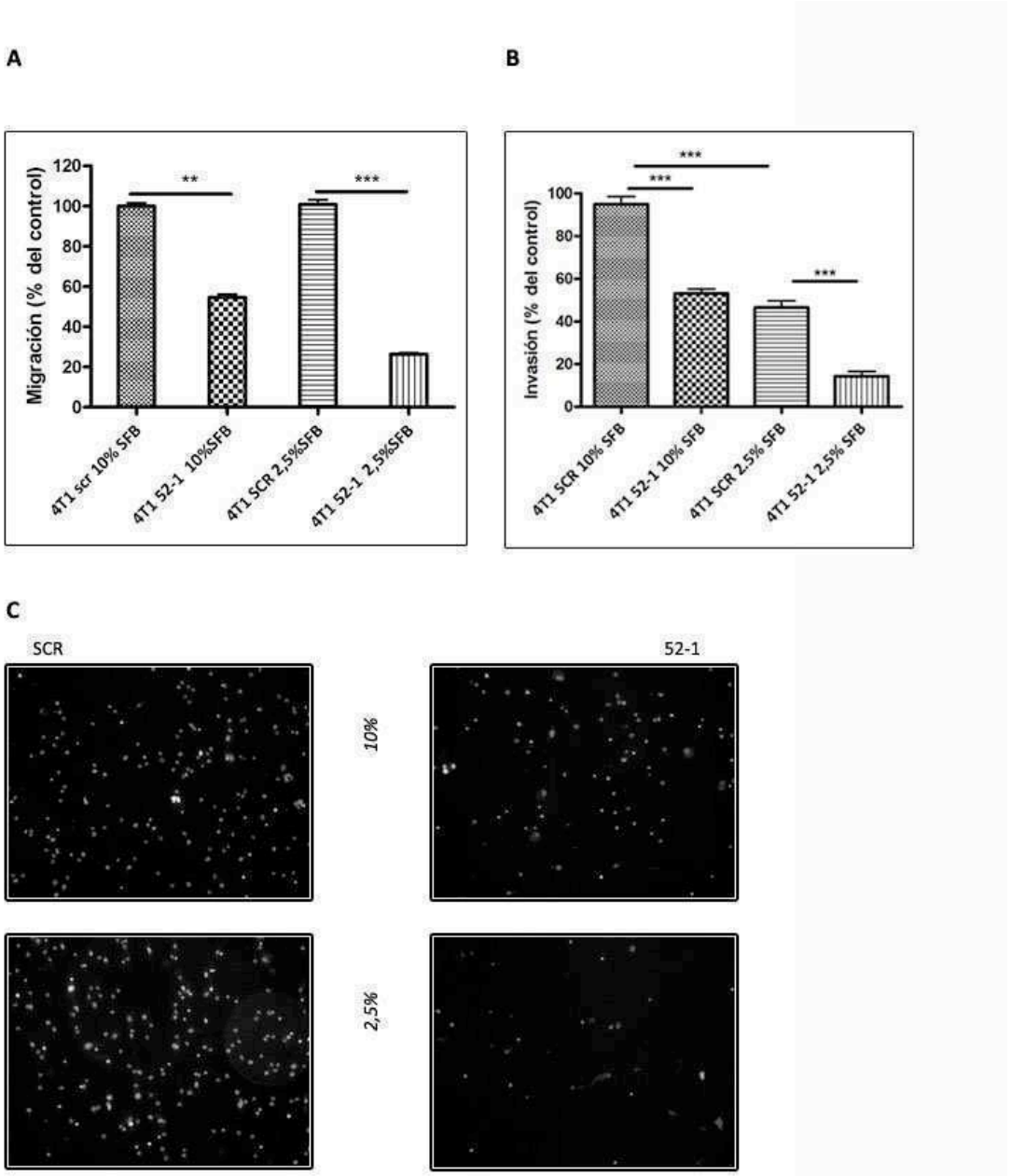
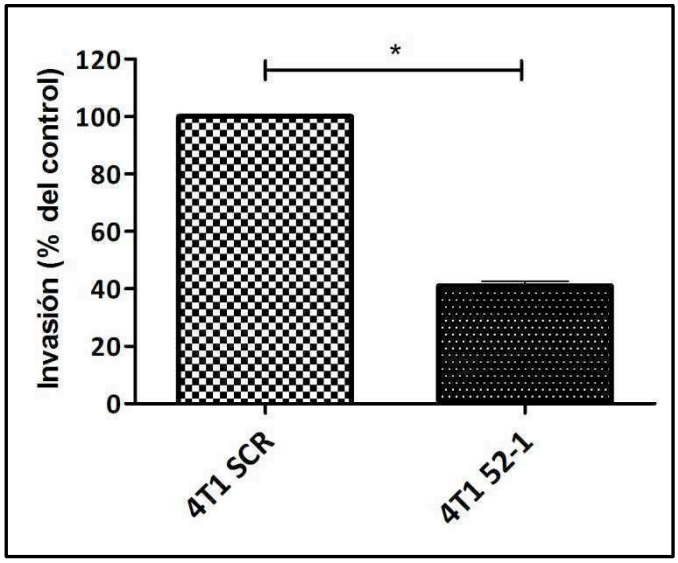



**Figura 41 El silenciamiento de SPARC inhibe la capacidad migratoria e invasiva de las células 4T1.** A- Cuantificación del ensayo de migración a través de una membrana porosa cubierta de fibronectina en cámaras de Boyden en respuesta a distintas concentraciones de suero fetal bovino. B-Cuantificación del ensayo de invasión a través de Matrigel en cámaras de Boyden en respuesta a distintas concentraciones de suero. C-Imágenes representativas del ensayo de migración. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.



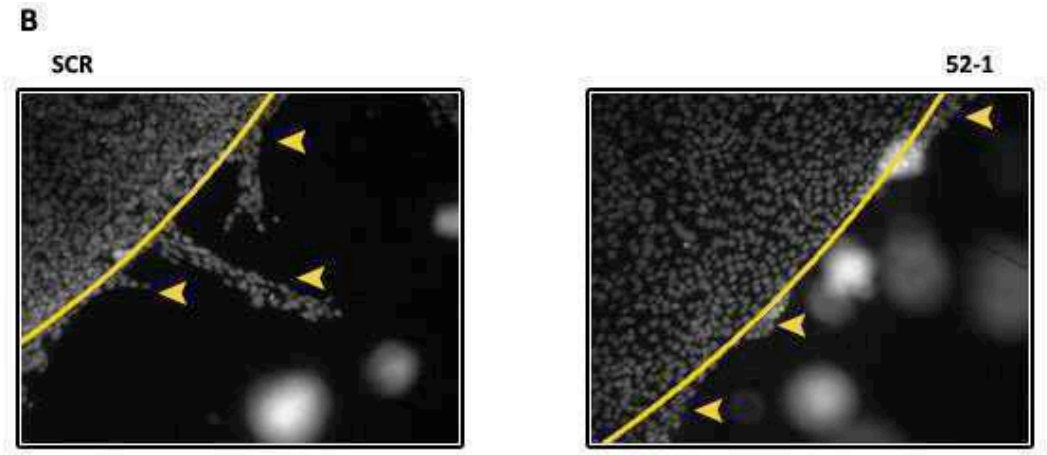




**Figura 42 El silenciamiento parcial de SPARC inhibe la capacidad invasiva in vitro de la línea 4T1. A-**Cuantificación de la capacidad invasiva de las líneas con distintos niveles de SPARC, en un ensayo de invasión en esferas de matrigel. B Imágenes representativa de la cuantificación.*P<0.05. 20x

Las evidencias mostradas hasta el momento en relación a la función de SPARC como facilitadora de la migración e invasión *in vitro*, tanto de las células IBH-6 como de las 4T1, nos lleva a proponer que la reducción de SPARC en el epitelio tumoral puede tener un importante efecto inhibitorio de la capacidad metastásica *in vivo*. Para poner a prueba esta hipótesis, evaluamos el efecto que posee el silenciamiento forzado de SPARC tanto en el crecimiento del tumor primario como en la capacidad metastásica en el modelo 4T1.

**La modulación de los niveles endógenos de SPARC inhibe la proliferación, migración e invasión de las células 4T1 *in vivo*.**

Ante todo es importante remarcar que como se mencionó anteriormente, a diferencia de lo ensayado para las líneas celulares humanas IBH, los experimentos *in vivo* con el modelo 4T1 se realizaron en ratones inmunocompetentes BALB/c. Esto nos permitió evaluar el efecto de SPARC en una situación experimental más cercana a la clínica, dado que tiene en cuenta la influencia del sistema inmune adaptativo, de conocida relevancia en el establecimiento y control del crecimiento de tumores.

Para los experimentos de crecimiento tumoral, inyectamos células de las líneas 4T1 SCR ó 4T1 52-1 en la glándula mamaria de hembras de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad, y evaluamos el volumen del tumor generado ortotópicamente. Si bien los tumores no llegaron al tamaño de sacrificio, que según las normas del CICUAL debe estar entre los 2000 y 2500 $mm^3$, los animales tuvieron que ser sacrificados a los 30 días post inyección de las células porque presentaban signos de deterioro en su capacidad respiratoria.

Como se observa en la Figura 43 A, al igual que como ocurría in vitro, la reducción de los niveles de SPARC produjo a una disminución de la velocidad de proliferación *in vivo.* Las diferencias en el tamaño de los tumores comenzaron a hacerse evidentes desde el día 7 post inyección y se mantuvieron hasta el final del experimento, momento en el cual el tamaño promedio de los tumores generados por la línea 4T1 52-1 era de 900$mm^3$, mientras que el tamaño promedio alcanzado por los tumores generados por la línea control fue de 1500 $mm^3$. En este punto también se evaluó la aparición de metástasis pulmonares a partir de extirpación de los lóbulos pulmonares. Al momento del sacrificio encontramos que el promedio en el número de metástasis superficiales pulmonares espontáneas generadas por la línea 4T1 52-1, era de aproximadamente 50 metástasis por pulmón, mientras que el número de metástasis generadas por la línea control fue de aproximadamente el doble (Figura 31B). Asimismo, el tamaño promedio de los focos metastásicos generados por la línea 4T1 52-1 fue menor que el observado para los focos metastásicos generados por la línea 4T1 SCR (no mostrado).

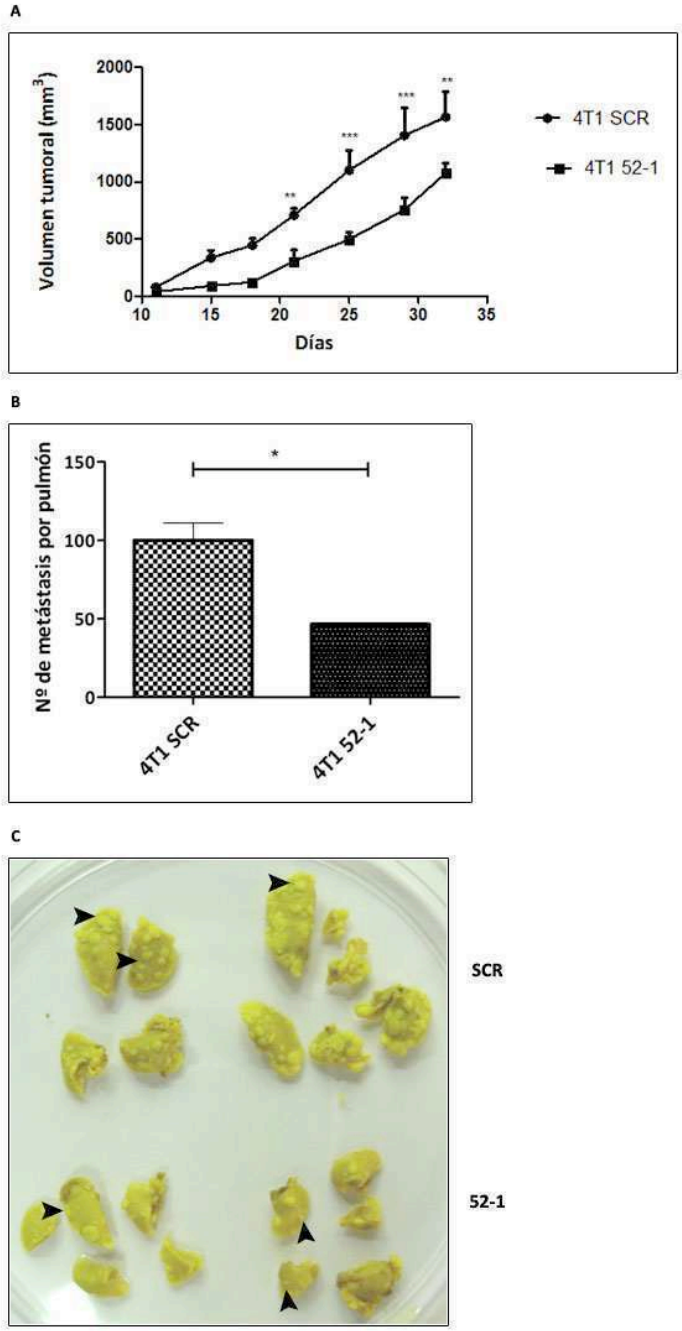



**Figura 43 El silenciamiento de SPARC genera una disminución de la velocidad de crecimiento de los tumores experimentales en la glándula mamaria y una notable reducción del número de metástasis.** A- Evaluación de la velocidad de crecimiento in vivo de las líneas que expresan altos y bajos niveles de SPARC (SCR y 52-1 respectivamente). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. B- Evaluación de la capacidad de generar metástasis espontáneas de las líneas que expresan altos y bajos niveles de SPARC. *P<0.05. C- Imagen representativa de las metástasis observadas en los pulmones teñidos con Bouin, de ambos grupos experimentales. Las flechas señalan focos de metástasis.

Estos datos son de suma relevancia dado que no se ha reportado hasta el momento, que en un mismo modelo, el silenciamiento de SPARC generara un cambio de fenotipo tan drástico, inhibiendo tanto la capacidad proliferativa como metastásica de las células tumorales.

Si bien la reducción en el número de metástasis pulmonares fue mayor al 50%, nos preguntamos si podríamos inhibir completamente la capacidad metastásica de esta línea *in vivo* a partir de una disminución aún mayor de la expresión de SPARC.

La generación de la línea 4T1 52-1 se realizó mediante la transducción de la línea 4T1 con un lentivirus, y posterior selección de las células transducidas utilizando el antibiótico G418. Esta metodología, genera una población heterogénea, donde el nivel de SPARC en todas las células no es necesariamente el mismo, ya que el lentivirus se inserta en el genoma al azar. Fue por ello, que nos preguntamos si las metástasis generadas en la línea 52-1, no podían ser producto de células en las que el vector lentiviral no estuviera silenciando de manera eficiente la expresión de SPARC.

Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis, decidimos obtener poblaciones con niveles homogéneamente bajos de SPARC. Para ello realizamos un clonado por dilución límite. Obtuvimos alrededor de 20 clones, de los cuales seleccionamos tres (clon 1, 5 y 18) con niveles homogéneamente bajos de SPARC en todas sus células.

En la Figura 5 se muestran los niveles de expresión tanto del mensajero de SPARC (Figura 44 A), como de la proteína (Figura 44B). Como puede observarse, el análisis del grado de silenciamiento de la proteína por Western blot mostró que los clones 1, 5 y 18 secretaban al medio extracelular, un 50, 60 y 87% menos de SPARC, respectivamente, que la línea control 4T1 SCR (Figura 44 B).

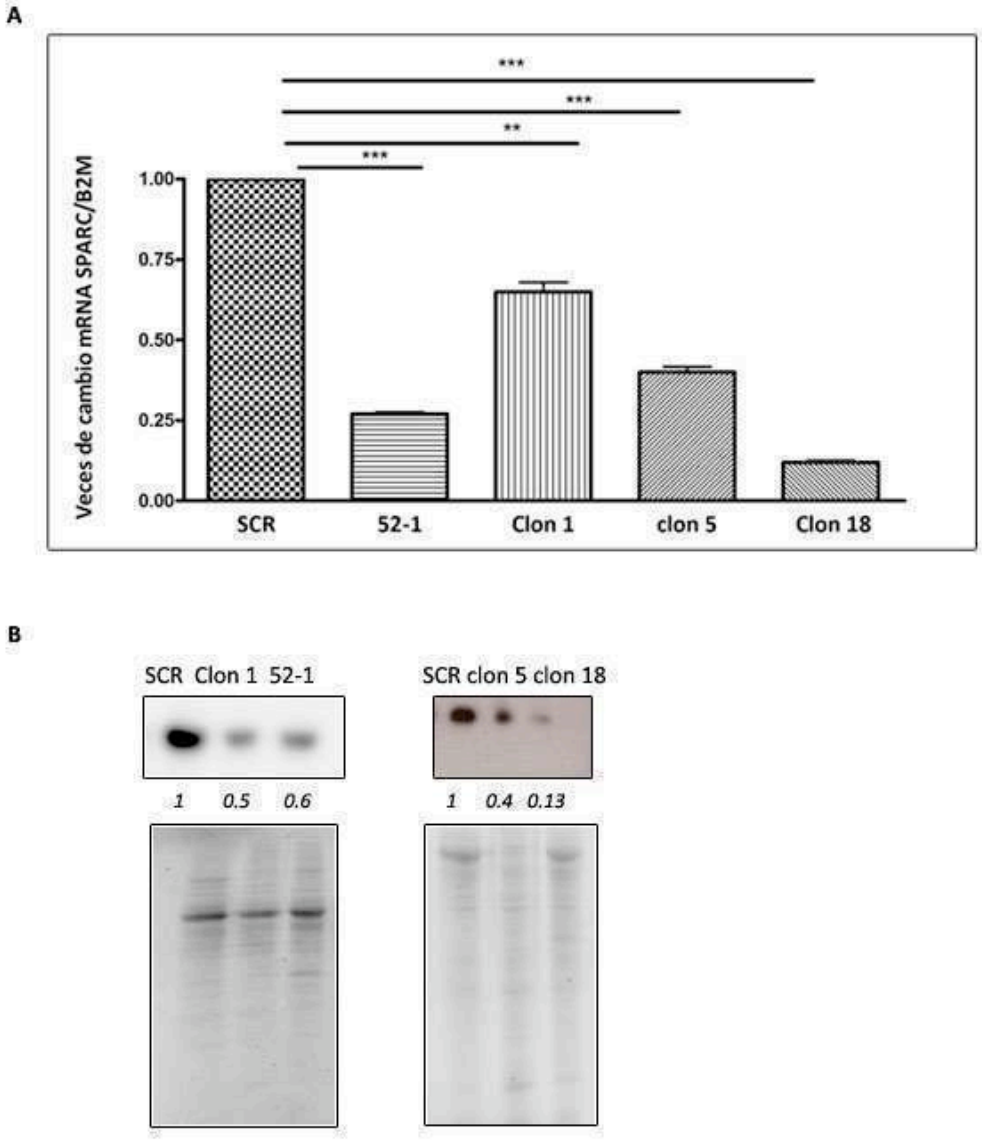
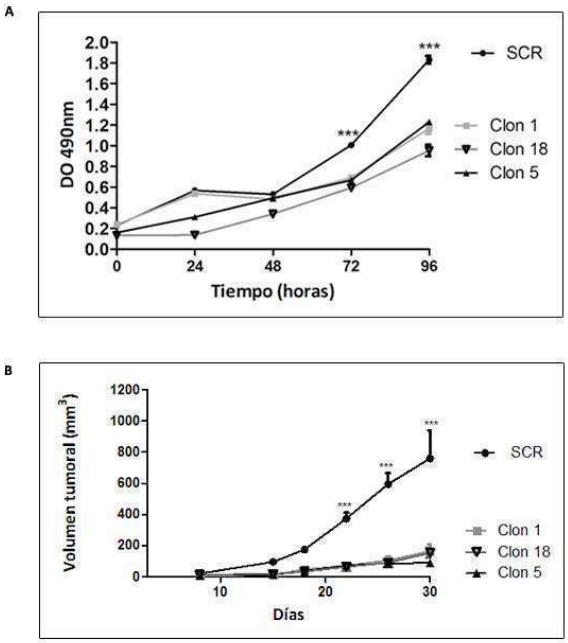



**Figura 44 Los clones de la línea 52-1 alcanzan más de un 60% de silenciamiento de SPARC en todas sus células.** A- PCR en tiempo real para evaluar los niveles del mensajero de SPARC en las líneas 4T1 SCR, 52.1 y los clones derivados de la línea 52-1, clon 1, 5 y 18. **P<0.01, ***P<0.001 B- Western blot contra SPARC en los medios condicionados de las líneas mencionadas en A-. Los números debajo de la imagen del western blot corresponden a la cuantificación de la señal de SPARC relativa al control 4T1 SCR y corregida por la cantidad de proteína total sembrada en cada calle.

**La pérdida de la capacidad de proliferación e invasión asociada a SPARC tanto *in vitro* como *in vivo*, se acentúa en clones generados a partir de la línea 4T1 52-1.**

Comenzamos caracterizando el comportamiento proliferativo de los clones 1, 5 y 18, *in vitro* e *in vivo,* a fin de determinar si las características observadas para la línea parental, 4T1 52-1 se seguían conservando. Como se puede observar en la figura 45 A, la capacidad proliferativa *in vitro* de los clones es menor que la que posee la línea control, lo que sugiere un efecto de SPARC sobre el ciclo celular. En concordancia con este resultado, se observó una inhibición en

**Figura 45**45 B). De hecho, el tamaño alcanzado por los tumores generados con los clones al momento del sacrificio, menos de 200mm$^3$, es aún menor que el alcanzado por la línea parental 4T1 52-1 (900mm$^3$) (Figura 43). La coincidencia entre la evidencia *in vitro* e *in vivo* sugiere que la disminución del crecimiento *in vivo* se debería a cambios en las propiedades proliferativas intrínsecas de las células epiteliales del tumor.



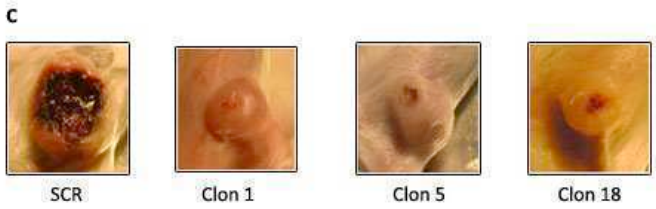



**Figura 45 El silenciamiento de SPARC en los clones también genera un importante retraso en la velocidad de proliferación *in vitro* y el crecimiento *in vivo***. A-Ensayo de proliferación in vitro utilizando la técnica de MTS, comparando la línea control 4T1 SCR versus los clones de la línea 52-1: clon1, 5 y 18. *P<0.05, ***P<0.001. B-Cinética de crecimiento *in vivo* de los clones con SPARC parcialmente silenciado versus la línea control, 4T1 SCR. **P<0.01, ***P<0.001. C- Imágenes representativas de los tumores de los tumores graficados en B. Modificar la figura y sacar el primer SPCR. Dejar el SCR a la izquierda y los tres clones a la derecha.

Asimismo, como se muestra en la Figura 45 C, los tumores control, no sólo presentan un tamaño mayor, sino que además se observa una importante necrosis periférica, probablemente consecuencia de su rápida proliferación. A fin de confirmar que *in vivo*, el menor tamaño observado en los tumores generados por las células que expresan menores niveles de SPARC, se debe a una diferencia en la capacidad de proliferación de las células, realizamos una marcación para Ki-67 en tumores 4T1 SCR y Clon 18. Como se muestra en la Figura 46, el menor tamaño observado*in vivo* en los clones con SPARC silenciado, puede atribuirse a una menor tasa de proliferación en relación a la línea control. Estas diferencias en el número de células proliferando fueron observadas a distintos tiempos post inyección; se seleccionó el tiempo de 120 horas porque el infiltrado inflamatorio inicial había sido resuelto y las diferencias entre ambos tipos tumorales eran más notorias.

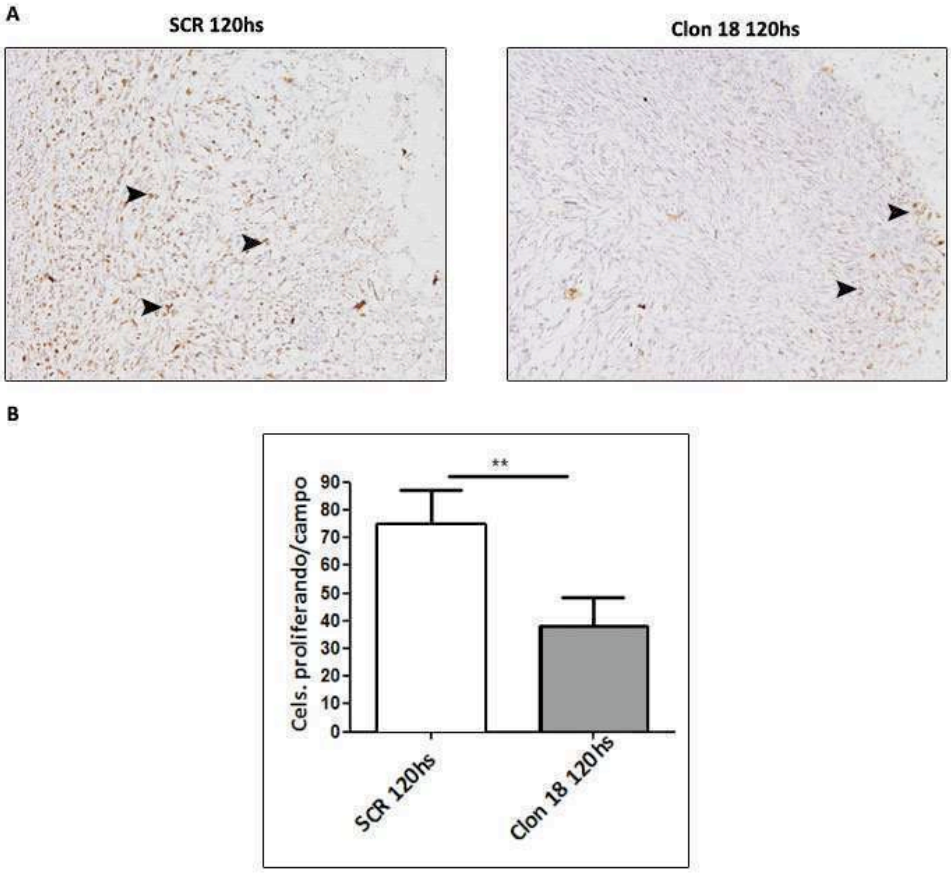



**Figura 46 Los tumores generados a partir de células con menores niveles de SPARC proliferan menos que los tumores control *in vivo***. A- Imágenes representativas de la marcación de Ki-67 en los tumores 4T1 SCR y Clon 18 120 horas post inyección del tumor; se señalan células Ki-67 positivas. (20x). B- Cuantificación del número de células ki-67 positivas. Para realizar la cuantificación se tomaron por lo menos 3 fotos de 3 tumores de cada uno de los tratamientos analizados. **p<0.01.

Cuando evaluamos la capacidad invasiva de los clones tanto *in vitro* como *in vivo*, encontramos, como era esperable, que la reducción forzada en los niveles de expresión de SPARC genera una pérdida de la capacidad invasiva *in vitro* de entre un 50 y un 60% con respecto a la línea control. (Figura 47 A y B).Más aún, la evaluación de la capacidad metastásica *in vivo*hacia el pulmón, demostró que ninguno de los tres clones obtenidos fuecapaz de generar metástasis pulmonares periféricas (Figura 47C). Asimismo, el análisis histopatológico confirmó que los pulmones de todos los animales inyectados con los clones estaban libres de metástasis (dato no mostrado).

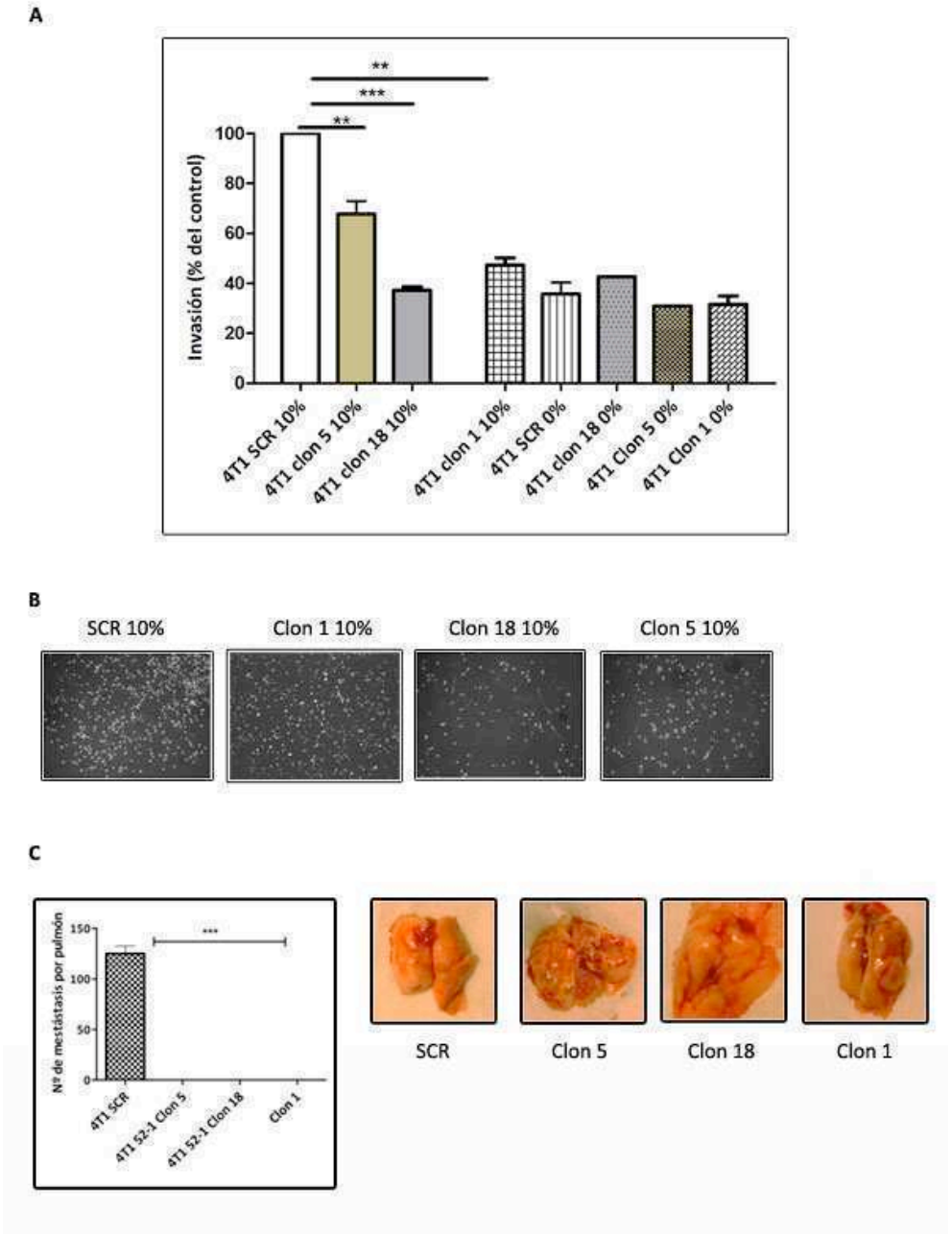



**Figura 47 El silenciamiento de SPARC, en los clones 1, 5 y 18, inhibe la capacidad invasiva in vitro e impide la generación de metástasis in vivo.** A- Evaluación de la capacidad invasiva en cámara de Boyden de la línea que expresa elevados niveles de SPARC, 4T1 SCR versus los clones que expresan bajos niveles de SPARC.**P<0.01, ***P<0.001. B- Imágenes representativas de la invasión. B- Cuantificación de las metástasis pulmonares espontáneas, a la derecha se muestran los pulmones donde se señalan con flechas los focos de metástasis.

Dado que los tumores primarios presentaban una importante reducción de su capacidad de crecimiento, nos preguntamos si la ausencia de metástasis observada *in vivo* podía deberse a que los tumores primarios generados a partir de los clones 1, 5 y 18 eran de menor tamaño, y como consecuencia de ello, la probabilidad de que las células escapen del mismo y entren en circulación es menor. Por ello inoculamos las células de las líneas 4T1 SCR, 52-1 y clon 1, en la glándula mamaria de hembras de la cepa BALB/c, dejamos que los tumores se desarrollaran, y sacrificamos las dos primeras a los 30 días y dejamos que los tumores del clon 1 llegaran al tamaño que tenían los tumores 4T1 SCR al momento del sacrificio.

Como se observa en laFigura 48, si bien los tumores del clon 1 llegaron al tamaño de sacrificio de los otros dos tratamientos 15 días después, no se observaron metástasis pulmonares en ninguno de los animales, confirmando que la ausencia de metástasis en los animales inyectados con los clones se debe a un efecto de SPARC específico sobre la capacidad metastásica, independiente del retardo del crecimiento tumoral. En otras palabras, el efecto de SPARC sobre la proliferación y la diseminación metastásica ocurre,presumiblemente, a través de mecanismos independientes.

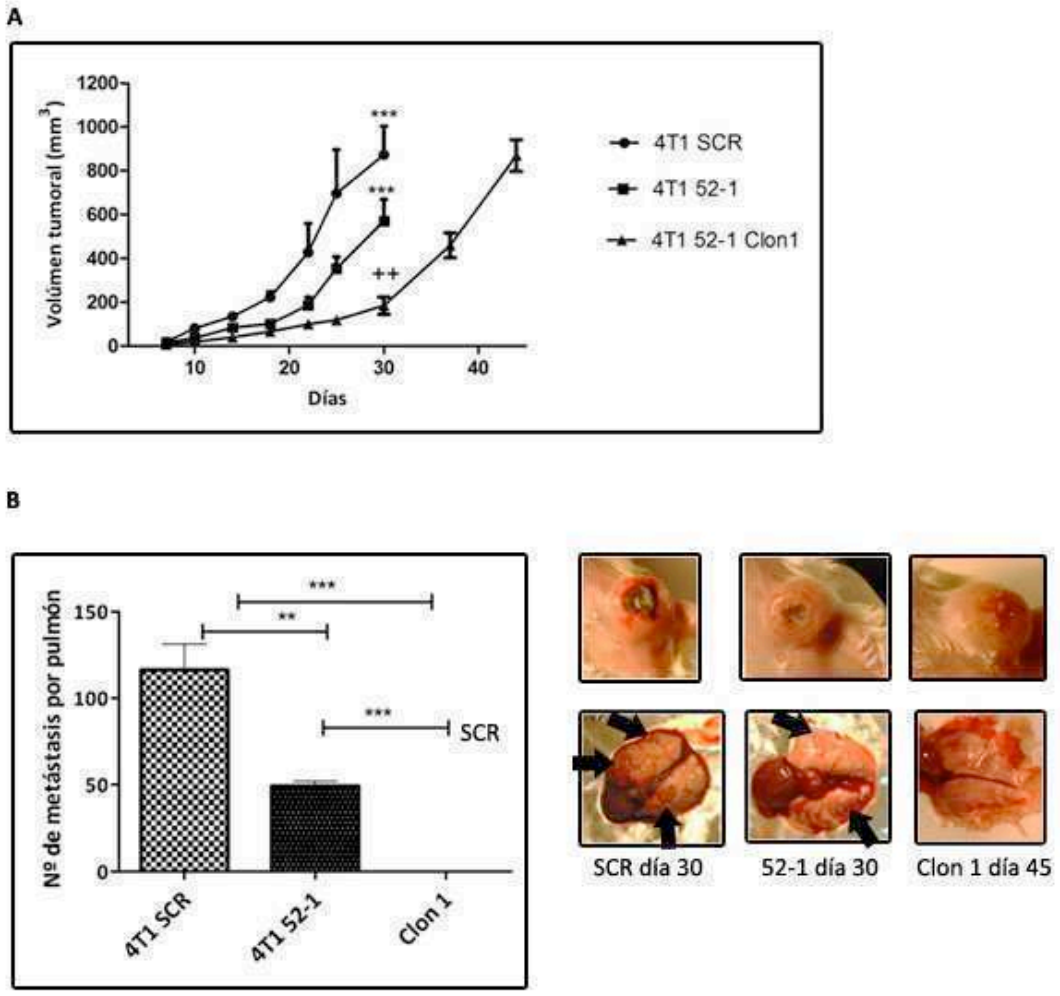



**Figura 48 La ausencia de metástasis observada en los animales inyectados con el clon 1, de baja producción de SPARC, no depende del tamaño del tumor primario.** A- Cinética de crecimiento in vivo de las líneas 4T1 SCR, 4T1 52-1 y 4T1 clon 1. **P<0.01, ***P<0.001. B- Cuantificación de las metástasis pulmonares observadas en los tres grupos experimentales. A la derecha se muestras imágenes representativas de los tumores y pulmones de cada grupo a tiempo de sacrificio.

Con el fin de comprobar si los cambios fenotípicos observados en clones 1, 5 y 18, se deben a los cambios en los niveles de expresión de SPARC, es importante confirmar que la expresión de SPARC en los tumores generados por los clones sea menor que la expresión de SPARC en los tumores control. Para ello evaluamos la expresión de SPARC a los 20 días postinyección del tumor, momento en que el mismo estaba completamente establecido y creciendo de manera exponencial. Como se observa en la Figura 49, a los 20 días postinyección, los niveles de mensajero y de proteína SPARC, en los tumores generados por el clon 1 siguen siendo entre un 50 y un 60% menor que los niveles observados en la línea control.

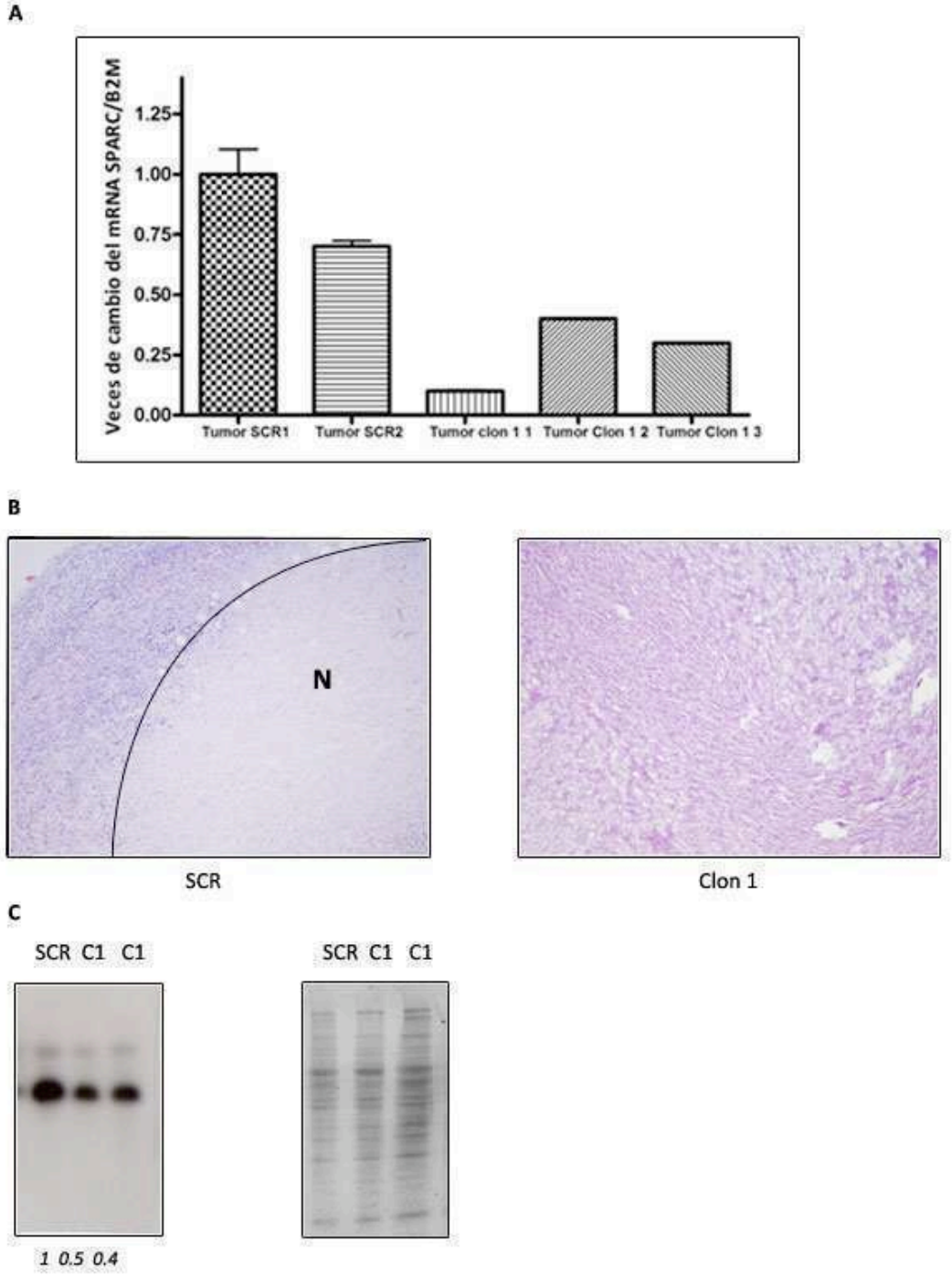



**Figura 49 Los tumores generados a partir del crecimiento de los clones in vivo siguen presentando menores niveles de SPARC.** A- PCR en tiempo real para evaluar los niveles de expresión de SPARC en los tumores 4T1 SCR y 4T1 52-1 clon 1, se muestran en el gráfico los niveles de expresión del mensajero de SPARC en 3 tumores del Clon1. B- Tinciones de Hematoxilina Eosina que muestran el elevado porcentaje de necrosis observado en los tumores de la línea control 20x. C- Western blot para evaluar los niveles de SPARC en el tumor. Los números debajo de la imagen del western blot corresponden a la cuantificación de la señal de SPARC relativa al control 4T1 SCR y corregida por la cantidad de proteína total sembrada en cada calle. En la parte inferior de los western blot, se

cuantificó la señal de SPARC relativa el control 4T1 SCR en función de la cantidad de proteína total sembrada en cada calle.

Hace algunos años, Minn*et al* (2005) reportaron, utilizando un modelo de cáncer de mama humano, que SPARC se encontraba entre los genes cuyo aumento de la expresión era necesario para permitir la colonización del pulmón y el desarrollo de metástasis. Sin embargo, no encontraron evidencias de que SPARC tuviese un efecto en el crecimiento del tumor primario. A partir de estos datos, nos preguntamos si en este modelo, la ausencia de metástasis en los clones con SPARC disminuido podría deberse en parte, a que las células tumorales perdían esta capacidad de colonizar el pulmón y proliferar.

Decidimos poner a prueba esta hipótesis utilizando la técnica de metástasis experimentales, que permite evaluar directamente la capacidad que tienen las células de colonizar el pulmón, evitando los pasos iniciales de la cascada metastásica que involucran la salida de las células del tumor primario a partir de la degradación de la membrana basal y la intravasación.

Para ello, marcamos las células con el colorante supravital CMDiI (Invitrogen), y las inyectamos en la vena de la cola. Luego de 24 horas se verificó que las células hubieran llegado al pulmón. Para ello se anestesiaron los animales y se midió la señal fluorescente del CMDiI utilizando un bioluminómetro (Figura 50 A).

Una vez confirmada que las células entraron en circulación,a partir de la detección de la señal emitida por las células fuera del sitio de inyección, dejamos que crecieran las metástasis y sacrificamos los animales a los 20 días postinyección, momento en el cual observamos un importante deterioro en la capacidad respiratoria y estado general de los ratones inoculados con la línea SCR.

Como se observa en la Figura 50 B y C, sólo los pulmones de los ratones inoculados con la línea control presentaban un elevado número de metástasis periféricas macroscópicas; por otra parte, el análisis histopatológico mostró que los ratones inoculados con los clones 1 y 5 presentaban un número muy reducido de focos metastásicos (menos de 8 focos por pulmón por animal). Además, el tamaño de las metástasis fue significativamente menor que el de las observadas en el grupo control. Ninguno de los ratones inyectados con el clon 18 desarrolló metástasis pulmonares.

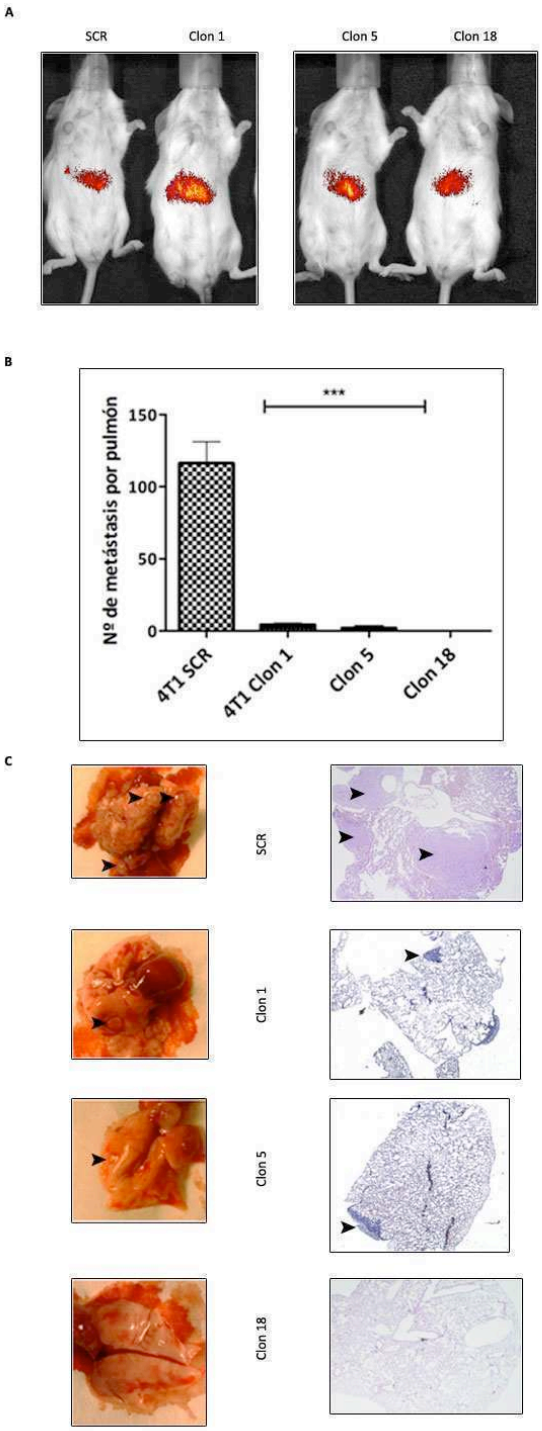



**Figura 50 El silenciamiento de SPARC inhibe la capacidad de colonizar el pulmón en experimentos de metástasis experimental.** A- Imagen tomada utilizando el bioluminómetro donde se muestra que las células tumorales se alojan en la cavidad torácica. B- Cuantificación de las metástasis observadas microscópicamente en los ratones inoculados con las líneas 4T1 SCR, 52-1, clones 1, 5 y 18. C- Imágenes representativas de los pulmones a nivel macroscópico, izquierda y microscópico (5x), derecha. Se utilizaron flechas para señalar los sitios de crecimiento de las metástasis.

De esta manera, concluimos que SPARC contribuye de manera importante a la agresividad tumoral. Por un lado regula la proliferación, la migración e invasión *in vitro*. Por otro, en el modelo*in vivo*, la expresión de SPARC por parte del epitelio tumoral, acelera la velocidad de proliferación del tumor y posee un rol central en la formación de metástasis. En este punto cabe preguntarnos: ¿A través de qué mediadores moleculares genera SPARC los efectos sobre el crecimiento y la diseminación tumoral?

En el próximo capítulo de esta tesis se describe una estrategia de genómica funcional que nos permitióabordar este interrogante.

# Capítulo IV Búsqueda de mediadores de la función biológica de SPARC en cáncer de mama, mediante la técnica de microarreglos de ADN.

En la actualidad se proponemás de una vía de acción de SPARC, aunque no existen evidencias detalladas sobre los mecanismos moleculares por los cuales SPARC afecta el crecimiento y la diseminación metastásica. Mediante experimentos de genómica funcional nos propusimos evaluar los cambios en la expresión de genes de la **célula epitelial** generados a partir de la modulación endógena de la expresión de SPARC, que pudieran afectar ya sea la proliferación, la migración o la invasión celular. Por otra parte, y dado que SPARC es una proteína no estructural, que participa de la interacción de la célula con la matriz extracelular, quisimos evaluar los cambios que se generan a nivel de la expresión de genes en el **tumor primario** a partir de la modulación de SPARC, que fueran capaces de alterar la interacción de la célula epitelial con el microambiente tumoral, e inhibir el fenotipo metastásico.

A partir de estos objetivos diseñamos dos tipos de experimentos de microarreglos: uno, comparando el perfil diferencial de genes entre la línea celular 4T1 SCR y el clon 18. Denominamos a este experimento **microarreglo *in vitro*.** El otro experimento comparó, por un lado, el perfil diferencial de genes entre los tumores generados a partir de la inyección de las células 4T1 SCR y clon 18 en la glándula mamaria de hembras de la cepa BALB/C, y por el otro, los genes expresados por las metástasis pulmonares generadas a partir de la inyección de la línea 4T1 SCR en la glándula mamaria, frente al tumor primario. Esta última comparación nos permitirá determinar qué genes modulados por SPARC son los que correlacionan con la generación de las metástasis, o dicho de otra forma, qué genes diferencialmente expresados entre los tumores generados por las líneas 4T1 SCR y clon 18, son relevantes para las metástasis pulmonares generadas por la inoculación de la línea 4T1 SCR en la glándula mamaria. Denominamos a este experimento, **microarreglo *in vivo***.

Para realizar estos experimentos, utilizamos la tecnología de microarreglos de ADN MEEBO de Microarrays Inc. El modelo de microarreglo utilizado contiene 38467 spots que corresponden a

25000 transcriptos de ratón aproximadamente. En la Tabla 11 se muestra la distribución de sondas presentes en el microarreglo.

| NUMBER OF PROBES | PROBE TYPE | PROBE FUNCTION |
|---|---|---|
| 30,125 | Constitutive Exonic | Recognize all known transcripts of a mouse gene |
| 4,201 | Alternatively Spliced / Skipped Exonic | Recognize exons present in some, but not all transcripts of a mouse gene |
| 196 | Non-coding RNA | Recognize mouse non-protein coding transcripts (rRNA, miRNAs) |
| 372 | BCR/ TCR Genic/ Regional | Recognize transcripts from mouse genes that undergo somatic rearrangement |
| 13 | Mitochondrial probes | Recognize mouse mitochondrion derived DNA sequences |
| 37 | Transgenic / Vector | Recognize elements commonly used for transgenic constructs (e.g. GFP, YFP). |
| 358 | Viral Probes | Recognize mouse viral pathogen sequences |
| 1,152 | Positive Controls | Recognize a small subset of mouse exons or transcripts |
| 414 | Negative Controls | 317 empty wells and 97 random sequences are positioned throughout the set to assist in determining background. |
| 1,916 | Spiking Controls | Recognize non-mouse sequences that can be spiked into RNA samples. |

**Tabla 11 Distribución de las sondas presentes en microarreglo de ADN.**La tabla contiene los datos relacionados al tipo y número de sondas presenten en el modelo de microarreglos MEEBO de la impresa Microarrays, Inc.

## *Experimento de microarreglo in vitro.*

Para esteensayo de microarreglos de dos colores obtuvimos ARN de 4 muestras biológicas independientes de las líneas 4T1 SCR y del clon 18, que fue el clon derivado de 4T1 52-1 que menores niveles de mensajero de SPARC presentaba y el que presentaba el efecto más drástico en la inhibición del fenotipo metastásico . Luego de haber confirmado la integridad del ARN, procedimos a la amplificación y marcación de mismo siguiendo los pasos del kit Superscript indirect RNA amplification system, Invitrogen.

Mediante el análisis de “clustering” o agrupamiento jerárquico no supervisado de los genes diferenciales, las líneas 4T1 SCR y Clon 18 fueron eficientemente discriminadas en función de las diferencias deexpresión de genes (Figura 51).

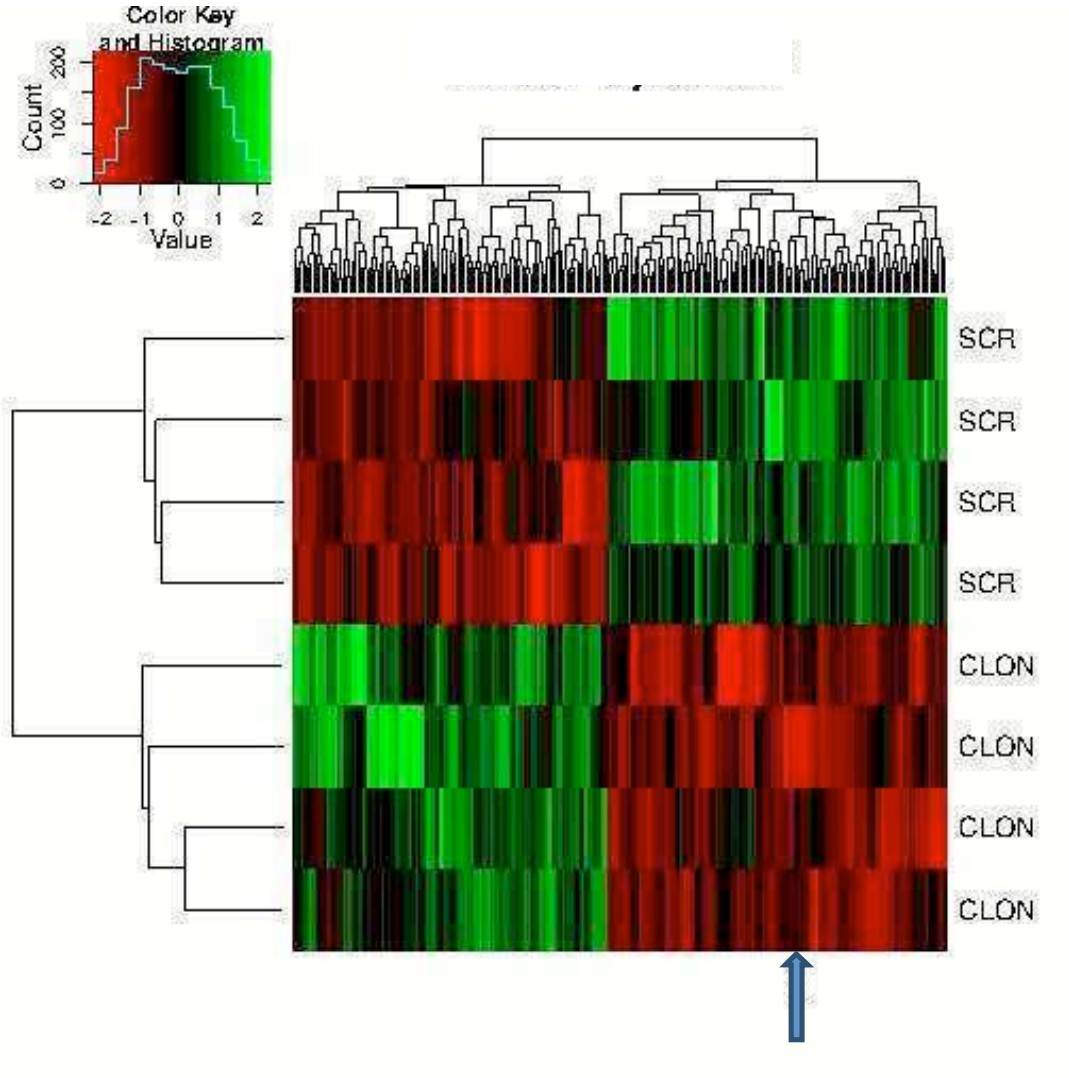



**Figura 51 Los genes diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y clon 18 definen a las dos condiciones experimentales ensayadas.**Mapa de color que muestra la agrupación por análisis jerárquico no supervisado de los genes con expresión diferencial identificados por la técnica de microarreglos de ADN. Las columnas representan los genes identificados como diferenciales y las filas representan cada uno de los microarreglos analizados. En la parte superior a la izquierda se indicada la clave de color de acuerdo a la relación de expresión de cada gen entre la línea clon 18 y 4T1 SCR. El color verde indica sobre-expresión del gen en la línea clon 18 (con expresión de SPARC disminuida), respecto a 4T1 SCR (que expresa SPARC) y el color rojo indica menor expresión del gen en la línea clon 18 respecto a 4T1 SCR. La flecha en la parte inferior señala la localización del gen SPARC.

Encontramos 351 genes diferencialmente expresados entre las dos líneas celulares analizadas, de las cuales **183** genes estaban subexpresados y **168** genes estaban sobreexpresados en el clon 18 respecto de la línea 4T1 SCR (ver lista completa en el anexo IV).

Con el objetivo de ahondar en el conocimiento de los procesos biológicos relacionados al silenciamiento forzado de SPARC en nuestro sistema, realizamos un análisis ontológico. El análisis ontológico permite conocer cuáles son los procesos biológicos y funciones moleculares (más específicamente, los términos ontológicos) que están definidos o modulados por los genes diferencialmente expresados entre las dos condiciones analizadas. Para esto, aplicamos la herramienta DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery) que lleva a cabo análisis de enriquecimiento de los cuales surgen las relaciones funcionales enriquecidas entre los genes diferenciales según el sistema ontológico GO (Gene Ontology). Los términos ontológicos definidos en GO pueden pertenecer a las categorías: Procesos Biológicos (BP), Función Molecular (MF) o Componentes Celulares (CC). Cuando se encuentran términos ontológicos enriquecidosen relación a una lista de genes de referencia, este análisis asocia un valor p a dicho enriquecimiento, que le da significación estadística al mismo.

A fin de favorecer la visualización y comprensión de los términos ontológicos obtenidos, utilizamos un sistema de grafos, donde los términos ontológicos enriquecidos en función de los genes diferencialmente expresados a partir de la modulación de SPARC, se organizan en ramas en función de la similitud biológica que presentan. Por ejemplo, todos los términos asociados a una misma función biológica se organizan un una misma rama. Cuanto más enriquecida está una determinada función biológica, la rama cuenta con un mayor número de nodos enriquecidos en los genes diferenciales. Asimismo, cuanto se avance sobre una rama (hacia abajo), más específicos, en relación a la función biológica analizada, son los genes identificados (Figura 52). Los colores que presentan cada uno de los nodos están asociados a la significancia estadística de los términos luego de hacer los contrastes de los genes diferencialmente expresados contra 3 posibles referencias(Fresno Cristóbal, 2011): 1-La lista de genes del genoma de la especie que se está estudiando, 2- todos los genes impresos en el microarreglo utilizado o 3- aquellos genes presentes en el chip con señal por encima del ruido, es decir, cuya señal resulta confiable. Si el nodo es de color amarillo, lo términos de ese nodo resultaron diferenciales al compararlos contra el genoma y contra los genes presentes en el microarreglo; si el nodo es naranja, esos términos salieron enriquecidos sólo cuando se los

compara contra el genoma del ratón; si el nodo es rojo, esos términos salieron enriquecidos al utilizar las tres referencias; y se es verde, los términos de ese nodo salieron enriquecidos sólo al compararlos contra el total de genes diferenciales del experimentos. A los fines prácticos del análisis de los resultados, estas comparaciones no serán tenidas en cuenta.

**Las diferencias encontradas en la velocidad de proliferación entre la línea 4T1 SCR y Clon 18 serían dependientes de la regulación de las vías de señalización del ciclo celular y de P53.**

El análisis de los **procesos biológicos** (BP) enriquecidos a partir de los genes diferencialmente expresados entre la línea clon 18y 4T1 SCR, arrojó, entre las ramas más enriquecidas y con mayor número de nodos, al proceso "ciclo celular" (Figura 52)

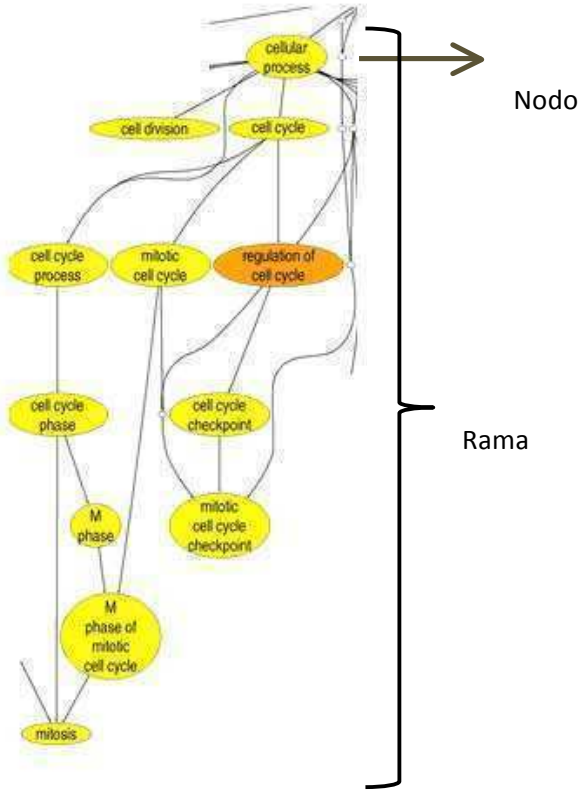



**Figura 52 La modulación de SPARC en la línea 4T1 genera cambios en la regulación del ciclo celular.** Términos asociados a ciclo celular enriquecidos a partir de la modulación de los niveles de expresión de SPARC. A medida que avanzamos hacia la parte terminal de la rama mostrada, el término ontológico es más específico. Para la realización de los grafos mostrados se incluyeron aquellos términos ontológicos diferencialmente enriquecidos con un valor p menor a 0.05.

La Tabla 12 muestra la lista de genes diferenciales asociados a ciclo celular obtenidos a partir de la modulación de los niveles de SPARC. La variable U/D (por *UP/Down*) de la primera

columna de la tabla es una variable clasificatoria, no cuantitativa, que indica si ese gen se encuentra sobre (1) o subexpresado (-1) en el clon 18 respecto a la línea 4T1 SCR.

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12442 | Ccnb2 | cyclin B2 | -1.21 | 0.017 |
| 1 | 12443 | Ccnd1 | cyclin D1 | 1.1909 | 0.022 |
| 1 | 217232 | Cdc27 | cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae) | 1.1712 | 0.017 |
| 1 | 75786 | Ckap5 | cytoskeleton associated protein 5 | 1.2226 | 0.007 |
| -1 | 66140 | Fam33 a | family with sequence similarity 33, member A | -1.24 | 0.011 |
| 1 | 17246 | Mdm2 | transformed mouse 3T3 cell double minute 2 | 1.1519 | 0.026 |
| 1 | 17345 | Mki67 | antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 | 1.1696 | 0.023 |
| 1 | 17886 | Myh9 | myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle | 1.1655 | 0.034 |
| -1 | 50927 | Nasp | nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) | -1.19 | 0.041 |
| -1 | 67010 | Rbm7 | RNA binding motif protein 7 | -1.23 | 0.029 |
| 1 | 14211 | Smc2 | structural maintenance of chromosomes 2 | 1.1329 | 0.042 |
| -1 | 66131 | Tipin | timeless interacting protein | -1.24 | 0.006 |
| 1 | 22390 | Wee1 | WEE 1 homolog 1 (S. pombe) | 1.2218 | 0.009 |
| -1 | 68014 | Zwilch | Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila) | 1.1736 | 0.038 |

**Tabla 12 Lista de genes relacionados a la regulación del ciclo celular diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o subexpresado (-1) en clon 18 respecto a 4T1SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el clon 18 y 4T1 SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto a SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en

comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

El análisis realizado reporta posibles regulaciones a nivel transcripcional de SPARC sobre Myh9, Fam33, Zwilch, Tipin, Nasp, MDM2, ciclina B y WEE1 que aún no han sido descriptas en la literatura.

A fin de profundizar acerca de la posible relación funcional entre SPARC y los genes encontrados asociados al ciclo celular, mencionados en la Tabla 12, realizamos una búsqueda en GENEMANIA (http://www.genemania.org/). Esta herramienta aporta información sobre la función de un determinado gen a partir de la asociación de éste con un grupo de genes de función conocida. El programa realiza un gráfico en el cual se muestran los genes seleccionados para establecer las asociaciones, como círculos grises. Las interacciones predichas, co-localizaciones y co-expresiones reportadas se grafican con líneas conectoras de colores marrones, grises y celestes respectivamente. La Figura 53 muestra los resultados obtenidos para SPARC y los genes asociados a ciclo celular diferencialmente expresados a partir de su modulación. Se observa que SPARC, a través de la regulación **negativa** y/o la interacción con uno de los genes diferenciales encontrados, Wee1, podría impactar sobre la expresión/función de varios genes que son reguladores esenciales del ciclo celular, específicamente sobre Mdm2, ciclinas B2 y D1, cdc27 y otros.

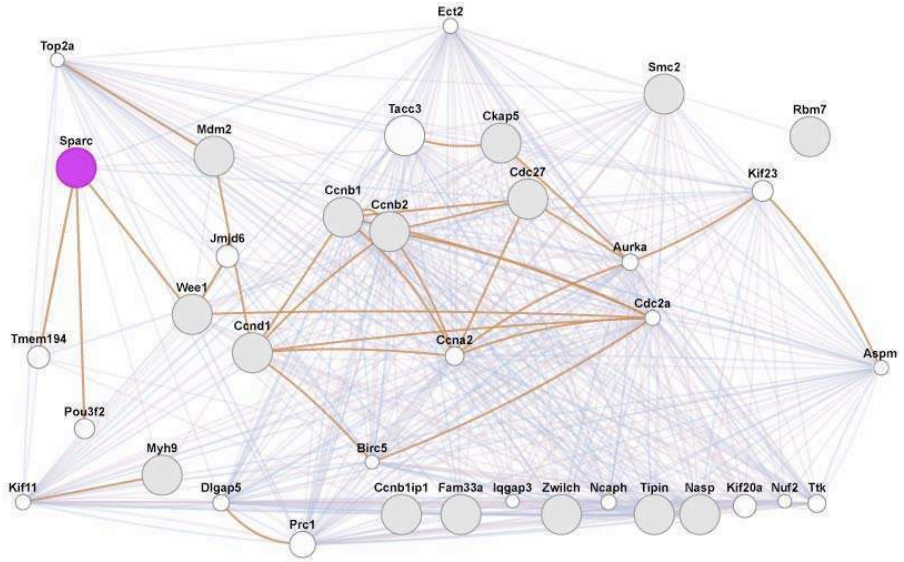



**Figura 53 SPARC se relaciona directa o indirectamente con numerosos genes reguladores del ciclo celular.** Imagen obtenida del análisis realizado en GENEMANIA a fin de establecer la función de SPARC en el ciclo celular a partir de la interacción con otros genes de función conocida. En círculos grises se señalan los genes encontrados diferencialmente expresados a partir de la modulación endógena de SPARC. Las líneas conectoras marrones, hacen referencia a interacciones predichas. Las líneas conectoras celestes, hacen referencia a co-localizaciones reportadas, las líneas grises muestran co-expresiones reportadas.

Utilizando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomeshttp://www.genome.jp/kegg/), que vincula funcionalmente numerosos genes involucrados en procesos biológicos, pudimos asociar algunos de estos genes diferenciales con interacciones funcionales específicas. Cabe aclarar que las interacciones funcionales descriptas en KEGG se limitan a lo que ha podido ser anotado en dicha base de datos y no incluye todos los genes que están comprendidos en los términos ontológicos de GO. Por ello, no han podido ser asignados en las vías KEGG todos los genes diferenciales asociados a los términos GO enriquecidos. En KEGG encontramos dos vías diferencialmente expresadas entre la línea clon 18 y 4T1 SCR, la vía del **ciclo celular** y la de **P53**, ambas con 7 genes diferencialmente expresados a partir de la modulación de los niveles de SPARC. Tabla 13

| **Vía de señalización** | **Pval** | ***Gene Down*** | ***GeneUp*** |
|---|---|---|---|
| p53 signaling pathway | <0.001 | Ccnb2, Casp3 | Ccnd1, Sfn (14.3.3 epsilon), Mdm2, Serpine1, Thbs1 |
| Cell cycle | 0.01 | Ccnb2, Orc4 | Wee1, Sfn (14.3.3 epsilon), Ccnd1, Cdc27 (APC/C), Mdm2 |

**Tabla 13 La modulación de los niveles endógenos de SPARC en líneas celulares de cáncer de mama genera la modulación de las vías funcionales de ciclo celular y P53.** La columna vía de señalización contiene en el nombre de la vía que se encuentra diferencialmente enriquecida. Las columnas Gene Down y Gene Up contiene el nombre de los genes de dicha vía que se encuentran sobre o subexpresados en el Clon 18 respecto a SCR. La columna Pval indica el valor p obtenido para el enriquecimiento de esa vía de señalización al hacer la comparación entre los niveles de expresión utilizando un modelo estadístico lineal.

En la Figura 54, correspondiente a los genes de ciclo celular presentes en KEGG que aparecen desregulados, se puede observar una posible relación entre el aumento de los niveles de Wee1 y 14.3.3.epsilon en clon 18 y la disminución de ciclina B2.El análisis global del sentido de modulación de los niveles de expresión de todos los genes diferenciales (con excepción de Ciclina D) estaría señalando un arresto del ciclo celular en el clon 18, lo que concuerda con los datos de proliferación para este clon tanto *in vitro* como *in vivo*.

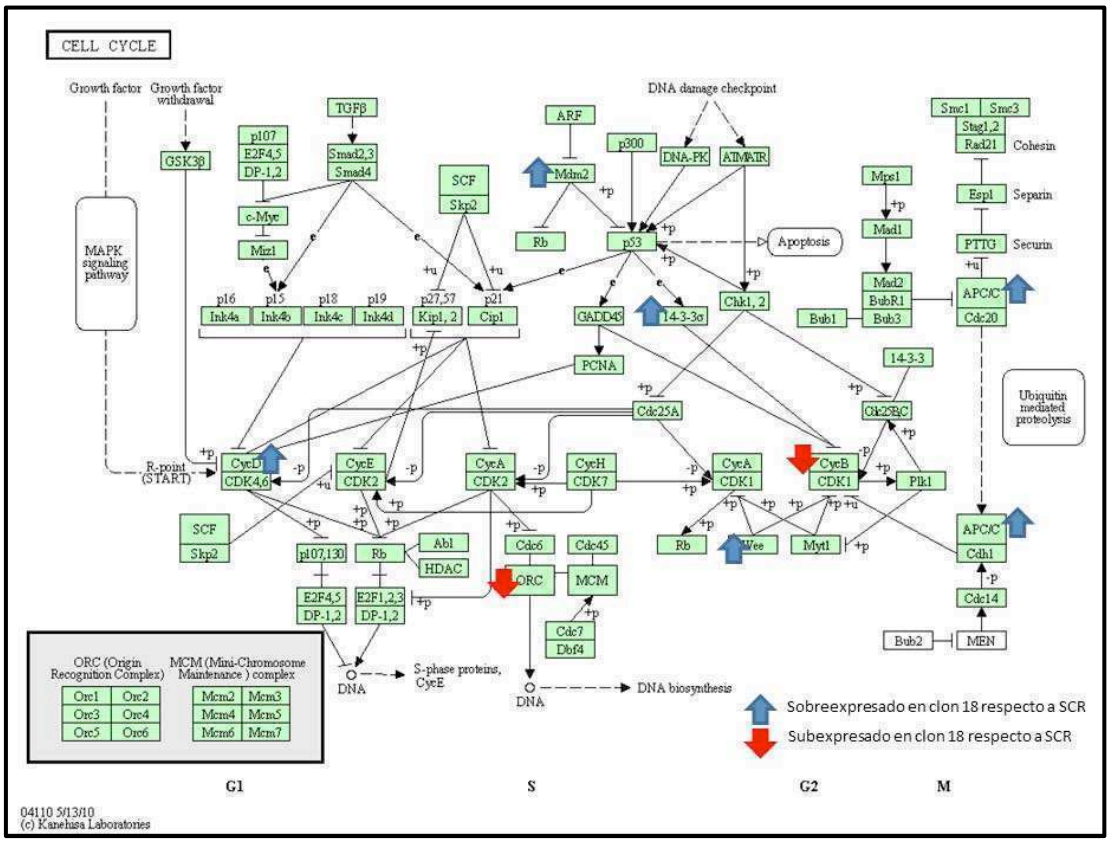



**Figura 54 SPARC regula los niveles de expresión de genes del ciclo celular.** Imagen obtenida de KEGG que resumen la vía del ciclo celular, a la cual se agregaron flechas celestes para señalar genes sobrexpresados en el clon 18 y flechas rojas para señalar genes subexpresados en el clon 18 respecto a 4T1 SCR.

En la Figura 55 se representan las variaciones cuantitativas de los genes correspondientes al camino de p53. Aquí puede destacarse el efecto ya visto de disminución de ciclina B mediada

por 14.3.3 epsilon que arrestaría a las células de clon 18, acompañado del aumento de PAI y TSP1 que contribuirían a disminuir angiogénesis y metástasis en dichas células.

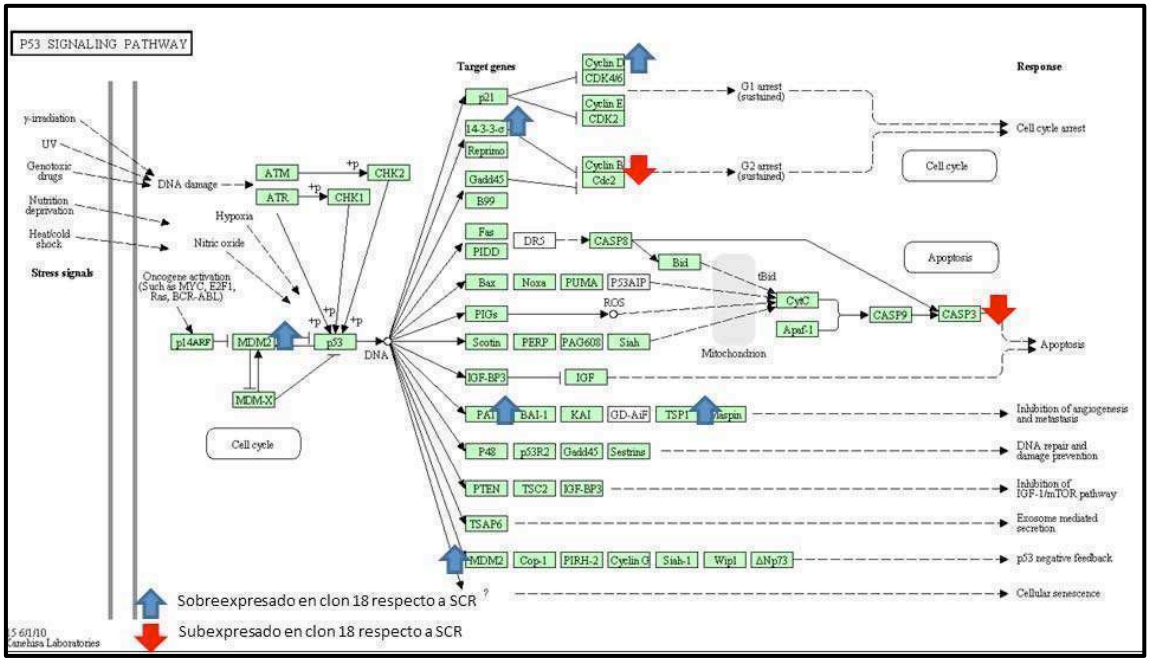



**Figura 55 SPARC regula los niveles de expresión de genes de la vía P53.** Imagen obtenida de KEGG que resumen la vía del ciclo celular, a la cual se agregaron flechas celestes para señalar genes sobrexpresados en el clon 18 y flechas rojas para señalar genes subexpresados en el clon 18 respecto a 4T1 SCR.

Estos resultados nos llevaron a realizar ensayos funcionales que exploraron el papel de SPARC y los genes coregulados por ella en el ciclo celular.

Inicialmente se describió a SPARC como una proteína anti-proliferativa en células normales (Sage, 2001). Particularmente en cáncer de mama, se describió que el aumento de SPARC retarda la progresión a fase S del ciclo celular (Dhanesuan et al., 2002), mientras que es capaz de inducir apoptosis en cáncer de ovario (Yiu et al., 2001). Sin embargo, en los últimos años se reportó que SPARC podría favorecer el ciclado en diversas líneas de melanoma. En particular, muy recientemente Horie y colaboradores (Nagashima et al., 2010) proponen que el silenciamiento de SPARC arresta a las células en G1 mientras que Fenouille y colaboradores (Fenouille, 2011) reportaron que el arresto generado por la inhibición de SPARC era en la fase G2/M del ciclo.

Los datos de ensayos *in vitro* mostrados a partir del modelo de 4T1 dan cuenta de que en este modelo, la inhibición de SPARC también lleva a una inhibición de la proliferación celular. Este

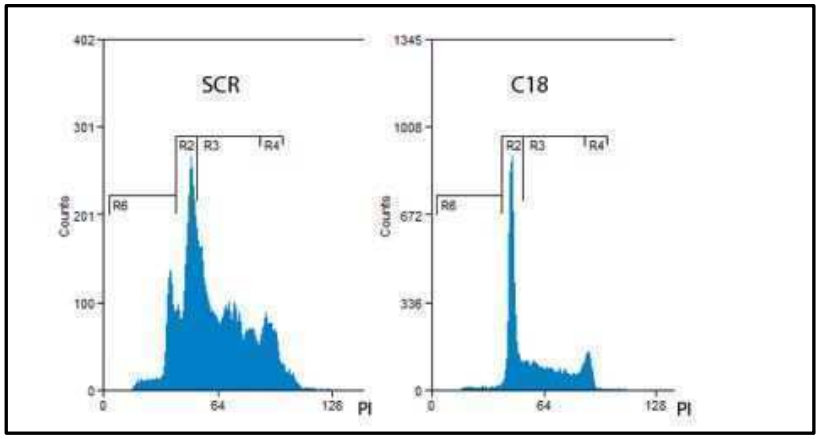
dato fue confirmado además por un recuento en el número de células a distintos tiempos. Como se muestra en la Tabla 14, a las 22 horas sólo se había duplicado el 50% de las células del Clon 18 mientras que de la línea control se habían duplicado más del 100% de las células.

| | 15hs | 19hs | 22hs | 26hs | **30hs** | 37hs | 43hs | 48hs |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SCR | 1.0 | 1.2 | 1.3 | 1.7 | **2.2** | 4.7 | 9.3 | 12.6 |
| C.18 | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.4 | **1.5** | 3.1 | 6.5 | 7.8 |

**Tabla 14 El tiempo de duplicación de las células del clon 18 es menor al de las células de la línea SCR.** En la tabla se muestra el número de células relativas al tiempo inicial (15 horas post plaqueo) a distintos tiempos para las líneas SCR y C.18.

Los resultados del análisis ontológico llevan a pensar que el arresto podría en la fase G2 del ciclo de las células del clon 18 (i.e., efecto sobre ciclina B). Por otra parte el aumento de MDM2 podría afectar los niveles de p53 activos en dichas células.

Con el fin de establecer los mecanismos a través de los cuales SPARC regula la proliferación en este modelo, comenzamos estudiando la distribución de las células SCR y Clon 18 a lo largo del ciclo celular. La Figura 56 muestra un mayor número de células del clon 18 que atraviesan la fase G1 en comparación con la línea control, que lleva a su vez a una disminución del número de células en la fase S, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Estos datos sugieren que la disminución en los niveles de expresión de SPARC estaría generando un arresto de las células en G1 y no en G2.



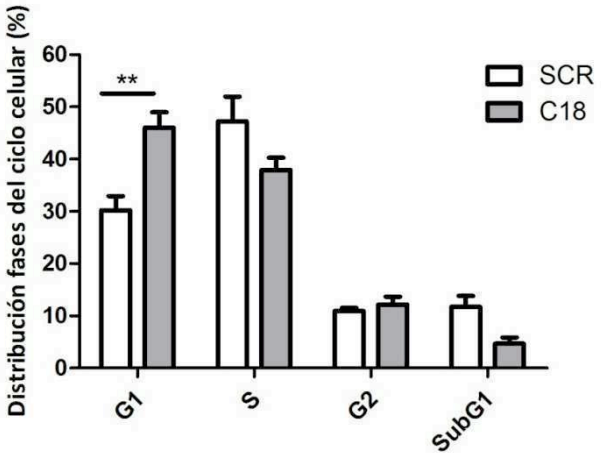




**Figura 56 La disminución en los niveles de expresión de SPARC en el clon 18 genera una distribución de células a lo largo del ciclo celular diferente a la observada en SCR.**A- Imagen representativa del perfil de distribución de células a lo largo del ciclo celular. Cada una de las fases está señalada como R, R6 corresponde a la fase SubG1 (apoptosis), R2 corresponde a la fase G1, R3 corresponde a la fase S y R4 corresponde a la fase G2. En el eje Y se grafica el número de eventos, células, y en eje horizontal la señal de Yoduro de propidio. B- Gráfica del % de células que están atravesando cada una de las fases del ciclo celular de las líneas SCR y Clon 18. ** P<.001.

A fin de confirmar si existe un cambio en la velocidad de transición en la fase S, realizamos una marcación con BrdU. Esta técnica, que se basa en la incorporación de un nucleótido marcado durante la síntesis del ADN, nos permite evaluar el promedio de células en fase S del ciclo celular. Encontramos que en promedio, el 57 % de las células de la línea 4T1 SCR se encontraban en fase S, mientras que solo el 39,5% de las células del clon 18 se encontraban en esa fase del ciclo (Figura 57).

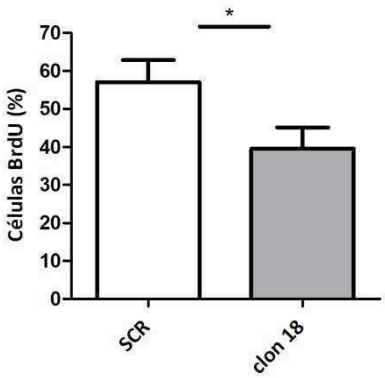



**Figura 57 El número de células que atraviesan la fase S es menor en el clon 18 que en la línea control.** El gráfico muestras el número de células que atraviesan la fase S del ciclo celular. Las células se marcaron por 2 minutos con BrdU y luego fueron fijadas para el recuento posterior. *p<0.05.

Si bien los datos obtenidos no sugieren diferencias entre ambas líneas celulares en cuanto al número de células en mitosis, realizamos un ensayo de marcación de histona H3. Los resultados obtenidos, 9,6% de células H3 positivas para la línea SCR y 8,6% para el clon 18, confirman que no hay diferencias en la entrada en mitosis entre ambas líneas celulares.

El conjunto de resultados presentados confirman que el silenciamiento de SPARC afecta el punto de control (Checkpoint) G1/S del ciclo celular, generando tanto un aumento en el número de células en fase G1 como una disminución del número de células en fase S. Estas modificaciones no afectan significativamente el número de células en apoptosis.

La validación biológica realizada señala que otros genes, posiblemente p53, pueden estar deteniendo el ciclo celular por mecanismos no evidentes a nivel transcripcional y que van más allá de los objetivos establecidos para esta tesis.

**Las propiedades antiadhesivas de SPARC también seríanreguladas a nivel transcripcional**

Está ampliamente reportado en la literatura que SPARC es una proteína con propiedades anti-adhesivas (Bradshaw, 2001; Murphy-Ullrich, 2001 y referencias incluidas en ellos). En relación con este hecho, en nuestro experimento de microarreglo *"in vitro"* encontramos que la modulación de SPARC está relacionada tanto con la regulación de la adhesión, obtenido del análisis de los **Procesos Biológicos** (BP) como a la unión a la matriz extracelular y a la unión a glicosaminoglicanos, obtenido del análisis de **funciones moleculares** (MF). (Figura 58)

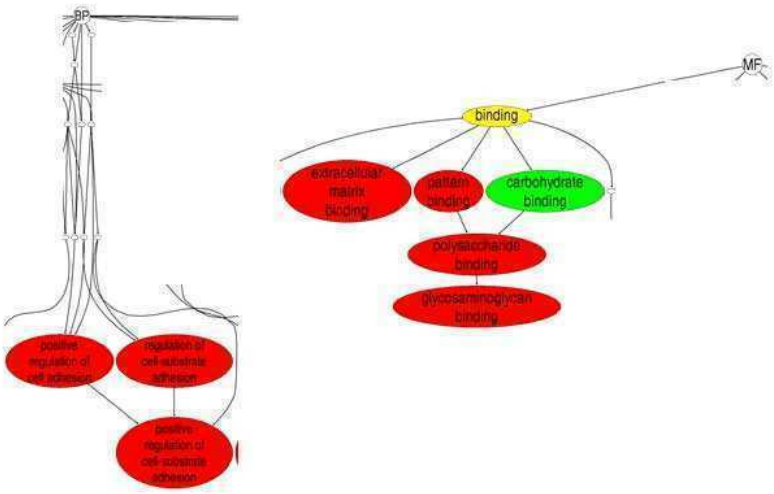



**Figura 58 La modulación de los niveles endógenos de SPARC genera cambios asociados a la capacidad adhesiva y de unión de las células al espacio extracelular.** En el grafo se muestran los términos ontológicos enriquecidos a partir de las diferencias en los niveles de expresión de los genes de las líneas SCR y Clon 18. Entre los términos enriquecidos con un valor p menor a 0.05 se encuentran los términos relaciona a "unión" y más específicamente a unión a la matriz extracelular, a carbohidratos y glicosaminoglicanos, y los términos asociados a la regulación positiva de la adhesión celular al sustrato.

Los genes diferencialmente expresados a partir de SPARC que enriquecen el término "regulación positiva de la adhesión celular al sustrato" se muestran en la Tabla 15. Es de destacar que al bajar los niveles de expresión de SPARC, obtuvimos un aumento de la expresión de todos los genes asociados con el término de regulación positiva de la adhesión al sustrato, resultado que concuerda con el efecto antiadhesivo reportado para SPARC.

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | P val |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 94214 | Spock2 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 | 1.31 | 0.007 |
| 1 | 21825 | Thbs1 | thrombospondin 1 | 1.35 | 0.003 |
| 1 | 14115 | Fbln2 | fibulin 2 | 1.52 | 0.007 |
| 1 | 12977 | Csf1 | colony stimulating factor 1 (macrophage) | 1.30 | 0.014 |

**Tabla 15 Lista de genes relacionados a la regulación de la adhesión al sustrato que se encuentran diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica

que el gen está sobrexpresado en clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto a SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Los genes diferencialmente expresados a partir de SPARC que enriquecen los términos "Unión a la matriz extracelular" y "Unión a glicosaminoglicanos", se muestran en las Tabla 16 y Tabla 17 respectivamente. Nuevamente es de destacar que para el término de unión a la matriz extracelular, la disminución de los niveles de expresión de SPARC induce un aumento en la expresión de los genes de adhesión a la matriz. Asimismo, para el caso de la unión a glicosaminoglicanos, ocurre algo similar, ya que todos excepto uno de los genes que enriquecen el término unión a glicosaminoglicanos aumentan su expresión al bajar la expresión de SPARC.

Como era esperable, entre los genes diferencialmente expresados para el término unión a la matriz extracelular, se encuentra SPARC. Este resultado puede ser tomado como un control interno del éxito del experimento. Según el resultado obtenido, la reducción en los niveles del mensajero de SPARC en el clon 18 es del al menos 56% respecto a los niveles expresados por 4T1 SCR, lo cual es un cambio comparable al reportado por la PCR en tiempo real.

| U/D | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Fbln2 | fibulin 2 | 1.52 | 0.007 |
| 1 | Spock2 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 | 1.31 | 0.007 |
| -1 | Sparc | secreted acidic cysteine rich glycoprotein | 1.19 | 0.016 |
| 1 | Thbs1 | thrombospondin 1 | 1.35 | 0.003 |

**Tabla 16 Lista de genes relacionados a la adhesión a la matriz extracelular que se encuentran diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR.La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto a SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12505 | Cd44 | CD44 antigen | 1.33 | 0.002 |
| 1 | 14219 | Ctgf | connective tissue growth factor | 1.47 | <0.001 |
| -1 | 76477 | Pcolce2 | procollagen C-endopeptidase enhancer 2 | -1.41 | 0.012 |
| 1 | 94214 | Spock2 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 | 1.31 | 0.007 |
| 1 | 20020 | Stab2 | stabilin 2 | 1.27 | 0.002 |
| 1 | 21825 | Thbs1 | thrombospondin 1 | 1.35 | 0.003 |

**Tabla 17 Lista de genes relacionados a la unión a glicosaminoglicanos que se encuentran diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR.. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto a SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Finalmente, el análisis de los términos ontológicos incluidos en la clase **Componentes Celulares** (CC) evidenció un importante número de genes asociados a la matriz extracelular (Figura 59) diferencialmente expresados entre el clon 18 y la línea 4T1 SCR (Tabla 18). Dentro de esta tabla, se encuentra MMP3, que es el gen que más modifica sus niveles de expresión (baja al menos un 70% en el clon 18 en relación a la línea 4T1 SCR) en función del silenciamiento de SPARC. Retomaremos la significación de este hallazgo en el apartado siguiente.

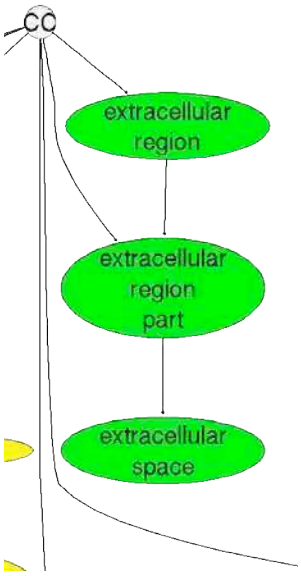



**Figura 59 La modulación de los niveles endógenos de SPARC genera una alteración del espacio extracelular.** Sección del grafo del término Componente Celular que posee los términos diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18 relacionados a"Región extracelular".

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | P val |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 50518 | A | Nonagouti | -1.3 | 0.022 |
| 1 | 12266 | C3 | complement component 3 | 1.38 | 0.004 |
| 1 | 12977 | Csf1 | colony stimulating factor 1 (macrophage) | 1.3 | 0.014 |
| 1 | 14219 | Ctgf | connective tissue growth factor | 1,47 | <0.001 |
| -1 | 3E+05 | Cxcl3 | chemokine (C-X-C motif) ligand 3 | -1.28 | 0.005 |
| 1 | 20311 | Cxcl5 | chemokine (C-X-C motif) ligand 5 | 1.255 | 0.011 |
| -1 | 13480 | Dpm1 | dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1 | -1.22 | 0.003 |
| 1 | 14115 | Fbln2 | fibulin 2 | 1.52 | 0.007 |
| 1 | 4E+05 | Glipr2 | GLI pathogenesis-related 2 | 1.3 | 0.036 |
| 1 | 14751 | Gpi1 | glucose phosphate isomerase 1 | 1.17 | 0.031 |
| 1 | 54135 | Lsr | lipolysis stimulated lipoprotein receptor | 1.23 | 0.026 |
| -1 | 17392 | Mmp3 | matrix metallopeptidase 3 | -1.73 | <0.001 |
| 1 | 17395 | Mmp9 | matrix metallopeptidase 9 | 1.3 | 0.003 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 76477 | Pcolce2 | procollagen C-endopeptidase enhancer 2 | -1.4 | 0.012 |
| 1 | 18787 | Serpine1 | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1 | 1.24 | 0.028 |
| 1 | 55948 | Sfn | Stratifin | 1.18 | 0.03 |
| -1 | 20568 | Slpi | secretory leukocyte peptidase inhibitor | -1.22 | 0.039 |
| -1 | 20692 | Sparc | secreted acidic cysteine rich glycoprotein | -1.2 | 0.016 |
| 1 | 94214 | Spock2 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 | 1.31 | 0.007 |
| 1 | 21825 | Thbs1 | thrombospondin 1 | -1.27 | 0.003 |

**Tabla 18 Lista de genes asociados a espacio extracelular que se encuentran diferencialmente expresados entre las líneas 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto a SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Es de destacar que esta tabla contiene algunos genes relacionados con el reclutamiento del sistema inmune; este dato lo retomaremos más adelante, al analizar los resultados obtenidos en el microarreglo *in vivo.*

**MMP3 es el gen que mayor grado de inhibición presenta en el clon 18 al silenciar SPARC**

Como mencionábamos en el párrafo anterior, el experimento de microarreglos mostró que los niveles de expresión de MMP3 disminuyeron al menos un 70% en el clon 18 respecto a la línea 4T1 SCR, y el valor de p obtenido fue menor a 0.001. Cabe aclarar en este punto que el ensayo de microarreglos utilizado tiene un bajo rango dinámico por sus características técnicas intrínsecas. Esto hace que diferencias de expresión mayores al rango dinámico del ensayo no puedan ser cuantificadas apropiadamente, y por ello los cambios observados pueden ser menores a los reales.

En la literatura se ha reportado la relación entre SPARC y MMP3. SPARC es clivada por MMP3, aumentando por un lado su afinidad por el colágeno I, IV y V (Sasaki et al., 1997), y por el otro generando polipéptidos que estimulan la angiogénesis (Sage et al., 2003), y en modelos de

glioma, la expresión de SPARC aumenta la expresión de MMP3, favoreciendo el fenotipo metastásico (Rich et al., 2003). Asimismo, la expresión de MMP3 en líneas de cáncer de mama está asociada al fenotipo invasivo y metastásico (Phromnoi, 2009; Balduyck, 2000; Ramos-DeSimone, 1999; Hahn-Dantona, E, 1999).

Para la validación técnica de MMP3 realizamos una PCR en tiempo real comparando los niveles de SPARC y MMP3 en las líneas 4T1 SCR y clon 18. La Figura 60 muestra que los niveles de SPARC en la línea 4T1 SCR y en el clon 18 correlacionan con los niveles de MMP3.

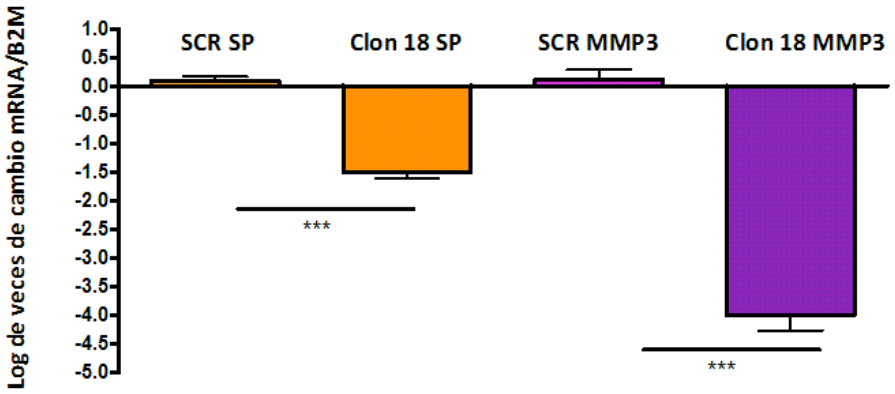



**Figura 60 Los niveles de expresión de SPARC correlacionan con los niveles de expresión de MMP3.** PCR en tiempo real.En naranja se muestran las veces de cambio de expresión del mensajero de SPARC en las líneas 4T1 SCR y clon 18. En violeta se muestran las veces de cambio de expresión del mensajero de MMP3 en las mismas líneas. ***P<0.001.

Dado que el experimento de microarreglos se realizó con células donde se habían reducido de forma estable los niveles de expresión de SPARC, como control adicional de los resultados obtenidos, decidimos reexpresar SPARC de manera transitoria en el clon 18 y verificar la modulación de los niveles de MMP3. Para ello, clonamos el mensajero completo de SPARC en un vector de expresión y transfectamos en forma transitoria el clon 18. Luego de 48 horas, extrajimos el ARN de las líneas y realizamos una PCR en tiempo real. Como control transfectamos la línea 4T1 SCR con el vector vacío, además incluimos la línea 52-1, a fin de verificar la modulación de los niveles de MMP3 en la línea a partir del cual se obtuvo el clon 18. Los resultados mostrados en la Figura 61, nos permiten afirmar que las variaciones en los niveles de MMP3 son consecuencia directa de la modulación de los niveles de SPARC, y de esta manera validar los resultados obtenidos en el experimento de microarreglos.

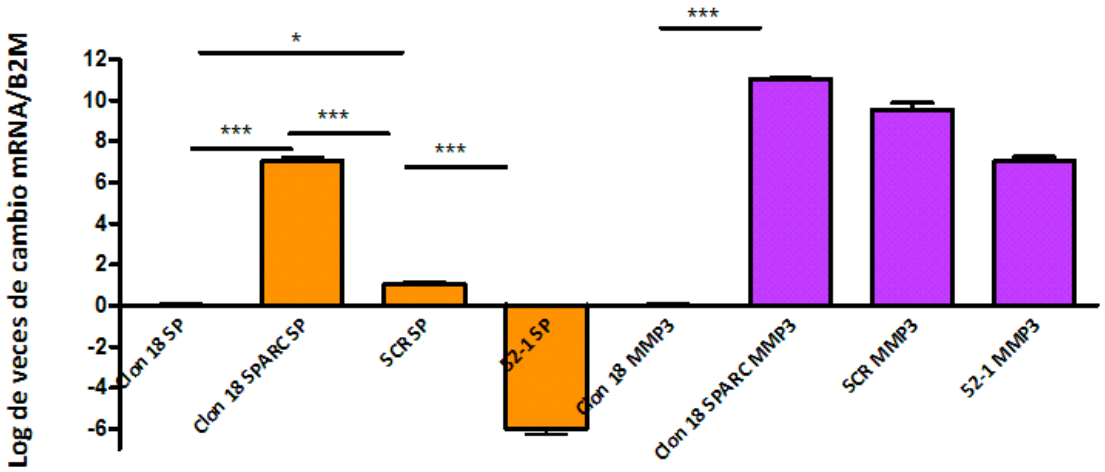



**Figura 61 La modulación de SPARC está directamente relacionada a la expresión de MMP3.** PCR en tiempo real. En naranja se muestran las veces de cambio del mensajero de SPARC en las líneas (de izq a derecha) Clon 18. Clon 18 SPARC, SCR y 52-1. En violeta se muestran las veces de cambio del mensajero de MMP3 en las mismas líneas. *p<0.5; ***P<0.01

A modo de resumen de todo lo evaluado en los experimentos de microarreglos, podemos decir que en estos ensayos, SPARC regulatranscripcionalmente y posiblemente a niveles postranscripcionales, genes involucrados en ciclo celular, incluyendo efectos sobre la vía del supresor de tumores p53. También afecta de manera muy importante la capacidad antiadhesiva de las células, modificando específicamente muchos genes relacionados con la interacción con la matriz extracelular (entre los cuales se destaca la inducción de MMP3 que es de relevancia en procesos de invasión) y con la comunicación con células del estroma tumoral, punto que ampliaremos en secciones posteriores.

Nuestros resultados confirman que SPARC es una proteína que afecta numerosas y disímiles vías funcionales celulares, lo concuerda con lo descripto en otros modelos en la literatura. Esta actividad "promiscua" de SPARC implicaría la modulación de más de una vía molecular, lo cual enfatiza lo que todavía no se conoce claramente: de qué manera SPARC activa señales moleculares que inducen todos estos cambios transcripcionales y sus consecuencias a nivel funcional. En la Discusión retomaremos este problema.

## *Experimento de microarreglo in vivo.*

**SPARC regula diferentes funciones biológicas *in vitro* e *in vivo***

Aunque demostró la importancia de los cambios generados en las células epiteliales tumorales sobre genes que contribuyen a la remodelación del microambiente tumoral, el sistema experimental estudiado con los microarreglos *in vitro*, no aborda en forma directa el problema de la diseminación metastásica. Dado que dicho proceso involucra la interacción entre las células epiteliales y el estroma tumoral, decidimos realizar un segundo experimento de microarreglos comparando la expresión diferencial de genes en tumoresgenerados por las líneas 4T1 SCR y clon 18, a las 48 h postinyección, junto a la expresión de genes en las metástasis pulmonares generadas por la línea 4T1 SCR a los 30 días de la inoculación. El tiempo seleccionado para la extracción del tumor primario se basó en que, entre otros objetivos, buscamos identificar genes que puedan reportar tempranamente la capacidad metastásica del tumor primario (ver más adelante). A partir de los datos obtenidos en el microarreglo anterior, en el cual encontramosalgunos genes diferencialmente expresados entre ambas líneas relacionados a la respuesta inflamatoria, diseñamos un nuevo experimento que nos permitiera identificar:

1. Qué genes se expresan diferencialmente entre el tumor primario 4T1 SCR y el tumor primario clon 18. Algunos de estos genes serán comunes al experimento in vitro y corresponderán a cambios generados por los niveles de SPARC sobre las células epiteliales. Los que no sean comunes constituirán los cambios que SPARC proveniente de las células epiteliales genera sobre el entorno tumoral o en función de la interacción de la célula epitelial con el mismo.
2. Qué genes compartidos entre el tumor primario 4T1 SCR y sus respectivas metástasis son diferenciales respecto al clon 18 primario. Esos serían los genes más estrechamente relacionados con la capacidad metastásica y podrían constituir una firma molecular **temprana**de genes dependientes de SPARC que indique agresividad tumoral o pronostique diseminación metastásica.
3. Qué genes son diferencialmente expresados entre el tumor primario 4T1 SCR y sus respectivas metástasis. Aunque esta comparación no tiene directa correlación con los niveles de SPARC, podemos analizar cuáles son las vías funcionales más afectadas

durante la diseminación metastásica e indirectamente especular sobre el rol de SPARC en tales vías.

Para llevar a cabo el experimento, obtuvimos ARN de 4 muestras biológicas independientes (tumores), correspondientes a 4 animales inoculados con las líneas 4T1 SCR y clon 18, a las 48 horas postinyección en la glándula mamaria de hembras de la cepa BALB/C, y 4 metástasis pulmonares generadas de manera espontánea luego de 30 días postinyección de las células 4T1 SCR en la glándula mamaria. En la Figura62 se muestran imágenes representativas de los tejidos utilizados para la realización de los microarreglos. El análisis histopatológico de los tumores primarios mostró un importante infiltrado leucocitario (neutrófilos y macrófagos) en ambos tumores primarios, aunque el clon 18 parece tener mayor número de neutrófilos que el control. Asimismo, las metástasis a los 30 días estaban compuestas principalmente por células epiteliales y eran histopatológicamente similares al tumor primario SCR que les dio origen.

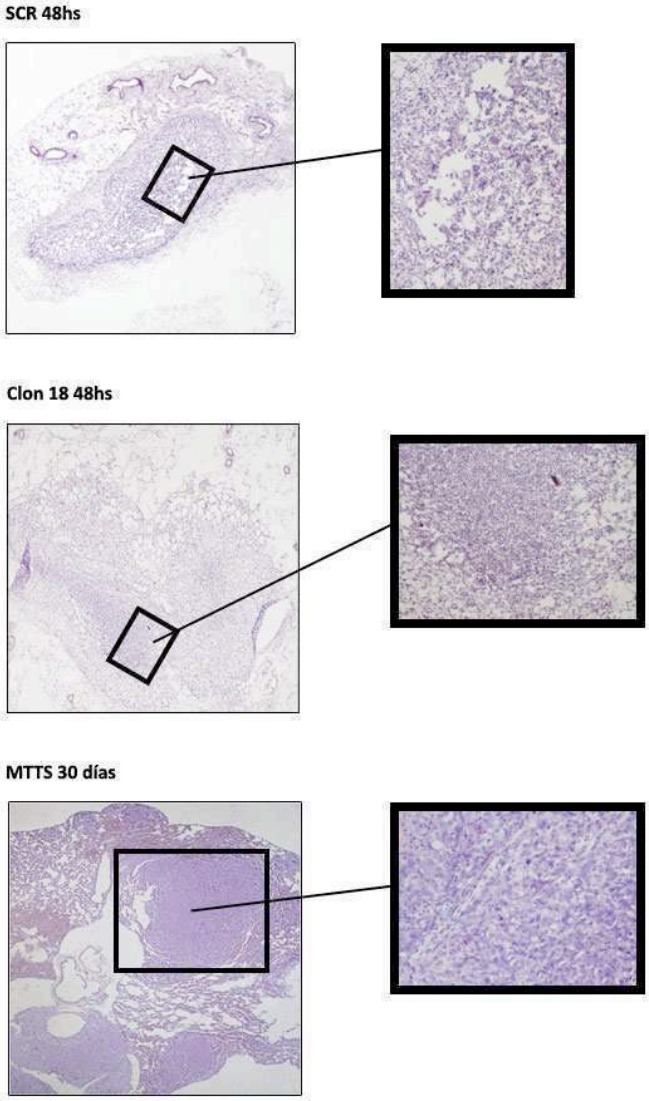



**Figura62Imágenes representativas de los tejidos utilizados para el ensayo de microarreglo *in vivo*.** A la izquierda se muestran imágenes, de tinciones de H&E, representativas de las muestras utilizadas para la extracción del ARN empleado en los experimentos de microarreglos (5x). A la derecha se muestra un aumento del campo mostrado a la derecha que resalta en el caso de los tumores primarios la presencia necrosis y de infiltrado inflamatorio, y en el caso de las metástasis, la presencia de tejido principalmente epitelial con un leve infiltrado inflamatorio.

El análisis de "*clustering"* o agrupamiento jerárquico no supervisado de los genes diferenciales, se realizó a partir de la comparación de la expresión de los genes entre los tumores SCR y Clon 18, y a partir de esos genes diferenciales, se realizó la comparación entre los tres tipos de muestras del experimento *in vivo*: SCR, clon 18 y Mtt. Estas comparaciones nos permiten, por un lado evaluar los genes diferencialmente expresados en los tumores primarios, contraste que a su vez utilizaremos para comparar con el experimento demicroarreglos *in vitro*. Por el otro, pudimos evaluar cuáles son los genes regulados por SPARC (genes

diferencialmenteexpresados entre los tumores Clon18 y SCR) que se mantienen en las metástasis generadas por el tumor SCR; esta última comparación nos permitió establecer una firma temprana de genes del tumor primario que se mantiene como tal en las metástasis y que sería determinante de la agresividad tumoral mediada por SPARC.

El mapa de color resultante, mostró que las muestras de los tumores 4T1 SCR y Clon 18 fueron eficientemente discriminadas en función de las diferencias en los niveles de expresión de los genes comparados. Asimismo, este agrupamiento separó diferencialmente las muestras pertenecientes a las metástasis pulmonares. Para la realización de esta separación se seleccionaron como parámetros de los genes un valor de p menor a 0,01 entre la condición clon 18 y SCR (sea esta última correspondiente a metástasis o a tumor primario), y un $\log_2$ de veces de cambio de 0,4. De esta manera se obtuvieron 219 genes diferencialmente expresados. (Ver lista completa de genes en el anexo V) que permitieron segregar al tumor primario de las metástasis y del tumor generado por el clon 18 (Figura 63).

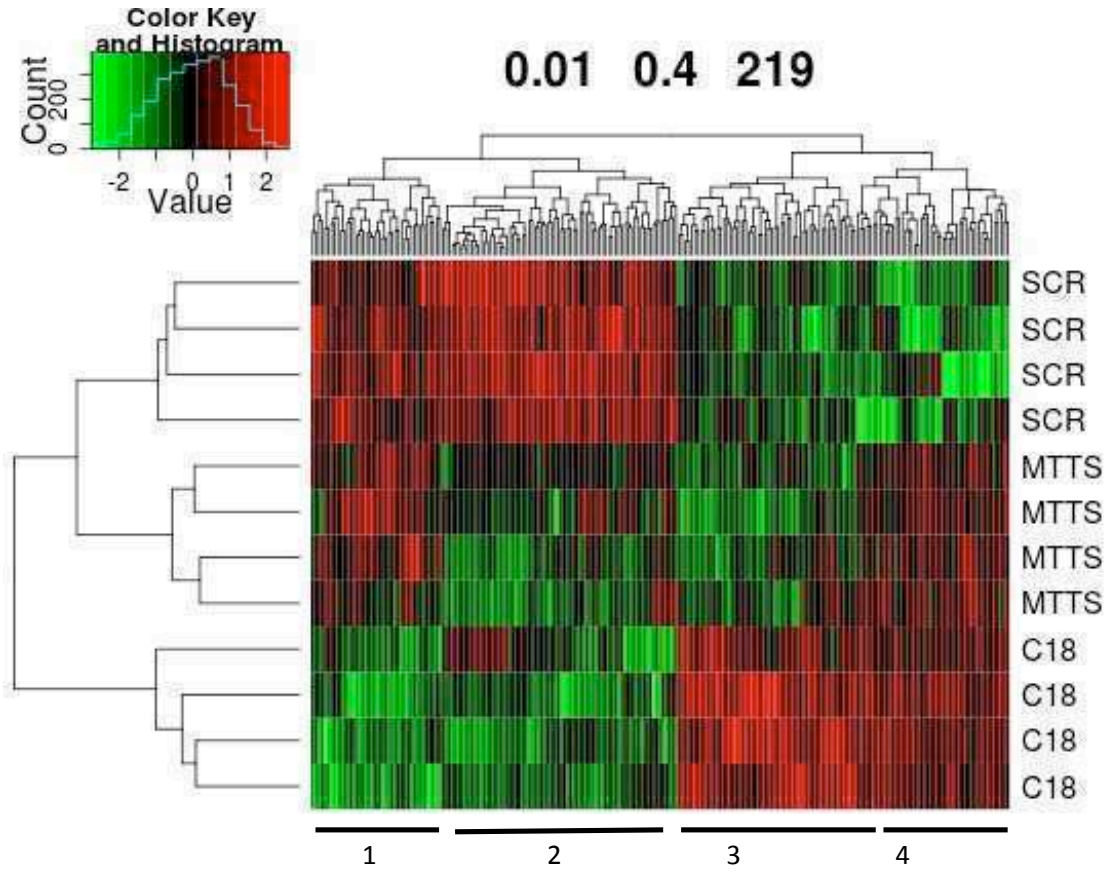



**Figura 63Genes diferencialmente expresados entre los tumores 4T1 SCR y Clon 18, 48 horas post inyección de las células en la glándula mamaria de hembras de la cepa BALB/C y las metástasis pulmonares generadas por la**

**línea 4T1 SCR 30 días post inyección de las células en la glándula mamaria.**Mapa de color que muestra la agrupación por análisis jerárquico no supervisado de los genes con expresión diferencial identificados por la técnica de microarreglos de ADN. Las columnas representan los genes identificados y las filas representan cada uno de los microarreglos analizados. El mapa fue dividido en 4 regiones para su análisis: La comparación de las regiones 1 y 2 versus 3 y 4 son las regiones correspondientes a los genes diferencialmente expresados entre los tumores Clon 18 y SCR. Las regiones 1 y 3 corresponden a los genes cuyo nivel de expresión es igual entre el tumor SCR y la metástasis pero estadísticamente diferente con el Clon 18. Los 219 genes seleccionados para el agrupamiento fueron aquellos cuyo $\log_2$ de veces de cambio en valor absoluto fuera mayor a 0.4 con un valor p menor a 0.01

Con este set de genes diferenciales realizamos análisis ontológicos similares a los que llevamos a cabo anteriormente, utilizando la herramienta DAVID. Comenzamos evaluando los términos ontológicos contenidos en las regiones 1 y 2 versus 3 y 4, las cuales corresponden a genes diferencialmente expresados entre los tumores primarios del Clon 18 y de las células control 4T1 SCR.

Entre los términos que consideramos de mayor relevancia biológica para nuestro modelo experimental encontramos, al igual que en el microarreglo *in vitro*, un importante número de genes correspondientes a proteínas extracelulares (Figura 64):

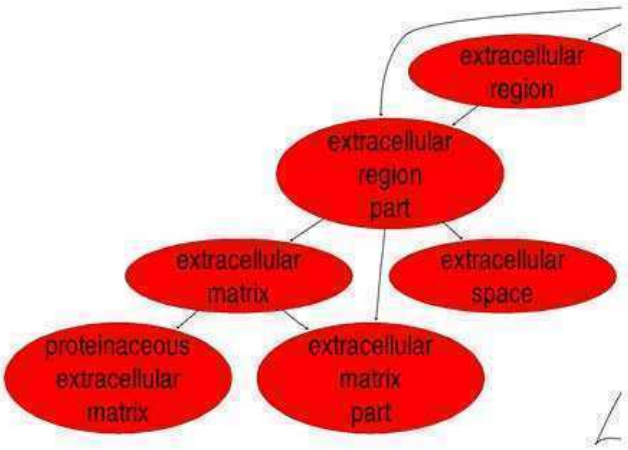



**Figura 64 El análisis ontológico del experimento de microarreglo *in vivo* mostró que la expresión diferencial de SPARC modula numerosos genes relacionados a la composición del espacio extracelular.** El esquema muestra una región del grafo correspondiente al término ontológico Componente Celular (CC), que muestra en enriquecimiento de los términos asociados a la composición de la matriz extracelular regulados por SPARC.

Los genes pertenecientes al término "Región extracelular" se muestran en laTabla 19. Se resaltaron con fondo celeste los genes MMP9 y Slpi (secretory leukocyte peptidase inhibitor),

que resultaron diferencialmente expresados en ambos experimentos de microarreglos, *in vitro*e *in vivo.* Un dato que merece ser remarcado es que Mmp9*,* aparece sobrexpresado en el clon 18 en el experimento de microarreglo *in vitro*con respecto a la línea control. Sin embargo, en el experimento de microarreglo *in vivo,* este gen aparece subexpresado en el tumor generado por el clon18 con respecto al tumor generado por la línea control. Podemos interpretar este resultado de dos maneras: por un lado este gen cambiaría su nivel de expresión en la célula tumoral en respuesta a cambios en el microambiente tumoral que se generan a partir de la inoculación de las células en el animal. Alternativamente, podemos pensar que el cambio en los niveles de expresión de este gen en el tumor representa la sumatoria de la expresión del gen por parte de todas las células que componen el entorno tumoral. La expresión de MMP9 en el tumorha sido asociada al estroma tumoral (Bergamaschi et al., 2007; Van´t Veer et al., 2002) y a la capacidad invasiva de las células tumorales, con lo cual, podemos suponer que los mayores niveles de expresión de MMP9 en los tumores SCR contribuiría, junto con otras proteínas, a la capacidad invasiva de este tumor.

| U/D | EntrezID | Name | Description | Pval | FC |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 11490 | Adam15 | a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin) | 0.002 | -1.57 |
| -1 | 11600 | Angpt1 | angiopoietin 1 | <0.001 | -1.46 |
| 1 | 11816 | Apoe | apolipoprotein E | <0.001 | 1.49 |
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 0.002 | 1.56 |
| 1 | 12825 | Col3a1 | collagen, type III, alpha 1 | 0.002 | 1.32 |
| 1 | 12833 | Col6a1 | collagen, type VI, alpha 1 | 0.003 | 1.33 |
| -1 | 12837 | Col8a1 | collagen, type VIII, alpha 1 | 0.004 | -1.46 |
| -1 | 14825 | Cxcl1 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 | <0.001 | -1.42 |
| 1 | 13179 | Dcn | Decorin | <0.001 | 1.43 |
| 1 | 56429 | Dpt | Dermatopontin | 0.001 | 1.42 |
| 1 | 216616 | Efemp1 | epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 | 0.003 | 1.92 |
| 1 | 18606 | Enpp2 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 | <0.001 | 1.47 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 0.001 | 1.45 |
| -1 | 14268 | Fn1 | fibronectin 1 | <0.001 | -1.37 |
| 1 | 14590 | Ggh | gamma-glutamyl hydrolase | 0.002 | 1.35 |
| -1 | 56213 | Htra1 | HtrA serine peptidase 1 | <0.001 | -1.35 |
| 1 | 16011 | Igfbp5 | insulin-like growth factor binding protein 5 | 0.006 | 1.34 |
| -1 | 16193 | Il6 | interleukin 6 | <0.001 | -1.62 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 17384 | Mmp10 | matrix metallopeptidase 10 | 0.002 | -1.35 |
| -1 | 17395 | Mmp9 | matrix metallopeptidase 9 | 0.003 | -1.71 |
| 1 | 18405 | Orm1 | orosomucoid 1 | 0.006 | 1.34 |
| -1 | 68797 | Pdgfrl | platelet-derived growth factor receptor-like | 0.002 | -1.35 |
| 1 | 74116 | Pi16 | peptidase inhibitor 16 | <0.001 | 1.62 |
| 1 | 58809 | Rnase4 | ribonuclease, RNase A family 4 | 0.002 | 1.59 |
| -1 | 20568 | Slpi | secretory leukocyte peptidase inhibitor | <0.001 | -1.43 |
| 1 | 64074 | Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | 0.005 | 1.36 |
| -1 | 20750 | Spp1 | secreted phosphoprotein 1 | <0.001 | -1.51 |
| 1 | 21824 | Thbd | Thrombomodulin | 0.004 | 1.52 |
| 1 | 21826 | Thbs2 | thrombospondin 2 | 0.003 | 1.38 |
| -1 | 243084 | Tmprss11e | transmembrane protease, serine 11e | <0.001 | -1.52 |
| -1 | 53603 | Tslp | thymic stromal lymphopoietin | 0.003 | -1.35 |
| 1 | 240675 | Vwa2 | von Willebrand factor A domain containing 2 | 0.008 | 2.54 |
| -1 | 67701 | Wfdc2 | WAP four-disulfide core domain 2 | 0.001 | -1.7 |

**Tabla 19Lista de genes asociados a espacio extracelular que se encuentran diferencialmente expresados entre los tumores generados por las células 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

A pesar de que en ambos experimentos de microarreglos el término “Región extracelular” es el que presenta mayor número de genes diferencialmente expresados, también posee un número reducidos de genes en común entre los dos experimentos de microarreglos. Este

resultado nos hace pensar que si bien SPARC es un gen clave para la modulación del espacio extracelular, los genes que son regulados por SPARC varían en función del contexto;en otras palabras, SPARC modula la composición del espacio extracelular en función del microambiente en el cuál están creciendo las células tumorales.

Asimismo, en el experimento *in vivo*, las células del estroma tumoral podrían enmascararlas diferencias entre algunos genes de las células 4T1 SCR y Clon 18, que resultarían "diluídos" por la expresión de esos mismos genes por parte del estroma tumoral, posiblemente el responsable de las diferencias encontradas entre ambos experimentos de microarreglos. Sin duda, el aporte del estroma modifica profundamente la ecología tumoral respecto a lo que sucede *in vitro*.

Dentro del término "Función Molecular" (MF), encontramos un importante enriquecimiento en los términos "Unión". Nuevamente encontramos una coincidencia en el enriquecimiento de los términos: "Unión a polisacáridos" y "Unión a glicosaminoglicanos", que también se había observado en los experimentos de microarreglos*in vitro.*Sin embargo, los genes diferencialmente expresados para este término en ambos experimentos no se comparten. Es de destacar de todos modos, que en ambos experimentos la mayoría de los genes de este término se encuentran aumentados en relación a la disminución de la expresión de SPARC, dato que coincide con el efecto anti-adhesivo esperable para SPARC.

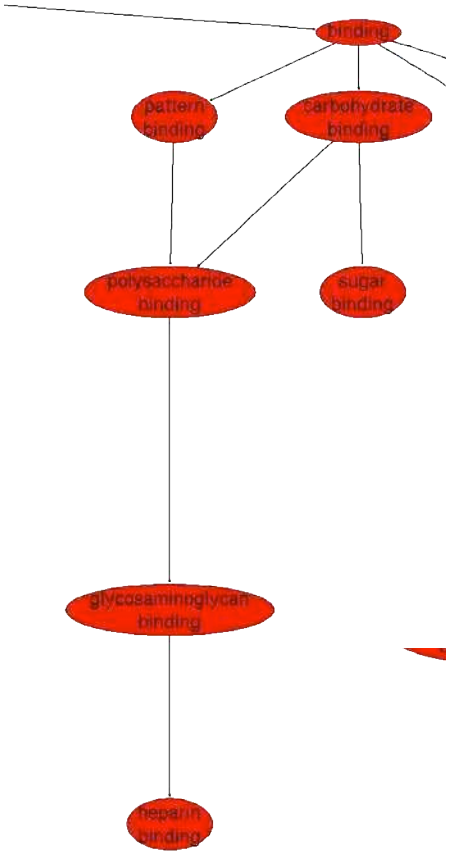



**Figura 65 El análisis ontológico del experimento de microarreglos *in vivo* mostró que la expresión diferencial de SPARC modula numerosos genes relacionados a "patrón de unión".** Región del grafo correspondiente al término Función molecular que contiene los nodos enriquecidos asociados a término más general de "Unión", y en particular a los términos de unión a glicosaminoglicanos y heparina.

| U/D | EntrezID | Name | Description | Pval | FC |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 11816 | Apoe | apolipoprotein E | <0.001 | 1.5 |
| 1 | 13179 | Dcn | Decorin | <0.001 | 1.4 |
| 1 | 21826 | Thbs2 | thrombospondin 2 | 0.003 | 1.4 |
| 1 | 64074 | Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | 0.005 | 1.4 |
| -1 | 14268 | Fn1 | fibronectin 1 | <0.001 | -1.4 |

**Tabla 9 Tabla 6 Lista de genes asociados a unión a glicosaminoglicanos que se encuentran diferencialmente expresados entre los tumores generados por las células 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR.. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-

expresiónen clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

En relación a la función de adhesión, en el experimento de microarreglo *In vivo*, encontramos, dentro del término "Procesos biológicos",enriquecido el término "Regulación positiva de adhesión al sustrato".

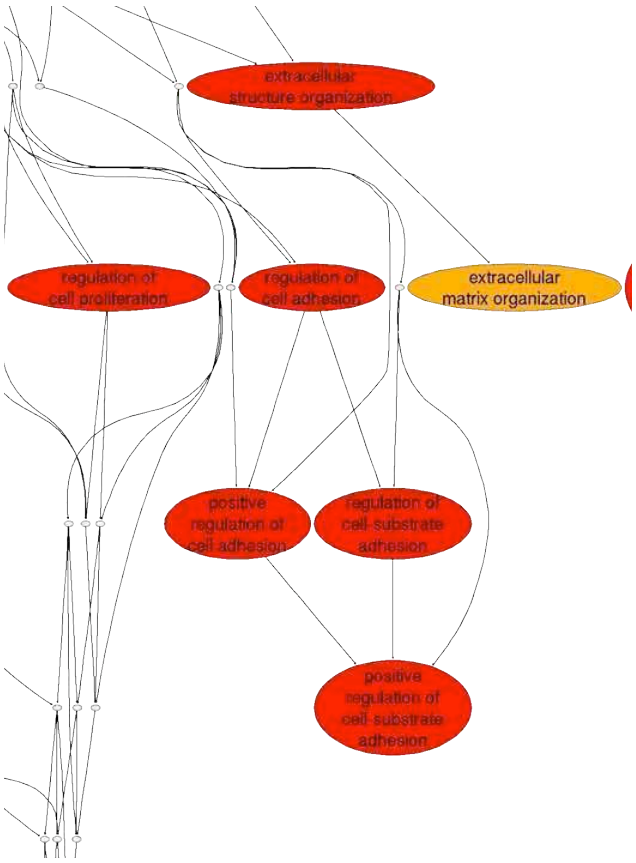



**Figura 66 El análisis ontológico del experimento de microarreglos *in vivo* mostró que la expresión diferencial de SPARC modula genes relacionados a la regulación de la adhesión.** Región del grafo correspondiente al término Procesos biológicos que contiene los nodos enriquecidos asociados a término "Regulación de la adhesión al sustrato".

Este grupo de enriquecimiento también aparecía en el experimentode microarreglo *in vitro*. Sin embargo, en el experimento *in vitro*, todos los genes asociados al término regulación positiva de adhesión al sustrato se encuentran aumentados al disminuir SPARC (Tabla 15), mientras que en el experimento de microarreglo *in vivo,* encontramos dos genes subexpresados y uno sobreexpresado al bajar los niveles de expresión de SPARC. Genes como Fbln2, Thbs-1, CSF-1 y SPOCK-2 del experimento de microarreglo *in vitro* y Smoc2, Col8a1 y

Spp1 del experimento de microarreglo *in vivo*, forman parte del espacio extracelular y regulan diversas funciones como adhesión, migración y proliferación. El hecho de encontrarlas moduladas transcripcionalmente por SPARC en diversos microambientes (*in vitro* e *in vivo*)pone en evidencia una vez más elrol importante que juegaSPARC como remodelador del microambiente celular.

| U/D | EntrezID | Name | Description | P val | FC |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12837 | Col8a1 | collagen, type VIII, alpha 1 | 0.004 | -1.46 |
| 1 | 64074 | Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | 0.005 | 1.36 |
| -1 | 20750 | Spp1 | secreted phosphoprotein 1 | <0.001 | -1.51 |

**Tabla 10 Lista de genes asociados al término regulación positiva de adhesión al sustrato que se encuentran diferencialmente expresados entre los tumores generados por las células 4T1 SCR y Clon 18.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Finalmente, a diferencia de lo que ocurre en el experimento de microarreglo *in vitro* para el término “Procesos Biológicos” donde encontramos un importante enriquecimiento en genes relacionados a la regulación del ciclo celular, en el experimento de microarreglo *in vivo*, encontramos una fuerte regulación del sistema inmune, tanto de la respuesta inflamatoria, como de la respuesta inmune adaptativa. La relevancia de este resultado será abordada en la próxima sección, donde analizaremos la relación de este resultado con la capacidad metastásica de los tumores.

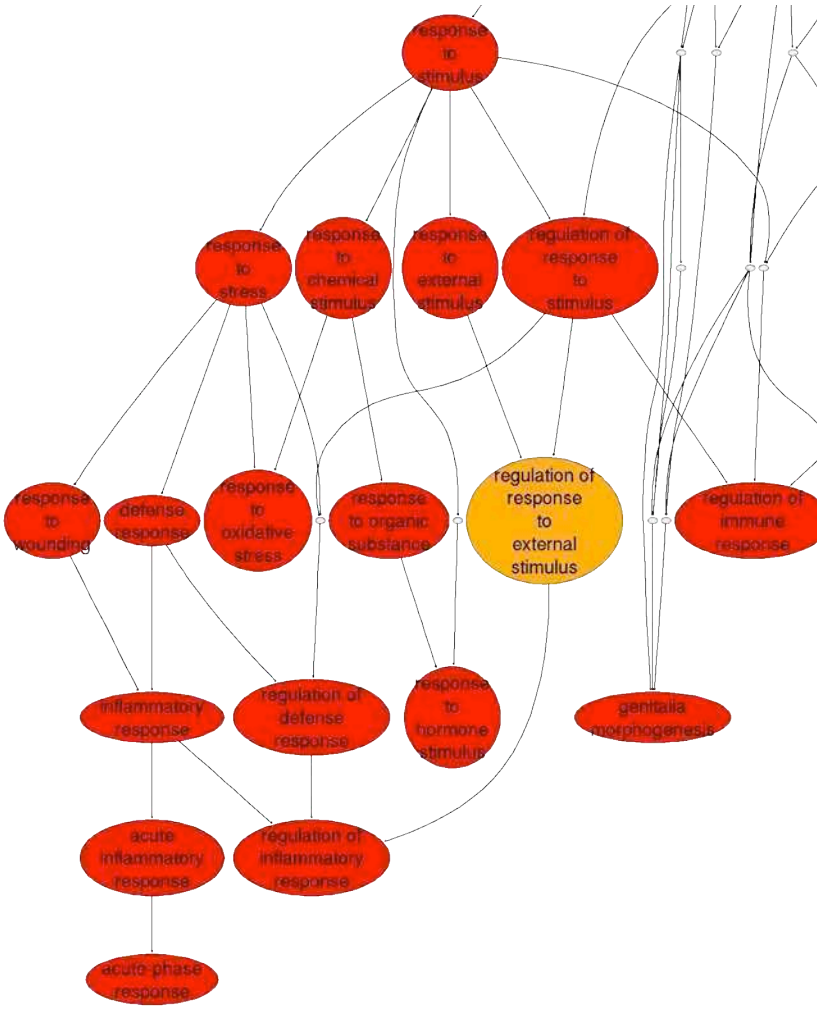



**Figura 67 El análisis ontológico del experimento de microarreglo *in vivo* mostró que la expresión diferencial de SPARC modula numerosos genes relacionados a la respuesta inflamatoria.** Región del grafo correspondiente al término Procesos biológicos que contiene los nodos enriquecidos asociados a término "Respuesta de defensa", "Regulación de respuesta inmune" y "Respuesta inflamatoria".

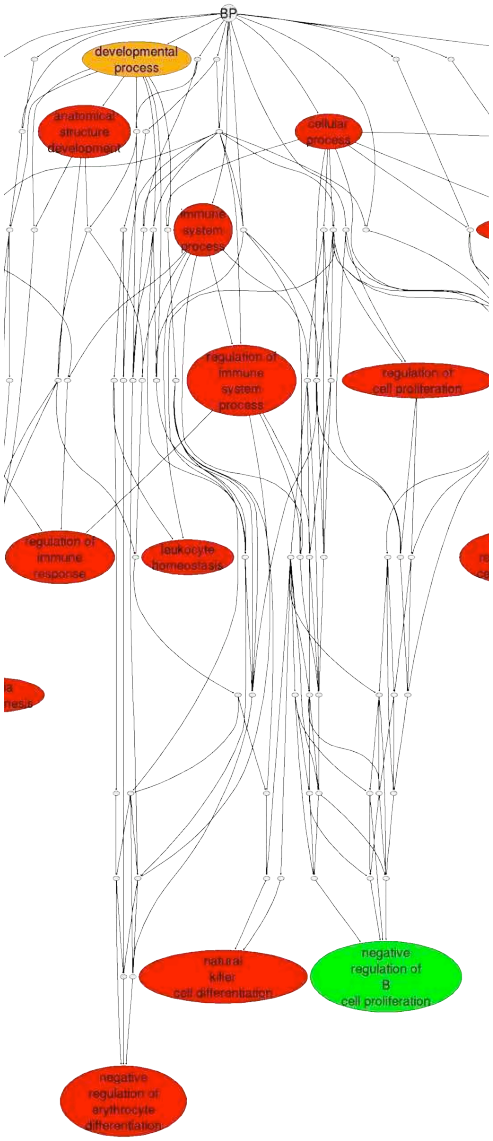



**Figura 68 El análisis ontológico del experimento de microarreglo *in vivo* mostró que la expresión diferencial de SPARC modula genes relacionados a la regulación de la respuesta inmune adaptativa.** Región del grafo correspondiente al término Procesos biológicos que contiene los nodos enriquecidos asociados a término "Procesos del sistema inmune".

Con el objetivo de obtener un reporte funcional acerca de las vías de señalización que se encontraban moduladas diferencialmente en este experimento, realizamos el análisis en DAVID, utilizando la ontología KEGG (Kyoto encyclopedia for genes and genomes, (http://www.genome.jp/kegg/). Encontramos cuatro vías expresadas diferencialmente entre los tumores SCR y clon 18, con un valor de p menor a 0,05: Interacción receptor-matriz

extracelular, vías de señalización en cáncer, adhesión focal y vía de señalización JAK-STAT. (Tabla 20).

| Vías de señalización | Entrez ID | Pval | Up | Down |
|---|---|---|---|---|
| ECM-receptor interaction | 21826, 12833, 20970, 12825, 20750, 14268 | 0.003 | Col6a1, Thbs2, Sdc3, Col3a1 | Spp1, Fn1 |
| Focal adhesion | 18709, 21826, 12833, 12825, 20750, 11855, 14268 | 0.035 | Col6a1, Thbs2, Col3a1 | Arhgap5, Spp1, Pik3r2, Fn1 |
| Jak-STAT signaling pathway | 18709, 19116, 53603, 20851, 16157, 16193 | 0.039 | Il11ra1, Prlr, Stat5b | Tslp, Il6, Pik3r2 |
| Pathways in cancer | 18709, 17395, 12448, 112406, 21414, 12367, 19225, 20851, 14268, 16193 | 0.017 | Stat5b, Tcf7, Egln2 | Casp3, Ccne2, Il6, Ptgs2, Pik3r2, Fn1, Ptgs2, Mmp9 |

**Tabla 20 La modulación de los niveles endógenos de SPARC en el epitelio tumoral genera cambios *in vivo* asociados a la interacción con la matriz extracelular, la generación de tumores y la regulación de la respuesta inflamatoria.** La columna vías de señalización contiene el nombre de las vías enriquecidas a partir de los genes diferenciales entre los tumores Clon 18 y SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna P val contiene el valor p obtenido para esa vía de señalización al comparar los genes diferencialmente expresados entre los tumores Clon 18 y SCR. Las columnas*Up y Down* señalan si el gen identificado se encuentra sobresubexpresado en clon 18 respecto a SCR, y contienen el nombre abreviado del gen.

La interacción con la matriz extracelular y el establecimiento de contactos de adhesión focal son dos procesos claves en la generación del fenotipo metastásico. En las Figura 69 y Figura 70, se muestran las vías completas de interacción con la matriz extracelular y establecimiento de contactos de adhesión focal donde se resaltaron los genes diferencialmente expresados en nuestro experimento.

Como se observa en la Figura 69, la mayoría de los genes de matriz extracelular que señalizan a través de distintos receptores hacia el interior de la célula, son diferencialmente modulados por SPARC. Si analizamos de manera conjunta las figuras mencionadas, vemos que esas interacciones que se establecen con la matriz extracelular están modulando en el interior celular dos moléculas señalizadoras importantes: Arhgap5 (RHOGAP5) y Pi3kr2 (PI3K), que no han sido aún asociados a SPARC. La expresión de ambos genes, relacionados a motilidad celular y sobrevida, tienen menores niveles de expresión en los tumores Clon18 en relación a

los tumores SCR, lo que los convierte en genes interesantes para validar tanto técnica como funcionalmente.

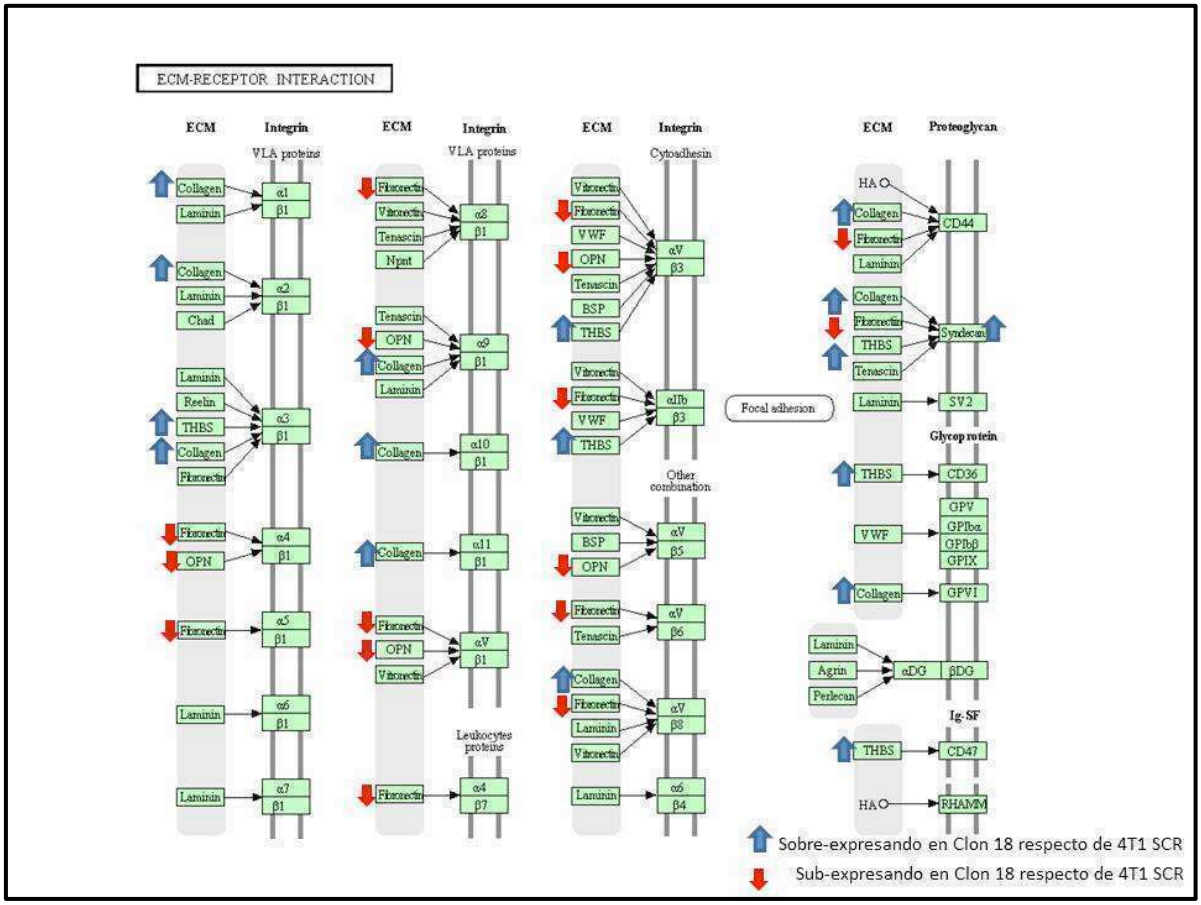



**Figura 69 La modulación en los niveles expresión de SPARC genera importantes cambios en genes asociados a la interacción con la matriz extracelular que posiblemente estén asociado al fenotipo metastásico.** Imagen obtenida de KEGG para la vía de Interacción Receptor-Matriz extracelular. Se marcaron con flechas los genes diferencialmente expresados. El término collagen se refiere a la expresión de colágenos 3 y 6 $\alpha$ 1 (Col3a1 y col6a1); el término THBS hace referencia a la expresión de trombospondina 2 (Thbs2), OPN hace referencia a la expresión de osteopontina (SPP1), Syndecan hace referencia a Sindecan 3 (Sdc3) y fibronectin hace referencia a fibronectina 1 (Fn1)

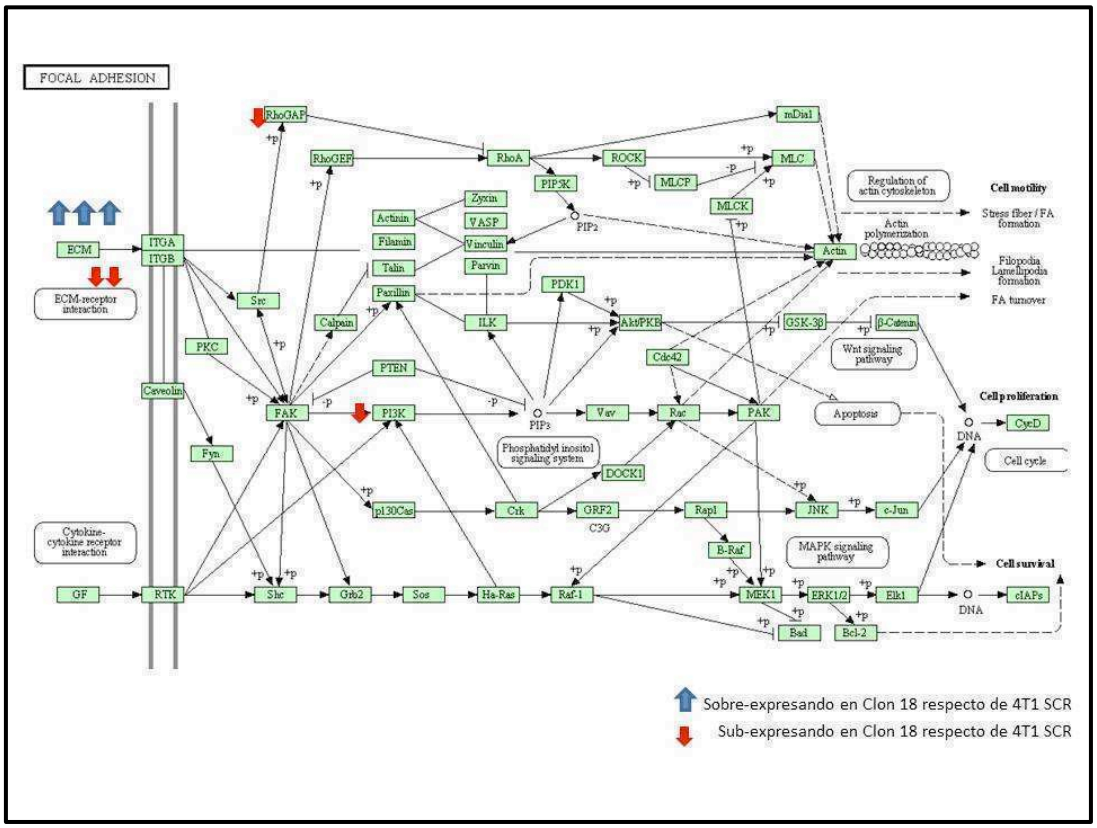



**Figura 70 SPARC modula genes en la matriz extracelular que participan tanto la motilidad de las células, como la proliferación y sobrevida.** Imagen obtenida de KEGG para la vía Adhesión Focal. Se marcaron con flechas los genes diferencialmente expresados. El término collagen se refiere a la expresión de colágenos 3 y 6 $\alpha$ 1 (Col3a1 y col6a1); el término THBS hace referencia a la expresión de trombospondina 2 (Thbs2), OPN hace referencia a la expresión de osteopontina (SPP1), Syndecan hace referencia a Sindecan 3 (Sdc3) y fibronectin hace referencia a fibronectina 1 (Fn1)

La vía de señalización JAK-STAT está íntimamente ligada a proliferación, migración y regulación del sistema inmune, eventos regulados por SPARC en nuestro modelo. Esta vía resulta particularmente relevante en el contexto de los resultados obtenidos en relación a la regulación del sistema inmune.

A modo de resumen de los experimentos de microarreglos mostrados hasta el momento, podemos concluir que en este modelo, SPARC es un gen central en la modulación del espacio extracelular. Entre los genes modulados por SPARC, encontramos tanto genes que regulan la activación de la respuesta inmune, como genes que modulan la capacidad de adhesión de la célula epitelial. En particular, al silenciar SPARC aumenta la expresión de la mayoría de los genes asociados tanto a la adhesión a glicosaminoglicanos como a la adhesión al sustrato.Asimismo, la presencia de SPARC en el espacio extracelular genera un aumento de Spp1 (Osteopontina) y de Fn1 (Fibronectina) que podrían estar señalizando a través de

RHOGAP5 (Arhgap5) para generar cambios en el citoesqueleto de actina que favorecen la migración y diseminación metastásica.

Entre las vías de señalización moduladas diferencialmente a partir de la regulación de SPARC encontramos a: Interacción con la matriz extracelular, Contactos de adhesión focal, y JAK-STAT, las tres asociadas a proliferación, migración y regulación del sistema inmune.

En la próxima sección trataremos de determinar cuáles de los genes modulados por SPARC son de mayor relevancia para la generación del fenotipo metastásico.

**SPARC favorecería la diseminación metastásica a partir de la remodelación de la matriz extracelular, la inhibición de la activación del sistema inmune y la inducción de la apoptosis**

El último de los objetivos propuestos para esta tesis fue identificar aquellos genes que se modulan a partir del cambio en los niveles de expresión de SPARC, que pueden ser responsables de lageneración de un fenotipo metastásico. Para ello utilizamos el mapa de color de laFigura 63, y evaluamos los términos ontológicos a los que pertenecían los genes de los grupos 1 y 3. Los genes presentes en el grupo 1 son aquellos cuyos niveles de expresión bajan al disminuir los niveles de expresión de SPARC, mientras que los genes del grupo 3 son aquellos cuyos niveles de expresión suben al bajar los niveles de expresión de SPARC en el clon 18.

Dentro del término de Procesos biológicos, encontramos un gran número de nodos asociados a la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, así como también de la inducción de apoptosis.

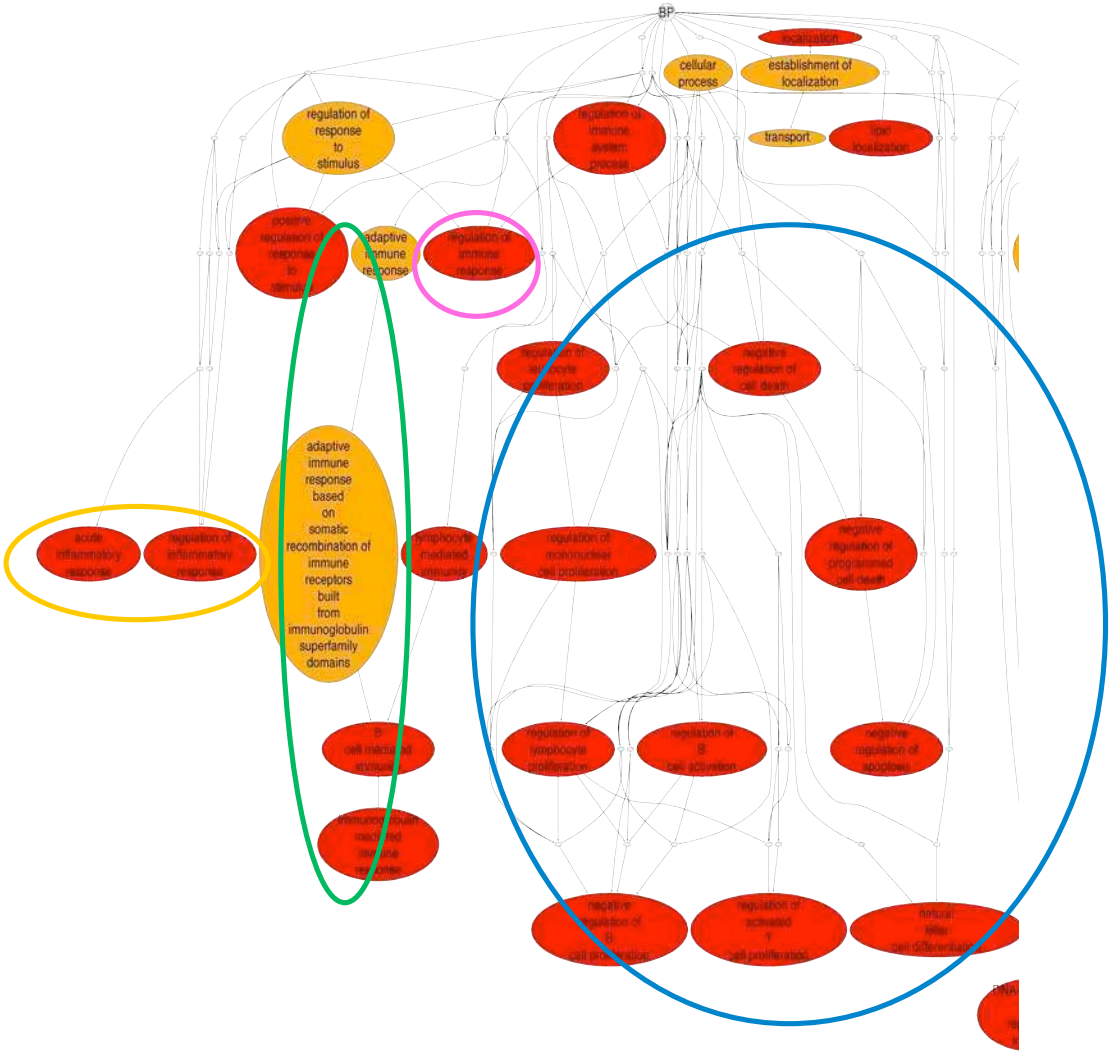



**Figura 71 Entre los términos asociados a expresión de SPARC responsables de las metástasis encontramos una fuerte regulación de la respuesta inmune.** Región del grafo que contiene los términos de Procesos biológicos asociados a la expresión de SPARC en el tumor primario, conservados en las metástasis. En amarillos se señalan los términos asociados a respuesta inflamatoria, en verde se señalan los términos asociados a respuesta inmune adaptativa, en rojo se señala el término regulación de la respuesta inmune y en azul se señalan los términos asociados a regulación de la proliferación de leucocitos y regulación de apoptosis.

Al analizar los genes contenidos en los términos relacionados a la "Respuesta inmune adaptativa" (marcados en verde), que convergen en el término respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas, encontramos que todos ellos aumentan su expresión al bajar los niveles de expresión de SPARC (Figura 71 y Tabla 21). Lo mismo ocurre en los genes contenidos en el término "Regulación de la respuesta inmune", marcado en rosa (Tabla 22)

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 50909 | C1ra | complement component 1, r subcomponent A | 1.5 | 0.006 |
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.56 | 0.002 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, lowaffinity IIb. | 1.45 | 0.001 |

**Tabla 21 La disminución en los niveles de expresión de SPARC en el epitelio, genera un aumento en los niveles de expresión de genes asociado a la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por 4T1 SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.563 | 0.002 |
| 1 | 50909 | C1ra | complement component 1, r subcomponent A | 1.498 | 0.006 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |

**Tabla 22La disminución en los niveles de expresión de SPARC en el epitelio, genera un aumento en los niveles de expresión de genes asociado a la regulación de la respuesta inmune.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Una rama sumamente interesante para analizar es la marcada en azul en la Figura 71, que contiene genes relacionados con la regulación del sistema inmune, e incluye los términos relacionados a la activación y proliferación de linfocitos B y T. Por el otra parte agrupa genes relacionados a la regulación negativa de la apoptosis.

Dentro delos términos “regulación de procesos del sistema inmune,”(Tabla 23) “Regulación de la proliferación de células mononucleares” (Tabla 24), “Regulación de la proliferación de linfocitos T activados” (Tabla 25) y “Regulación negativa de la proliferación de linfocitos B” (Tabla 26), todos los genes están sobrexpresados en el Clon18, salvo Casp3. Asimismo, los genes que son importantes en la regulación de la apoptosis están subexpresados (Tabla 27), lo que nos lleva a proponer que al bajar los niveles de expresión de SPARC, los cambios generados en el microambiente tumoral generan la activación de linfocitos B y T y la evasión de la apoptosis, inhibiendo así el crecimiento del tumor y la generación de las metástasis. Los genes candidatos a generar este efecto son: **Stat5b, Fcgr2b y Casp 3.**

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.563 | 0.002 |
| 1 | 50909 | C1ra | complement component 1, r subcomponent A | 1.498 | 0.006 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |
| 1 | 18405 | Orm1 | orosomucoid 1 | 1.343 | 0.006 |
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |

**Tabla 23 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la activación del sistema inmune y a la evasión de la apoptosis.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |

**Tabla 24La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la proliferación de células mononucleares y a la evasión de la apoptosis.**La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05.

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |

**Tabla 25 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la a regulación de la activación de linfocitos T y a la evasión de la apoptosis.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR.. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |

**Tabla 26 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la a regulación negativa de la proliferación de linfocitos B y a la evasión de la apoptosis.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | Entre zID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |
| -1 | 20750 | Spp1 | secreted phosphoprotein 1 | -1.512 | <0.001 |
| 1 | 56369 | Apip | APAF1 interacting protein | 1.409 | 0.006 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |
| 1 | 16871 | Lhx3 | LIM homeobox protein 3 | 1.389 | <0.001 |

**Tabla 27La disminución en los niveles de expresión de SPARC regula genes asociados a los términos** "Regulación negativa de la muerte celular" Regulación negativa de la muerte celular programada" y "Regulación negativa de la apoptosis"**.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

En relación a la disminución en los niveles de expresión de SPARC y la activación del sistema inmune, encontramos en los tumores Clon 18 un aumento de genes relacionados a la "activación de genes de respuesta inflamatoria aguda"(Tabla 28) y "activación de la respuesta inflamatoria"(Tabla 29), lo que apoya la idea de que, durante el crecimiento tumoral, SPARC genera señales antiinflamatorias que facilitan tanto el crecimiento de los tumores como la diseminación metastásica.

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 18405 | Orm1 | Orosomucoid 1 | 1.343 | 0.006 |
| 1 | 50909 | C1ra | complement component 1, r subcomponent A | 1.498 | 0.006 |
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.563 | 0.002 |

**Tabla 28La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta inflamatoria aguda.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto

al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 11770 | Fabp4 | fatty acid binding protein 4, adipocyte | 2.018 | 0.004 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |
| 1 | 20851 | Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | 1.354 | <0.001 |

**Tabla 29 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta inflamatoria.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR, expresados como el logaritmo en base dos del cociente entre el nivel de expresión en clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

El análisis de los términos asociados a “Función molecular” (MF),reveló que los genes asociados a “unión a carbohidratos” (Tabla 30), “unión a factores de crecimiento” (Tabla 31) y “actividad peptidasa” (Tabla 32), también están asociados a la capacidad de metástasis.Al igual que como ocurría en los análisis previos, encontramos que la disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de la mayoría de los genes asociados a unión a carbohidratosy a factores de crecimiento. Cuando analizamos los niveles de expresión asociadas a “actividad peptidasa” encontramos genes que se encuentran tanto sobre como subexpresados al modular SPARC. Es de destacar que dentro de esta tabla se encuentra Slpi, gen que alcanza el mayor grado de inhibición de la expresión al modular SPARC. Slpi, se encuentra sobrexpresado en cáncer de pulmón, ovario y gástrico. En particular se reportó que su expresión en cáncer gástrico promueve el fenotipo metastásico a partir de un aumento en la expresión de MMP-2 y MMP9 (Choi et al., 2001).Del mismo modo, se reportó un resultado similar en cáncer de ovario, donde Slpi induce paracrinamente la expresión de MMP9, favoreciendo así el comportamiento invasivo de las células (Hoskins et al., 2011).Esta evidencia nos lleva a proponer que la disminución en los niveles de SPARC concomitantemente con la disminución en la expresión de Slpi podría estar inhibiendo el fenotipo metastático en este modelo a partir del silenciamiento de MMP9.

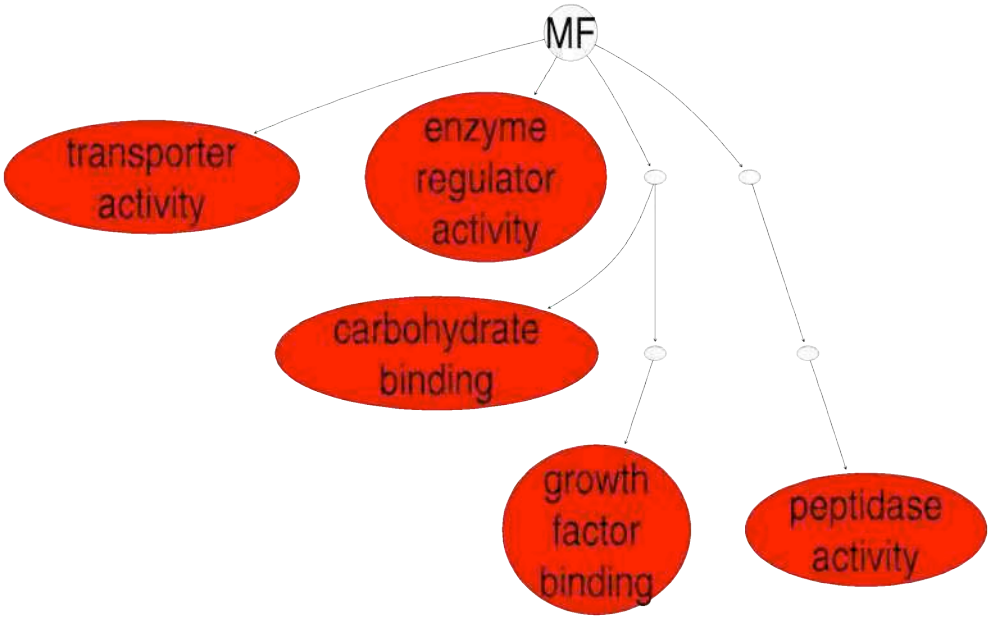



**Figura 72 La expresión de genes asociados a "unión" son relevantes para el efecto de SPARC en la generación de metástasis.** Grafo completo que contiene los términos de "Funciones moleculares" asociados a la modulación de SPARC conservados en las metástasis.

| U/D | Entrez ID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| -1 | 14425 | Galnt3 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 | -1.342 | 0.002 |
| 1 | 216864 | Mgl2 | macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2 | 1.337 | 0.005 |
| 1 | 11816 | Apoe | apolipoprotein E | 1.498 | <0.001 |
| 1 | 170779 | Cd209d | CD209d antigen | 1.411 | 0.001 |
| 1 | 64074 | Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | 1.362 | 0.005 |

**Tabla 30 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de la mayoría de los genes relacionados a la unión a carbohidratos.** La columna U/D señala si el gen identificado se encuentra sobre o sub expresado. Si el valor es positivo, el gen se encuentra sobrexpresado, y si es negativo se encuentra subexpresado en el clon 18. La columna EntrezID señala el número de identificación del gen, la columna name indica el nombre del gen, la columna Description señala el nombre completo del gen. La columna FC contiene las veces de cambio (fold change) en los niveles de expresión de los genes, entre el SCR y el clon 18, y la columna P val indica el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización de la tabla se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.0

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 16157 | Il11ra1 | interleukin 11 receptor, alpha chain 1 | 1.356 | 0.005 |
| 1 | 12833 | Col6a1 | collagen, type VI, alpha 1 | 1.335 | 0.003 |
| 1 | 16011 | Igfbp5 | insulin-like growth factor binding protein 5 | 1.346 | 0.006 |

**Tabla 31 La disminución en los niveles de expresión de SPARC genera un aumento en los niveles de expresión de los genes relacionados a la unión a factores de crecimiento.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.563 | 0.002 |
| 1 | 50909 | C1ra | complement component 1, r subcomponent A | 1.498 | 0.006 |
| 1 | 14590 | Ggh | gamma-glutamyl hydrolase | 1.358 | 0.002 |
| -1 | 243084 | Tmprss11e | transmembrane protease, serine 11e | -1.526 | <0.001 |
| -1 | 11490 | Adam15 | a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin) | -1.573 | 0.002 |
| -1 | 12367 | Casp3 | caspase 3 | -1.606 | <0.001 |
| -1 | 20568 | Slpi | secretory leukocyte peptidase inhibitor | -2.696 | <0.001 |

**Tabla 32 La disminución en los niveles de expresión de SPARC modula la expresión de genes con actividad peptidasa.** La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR, expresados como el logaritmo en base dos del cociente entre el nivel de expresión en clon 18 y el SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

En el marco de este análisis, el término “espacio extracelular” fue también el que mayor número de genes modulados por SPARC presentó (Tabla 33)

| U/D | EntrezID | Name | Description | FC | Pval |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 58809 | Rnase4 | ribonuclease, RNase A family 4 | 1.618 | 0.002 |
| 1 | 74116 | Pi16 | peptidase inhibitor 16 | 1.594 | <0.001 |
| 1 | 14962 | Cfb | complement factor B | 1.563 | 0.002 |
| 1 | 11816 | Apoe | apolipoprotein E | 1.498 | <0.001 |
| 1 | 14130 | Fcgr2b | Fc receptor, IgG, low affinity IIb | 1.456 | 0.001 |
| 1 | 56429 | Dpt | Dermatopontin | 1.421 | 0.001 |
| 1 | 64074 | Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | 1.362 | 0.005 |
| 1 | 14590 | Ggh | gamma-glutamyl hydrolase | 1.358 | 0.002 |
| 1 | 16011 | Igfbp5 | insulin-like growth factor binding protein 5 | 1.346 | 0.006 |
| 1 | 18405 | Orm1 | orosomucoid 1 | 1.343 | 0.006 |
| 1 | 12833 | Col6a1 | collagen, type VI, alpha 1 | 1.335 | 0.003 |
| -1 | 20568 | Slpi | secretory leukocyte peptidase inhibitor | -2.696 | <0.001 |
| -1 | 11490 | Adam15 | a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin) | -1.573 | 0.002 |
| -1 | 243084 | Tmprss11e | transmembrane protease, serine 11e | -1.526 | <0.001 |
| -1 | 20750 | Spp1 | secreted phosphoprotein 1 | -1.512 | <0.001 |
| -1 | 11600 | Angpt1 | angiopoietin 1 | -1.465 | <0.001 |
| -1 | 53603 | Tslp | thymic stromal lymphopoietin | -1.352 | 0.003 |

**Tabla 33 La disminución en los niveles de expresión de SPARC modula numerosos del espacio extracelular.**La columna *U/D* señala si el gen identificado se encuentra sobre (1) o sub expresado (-1) en clon 18 respecto a SCR.. La columna *EntrezID* contiene el número de identificación del gen en la base de datos de NCBI; la columna *name*, contiene el nombre abreviado del gen; la columna *Description*, contiene el nombre completo del gen. La columna *FC* contiene las veces de cambio (*fold change*) en los niveles de expresión de los genes entre el tumor de clon 18 y el de SCR. Un valor positivo en esta columna indica que el gen está sobrexpresado en el tumor de clon 18, y un valor negativo indica sub-expresión en clon 18 respecto al tumor generado por SCR. La columna P val contiene el valor p obtenido para ese gen al hacer la comparación entre los niveles de expresión presentes en el clon 18 en comparación con la línea 4T1 SCR, utilizando un modelo estadístico lineal. Para la realización del análisis de enriquecimiento se seleccionaron aquellos genes con un valor p menor a 0.05

Como análisis final de este grupo de genes, decidimos evaluar cuál era el mínimo número de genes modulados por SPARC que permitía al mismo tiempo diferenciar los tumores primarios SCR y Clon 18 y agrupar los tumores SCR y metástasis. Para ello realizamos un análisis de agrupamiento no supervisado que incluyó los genes con un cambio de expresión de 0,3 veces respecto de la referencia utilizada (expresada en $Log_2$), y con un valor de p menor a 0,001. A partir de estos parámetros se generó un mapa de color que contiene a los 22 genes que

tempranamente podrían definir la agresividad tumoral (Figura 73). La validación de la utilidad de esta firma en la clínica médica escapa a los objetivos de esta tesis, pero abre una línea importante de trabajo aplicado a partir de este proyecto. A fin de profundizar acerca de la posible relación funcional entre los genes pertenecientes a esta firma temprana para la predicción del fenotipo metastásico en el tumor primario, realizamos una búsqueda en GENEMANIA (http://genemania.org). Como se muestra en la Figura 74, existen interacciones físicas entre varios de los genes encontrados (conectados por líneas violetas), donde sobresale FN1(fibronectina) como molécula conectora entre ellos. Aunque para muchos de estos genes no hay funciones biológicas anotadas en GO (Gene Ontology), varios de ellos forman parte del espacio extracelular (marcados en rosa). Asimismo, Angpt1, FN1 y CD34 participan de la migración de leucocitos. Cabe mencionar que el análisis en GENEMANIA, que permite asignar funciones por asociaciones reportadas entre genes, incluyó genes que han sido diferencialmente encontrados en los experimentos de microarreglos, como C3 o Pcolce, que resultaron diferenciales en el experimento *in vitro* o como col6a1 y col3a1, diferencialmente expresados en el experimento *in vivo*, lo que da cierta solidez a los datos obtenidos.

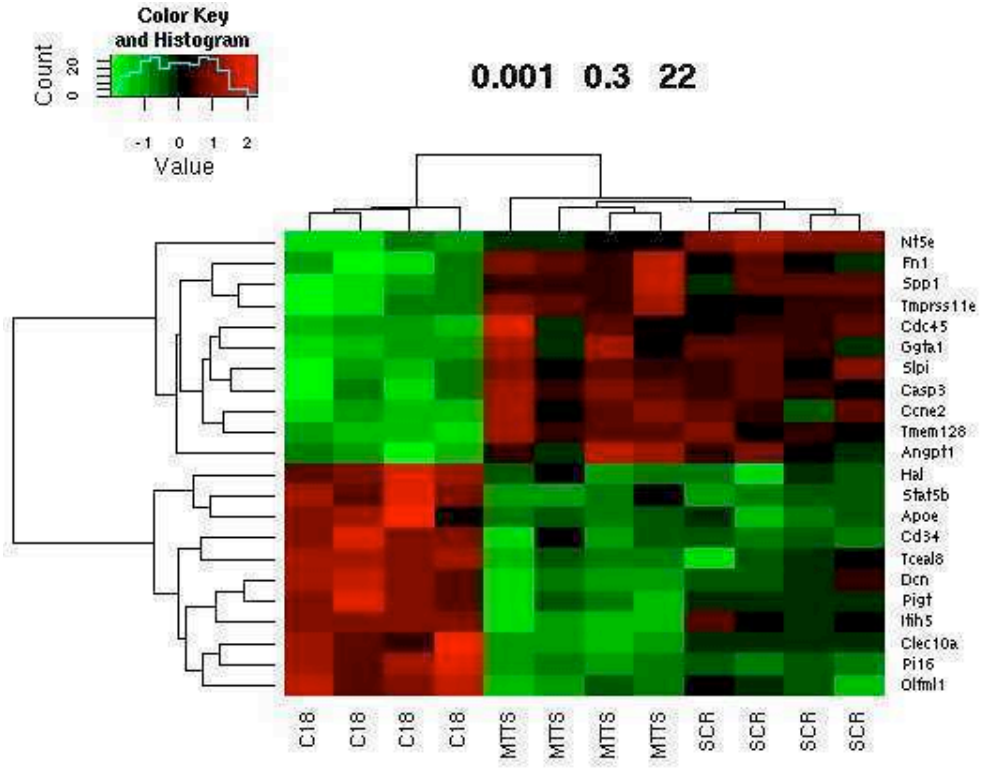



**Figura 73 Las diferencias fenotípicas observadas entre los tumores 4T1 SCR y clon 18 y las semejanzas entre el tumor 4T1 SCR y su metástasis axilar pueden ser explicadas por la expresión diferencial de 22 genes.**Mapa de

color que contiene el número mínimo de genes que permiten discriminar las tres muestras analizadas. Los valores de corte para realizar la segregación fueron un valor P de 0.001 y 0.3 veces de cambio en $log_2$.

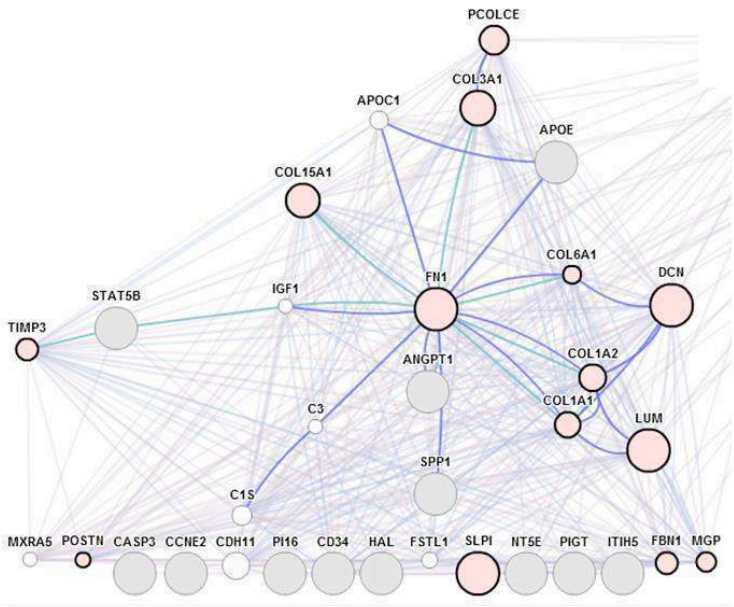



**Figura 74La fibronectina actúa como molécula mediadora de las interacciones entre algunos de los genes de firma molecular mínima que caracteriza las diferencias asociadas a la modulación de SPARC.**Imagen obtenida del análisis en GENEMANIA a fin de establecer la función de los genes señalados como más relevantes asociados a los cambios de expresión de SPARC. En círculos grises se señalan los genes de la firma mínima. Los círculos rosa marcan los genes asociados a la matriz extracelular. Las líneas conectoras celestes hacen referencia a co-localizaciones. Las líneas conectoras violetas hacen referencia a interacciones físicas y las líneas conectoras grises hacen referencia a co-expresiones reportadas.

## Metaanálisis de los resultados

La utilización de tecnologías de alto rendimiento como la genómica y la proteómica han revolucionado la forma en la cual se estudian diferentes patologías. En el área de biología tumoral en particular, se generaron cientos de firmas entre las que se destacan: las firmas que caracterizan diversos tipos de cáncer de mama, lasque contienen genes que permiten predecir la evolución de la enfermedad,las que predicen la respuesta al tratamiento y firmas de genes asociados a la aparición de metástasis.

Como última etapa de esta tesis, seleccionamos un grupo de estas firmas asociadas a: genes de **estroma** en cáncer de mama, genes de **respuesta inmune** y genes de **metástasis** y las comparamos con dos listas de genes diferencialmente expresados en nuestro microarreglo *in vivo*. Una de las listas, que denominamos **genes de expresión temprana**, contiene los genes diferencialmente expresados entre los tumores 4T1 SCR vs Clon 18 a las 48 h

postinyección,que se mantienen en la metástasis luego de 30 días de haber inoculado el tumor primario (97 genes pertenecientes a los grupos 1 y 3 del mapa de color de la Figura 63). Estos genes asociados a los niveles de expresión de SPARC en el tumor primario a tiempos tempranos post inyección, se mantienen en la metástasis a tiempos tardíos, y pueden ser considerados marcadores tempranos de la aparición de metástasis. La otra lista, que denominamos **genes de virulencia metastásica**, contiene los genes diferencialmente expresados entre el tumor SCR y su metástasis pulmonar (483 genes, ver anexo). Esta última lista que no ha sido mencionada previamente, contiene genes que no están necesariamente asociados a la expresión de SPARC, pero que favorecen la colonización del pulmón y desarrollo de las metástasis.

A. Firmas de estroma

Dado que los tumores analizados no sólo están compuestos por células epiteliales, realizamos un análisis utilizando los 216 genes expresados diferencialmente entre los tumores SCR y clon 18, para evaluar cuáles de ellos podían estar siendo expresados por células estromales. A tal fin, tomamos 6 firmas moleculares de genes expresados por el estroma tumoral: (Beck et al., 2008); (Bergamaschi et al., 2008);(Farmer et al., 2009); (Finak et al., 2008); (Finocchiaro et al., 2007) y (West et al., 2005) (todos ellos, salvo Finocchiaro,asociados a cáncer de mama) y seleccionamos aquellos genes compartidos con nuestro análisis. Los 15 genes diferencialmente expresados a partir de la modulación de SPARC en el epitelio que han sido asociados a una o más firmas de genes estromales, se muestran en la Tabla 34

| | | **Beck (66)** | **Bergamaschi (102)** | **Farmer (50)** | **Finak (26)** | **Finocchiaro (10)** | **West (42)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Slpi | secretory leukocyte peptidase inhibitor | | | | | | |
| Spp1 | secreted phosphoprotein 1 | | | | | | |
| Pdgfrl | platelet-derived growth factor receptor-like | | | | | | |
| Plod2 | procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | | | | | | |
| Col8a1 | collagen, type VIII, alpha 1 | | | | | | |
| Htra1 | HtrA serine peptidase 1 | | | | | | |
| Fn1 | fibronectin 1 | | | | | | |
| Mmp9 | matrix metallopeptidase 9 | | | | | | |
| Dcn | Decorin | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Col6a1 | collagen, type VI, alpha 1 | | | | | | |
| Thbs2 | thrombospondin 2 | | | | | | |
| Stat5b | signal transducer and activator of transcription 5B | | | | | | |
| C1ra | complement component 1, r subcomponent A | | | | | | |
| Smoc2 | SPARC related modular calcium binding 2 | | | | | | |
| Col3a1 | collagen, type III, alpha 1 | | | | | | |

**Tabla 34 Muchos de los genes diferencialmente expresados entre los tumores 4T1 SCR y clon 18 asociados a firmas de estroma pertenecen al espacio extracelular.** Las filas corresponden a los genes compartidos entre las firmas moleculares de estroma y nuestro experimento de microarreglo *in vivo*. Las columnas contienen los trabajos de los cuales se obtuvieron las firmas de estroma. Cada color corresponde a un trabajo,identificado por el apellido del primer autor. Entre paréntesis figura el número de genes pertenecientes a la firma contra la cual se comparó nuestra lista de genes. Se remarcaron en amarillo los genes encontrados en nuestra firma mínima.

Dos aspectos resultan relevantes de los resultados obtenidos en esta tabla, el primero es que de los genes diferencialmente expresados entre los tumores primarios SCR y clon 18, un número importante de genes asociados al estroma tumoral pertenecen a la matriz extracelular, sugiriendo que el hecho de encontrar diferentes genesasociados al termino ontológico espacio extracelular entre los experimentos de microarreglos *in vitro* e *in vivo*, puede atribuirse al aporte de células estromales. Al mismo tiempo, cabe destacar que de los 16 genes previamente asociados a células estromales en muestras de pacientes, 5 genes pertenecen a nuestra firma mínima de genes tempranos en el tumor primario que se mantienen en la metástasis, resaltando la relevancia de la contribución del estroma al fenotipo metastásico.

El hecho de haber encontrado más de un gen diferencialmente expresado en nuestro modelo asociado a más de un trabajo donde se utilizaron muestras humanas, valida el uso de nuestro sistema como modelo relevante para el estudio de la enfermedad humana.

B- Firmas de respuesta inmune.

A pesar de que los tumores de mama están generalmente infiltrados o rodeados por células del sistema inmune, es difícil establecer a ciencia cierta cuál es el rol de ese infiltrado en lapromoción o inhibición de la progresión tumoral. Asimismo, las firmas moleculares que evalúan la expresión de genes estromales como predictores de la evolución clínica, dejan de lado los genes expresados por las células del sistema inmune (Finak et al., 2008). En nuestro

experimento de microarreglo *in vivo,*encontramos,asociados a la expresión de SPARC en el tumor primario que se mantienen en las metástasis, un gran número de términos ontológicos asociados a la respuesta inmune. En este sentido, bibliografía reciente vuelve a poner el foco en las células del sistema inmune para tratar de determinar la función que cumple este tipo celular durante el crecimiento del tumor. Fue por ello que tomamos 4 trabajos(Rody et al., 2009);(Ascierto et al., 2011); (Worschech et al., 2008); (Perrot-Applanat et al., 2011), que contienen firmas de respuesta inmune en cáncer de mama, para compararlos con nuestras firmas de respuesta temprana(Tabla 35) y de virulencia metastásica(Tabla 36).

| | | Rody (199 genes) | Ascierto (299 genes) |
|---|---|---|---|
| Apoe | apolipoprotein E | | |
| Slco2b1 | solute carrier organic anion transporter family, member 2b1 | | |

**Tabla 35 Lista de genes de expresión temprana presentes en firmas de respuesta inmune.** Las columnas coloreadas contienen el apellido del primer autor del trabajo analizado y entre paréntesis figura el número de genes contenido dicha firma. En las filas están los dos genes de expresión temprana compartidos. Se resaltó en amarillo Apoe porque es uno de los genes pertenecientes a la firma mínima.

| | | Ascierto (299 genes) | Worschech (47 genes) | Perrot-Applanat, (55 genes) | Rody (199 genes) |
|---|---|---|---|---|---|
| Casp1 | caspase 1 | | | | |
| Clec4a1 | C-type lectin domain family 4, member a1 | | | | clec4a |
| Csf2rb1 | colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity (granulocyte-macrophage) | | | | CSF2RB |
| Ctsc | cathepsin C | | | | |
| Cxcl10 | chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | | | | |
| Cxcl11 | chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | | | | |
| Cxcl9 | chemokine (C-X-C motif) ligand 9 | | | | |
| Cybb | cytochrome b-245, beta polypeptide | | | | |
| Gzmb | granzyme B | | | | |
| Igh-1a | immunoglobulin heavy chain 1a (serum IgG2a) | | | | Igh |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Igj | immunoglobulin joining chain | | | | |
| Igl-V1 | immunoglobulin lambda chain, variable 1 | | | | iglv6-57 |
| Il6 | interleukin 6 | | | | |
| Irf1 | interferon regulatory factor 1 | | | | |
| Lyzs | Lysozyme | | | | LYZ |
| Ncf1 | neutrophil cytosolic factor 1 | | | | |
| Prkcb1 | protein kinase C, beta 1 | | | | |
| Psmb9 | proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2) | | | | |
| Ptprc | protein tyrosine phosphatase, receptor type, C | | | | |
| Samsn1 | SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1 | | | | |
| Stat1 | signal transducer and activator of transcription 1 | | | | |
| Tagap1 | T-cell activation GTPase activating protein 1 | | | | |
| Tnfsf13b | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | | | | |
| Ubd | ubiquitin D | | | | |

**Tabla 36 Lista de genes de virulencia metastásica presentes en firmas de respuesta inmune.** Las columnas contienen los apellidos del primer autor de los 4 trabajos analizados, entre paréntesis figura el número de genes presentes en la lista contra la cual se realizó la comparación. Las filas contienen los genes compartidos.En la columna correspondiente a Rody, no se encontraron genes con la misma nomenclatura, sino que se encontraron genes muy similares pertenecientes a la subfamilia, en cada casillero se escribió el símbolo del gen encontrado en el trabajo.

De este análisis resulta llamativo, que hayamos encontrado sólo dos genes de expresión temprana previamente reportados. Sin embargo, el hecho de haber encontrado **Apoe**, gen de respuesta de linfocitos T hallado en la firma mínima mostrada en la Figura 73,resalta la importancia de este gen para su posterior validación. En nuestro modelo, este gen se encuentra aumentado en el tumor Clon 18 y fue encontrado diferencialmente aumentado en pacientes libres de enfermedad luego de 7 años versus pacientes con recurrencia dentro de los 5 años posteriores al tratamiento (Ascierto et al., 2011).

Por el contrario, encontramos que un gran número de genes de virulencia metastásica pertenecen a firmas de genes de respuesta inmune. En particular, se comparten un gran número de genes con el trabajo de Ascierto y colaboradores (Ascierto et al., 2011), que

contiene genes asociados a la recurrencia de la enfermedad. Estos resultados, nuevamente dan validez a nuestro modelo y renuevan la necesidad de ahondar en el estudio de genes asociados de respuesta inmune como factores pronóstico de la enfermedad.

C- Genes de metástasis

A pesar de los grandes avances realizados en la comprensión y tratamiento del cáncer de mama, el cáncer de mama metastático sigue siendo una enfermedad incurable. Este hecho renueva la necesidad de generar modelos que permitan una mayor comprensión de la enfermedad, y faciliten el desarrollo de tratamientos más efectivos.

El último análisis que realizamos con los resultados del microarreglo *in vivo*, fue la comparación de los genes de respuesta temprana y de virulencia metastásica, con firmas de genes asociados al fenotipo metastático en general (Van´t Veer, 2002); (Ramaswamy et al., 2003), con firmas de genes asociados a metástasis pulmonares (Minn et al., 2005) y con firmas genes asociados a metástasis óseas (Eckhardt et al., 2005; Kang et al., 2003). LasTabla 37 y Tabla 38 resumen las coincidencias encontradas.

| | | Van´t Veer | Ramaswamy | Eckhardt |
|---|---|---|---|---|
| Gene | Description | 70 genes | 17 genes | 125 genes |
| Ccne2 | cyclin E2 | | | |
| Col6a1 | collagen, type VI, alpha 1 | | | |
| Ect2 | ect2 oncogene | | | |
| Galnt3 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 | | | |
| Hnrnpa1 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | | | |
| Igfbp5 | insulin-like growth factor binding protein 5 | | | |
| Mmp9 | Matrix metalloprotease 9 | | | |
| Slc12a2 | solute carrier family 12, member 2 | | | |
| Sqrdl | sulfide quinone reductase-like (yeast) | | | |

**Tabla 37 Lista de genes de expresión temprana presentes en firmas de metástasis.** Las columnas contienen el apellido del primer autor del trabajo que contiene la firma contra la que se compraron nuestros resultados. Debajo de cada apellido aparece el número de genes contenidos en la firma. En las columnas se listan los genes compartidos con uno más de los trabajos evaluados.

| | | Van´t Veer | Ramaswamy | Minn | Kang | Eckhardt |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gene | Description | 70 genes | 17 genes | 16 genes | 127 genes | 125 genes |
| Ccng2 | cyclin G2 | | | | | |
| Cnn1 | calponin 1 | | | | | |
| Col1a2 | procollagen, type I, alpha 2 | | | | | |
| Mcm6 | minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae) | | | | | |
| Mglap | matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein | | | | | |
| Ncf2 | neutrophil cytosolic factor 2 | | | | | |
| Ptgs2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 | | | | | |
| Sars1 | seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1 | | | | | |
| Sox4 | ::SRY-box containing gene 4 | | | | | |

**Tabla 38 Lista de genes virulencia metastásica presentes en firmas de metástasis.** Las columnas contienen el apellido del primer autor del trabajo que contiene la firma contra la que se compraron nuestros resultados. Debajo de cada apellido aparece el número de genes contenidos en la firma. En las columnas se listan los genes compartidos con uno más de los trabajos evaluados.

Entre los genes de expresión temprana encontramos Ccne2, otro de los genes de la firma mínima mostrada en la Figura 73, Ect2 y MMmp9. Estos genessubexpresados en el tumor Clon 18 ha sido encontrados significativamente aumentados en firmas de mal pronóstico (van 't Veer et al., 2002).

Finalmente resulta interesante mencionar que el trabajo con el que se comparten más genes, tanto de respuesta temprana como de virulencia, es el de Eckchardt y colaboradores (Eckhardt et al., 2005).Si bien en este trabajo se estudiaron los genes asociados a la aparición de metástasis óseas, utilizaron el mismo modelo de 4T1 que utilizamos en nuestro análisis. Estos datos muestran una vez más la relevancia clínica de este modelo para el estudio de metástasis

espontáneas, y permite suponer que hay genes asociados al fenotipo metastásico (probablemente asociados a las primeras etapas de la cascada) que se expresan independientemente del órgano blanco.

# Discusión

Durante la evolución del carcinoma mamario, la transformación sufrida por el epitelio de los ductos o los lobulillos de la glándula mamaria va acompañada por un aumento de células estromales que incluye: leucocitos, miofibroblastos, fibroblastos y endotelio. El resultado de la interacción que se establece entre células epiteliales entre sí y entre células epiteliales y células estromales, irá modificando el entorno en el cuál se está generando el tumor, que eventualmente progresará hacia un carcinoma invasivo y metastásico.

Dado que SPARC una proteína de la matriz extracelular clave en la remodelación del espacio extracelular y la comunicación intercelular, a lo largo de esta tesis intentamos profundizar el conocimiento de los efectos de la proteína secretada por el epitelio o por el estroma tumoral durante la formación del cáncer de mama, abordando así algunas de las controversias reportadas en la literatura acerca de la participación de esta proteína en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

## *Capítulo I: Búsqueda de modelos y generación de herramientas para evaluar el rol de SPARC en cáncer de mama*

Durante la primera parte de esta tesis nos dedicamos a la búsqueda de modelos apropiados para poner a prueba nuestras hipótesis. Si bien en la literatura hay numerosos trabajos que asocian la expresión de SPARC a un fenotipo de cáncer de mama más agresivo, los mecanismos moleculares a través de los cuáles SPARC está ejerciendo esta función no han sido completamente dilucidados. Los trabajos reportados hasta el momento de iniciar esta tesis que relacionaban a SPARC con la progresión del cáncer de mama, se basaban en la sobreexpresión de SPARC mediante diversas técnicas de ingeniería genética (Dhanesuan, 2002; Koblinski, 2005; Minn, 2005; Briggs, 2002). Este modelo experimental presenta la limitación de que, al SPARC una proteína que presumiblemente acompaña los cambios que ocurren durante la transformación maligna de células epiteliales, la sobreexpresión de la misma una vez que las células ya sufrieron dicha transformación, puede no activar los mismos mecanismos moleculares que se habrían activado al inicio de la misma. Este hecho puedo haber contribuido a los reportes controvertidos relación a la función que cumple SPARC en la modulación de la capacidad proliferativa e invasiva de las células. En efecto, Dhanesuan y colaboradores

(Dhanesuan et al., 2002) proponen que el aumento de la expresión de SPARC aumenta la proliferación e inhibe la capacidad migratoria *in vitro*de células MDA-MB-231; por otro lado Briggs y colaboradores muestran que el aumento *per se*de la expresión de SPARC no es suficiente para potenciar el fenotipo agresivo de la línea MCF-7, y que sólo cuando SPARC es inducida a partir de sobreexpresión de c-Jun, es capaz de potenciar la migración e invasión celular, hecho que señala la importancia de estudiar el contexto molecular en el cuál se está expresando esta proteína durante su estudio.

Los datos reportados acerca de la capacidad metastásica *in vivo* también aportan controversias; por un lado, Koblinski y colaboradores (Koblinski, 2005) postulan que el aumento en la expresión de SPARC en el modelo de MDA-MB-213 inhibe el fenotipo metastásico a partir de la inhibición de la formación de trombos que favorecen la supervivencia de las células tumorales en la circulación, efecto asociado a la propiedad antiadhesiva de SPARC. Por otro lado, Minn y colaboradores (Minn et al., 2005) utilizando el mismo modelo postulan que SPARC, es uno de los genes que al expresarse en células tumorales de cáncer de mama, favorecen la colonización del pulmón durante la formación de las metástasis.

Por todo ello, supusimos que estos modelos de sobreexpresión resultaban limitados en cuanto a su capacidad de evaluar el efecto de SPARC sobre la malignidad tumoral. Consideramos que la generación y utilización de modelos enlos que se adquirió la expresión de SPARC en algún paso del proceso de transformación maligna, y sus correspondientes líneas celulares con SPARC silenciado, representaban una herramienta novedosa y más eficaz para generar avances en la comprensión de la biología de esta proteína.

Por otra parte, en este trabajo de tesis se utilizaron los ratones transgénicos SP-/- en un fondo genético Nu/Nu, que complementaron los estudios realizados con la línea IBH-6. Los resultados obtenidos a partir de la utilización de estos modelos serán discutidos más adelante. Cabe resaltar que no hay publicaciones en las que se utilice este tipo de animales para el estudio de los mecanismos a través de los cuales la expresión de SPARC en el estroma participa del desarrollo tumoral, en modelos de cáncer de mama humanos. Tampoco existen trabajos en los que se utilicen animales SP-/- y se estudie el fenotipo de los tumores combinando la expresión o no de SPARC en el estroma con la expresión o no de la misma en el

epitelio. Todos los trabajos en los que se menciona que se utilizaron ratones SP-/- utilizaron ratones de las cepas BALB/c o C57 BL.

## *Capítulo II Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento del cáncer de mama humano*

**1-Evaluación de la contribución de SPARC expresada por el estoma a la progresión tumoral.**

Si bien se ha intentado establecer la función de SPARC secretada por células estromales en el crecimiento tumoral, los resultados obtenidos varían en función del tipo tumoral estudiado y del modelo utilizado. Dos ejemplos paradigmáticos del efecto de un estroma positivo para SPARC en la progresión tumoral, son elcáncer de ovarioy elcáncer de páncreas.

En el **cáncer de ovario** se ha reportado que la ausencia de SPARC en el estroma favorece la formación de ascitis y metástasis, y disminuye significativamente la supervivencia en comparación con el mismo tumor creciendo en ratones SP+/+ (Said and Motamed, 2005). Sin embargo, también se reportó que si se analiza la expresión de SPARC en muestras de ovario normal y tumoral, la expresión en el estroma sólo se observa en adenocarcinomas invasivos y no en aquellos de bajo potencial metastásico, sugiriendo que un estroma que expresa SPARC es permisivo para el desarrollo tumoral (Brown et al., 1999). Más recientemente se reportó que la expresión de SPARC en el estroma correlaciona con una disminución de la eficacia del tratamiento con cisplatino (Bull Phelps et al., 2009).

En el **cáncer de páncreas**, la utilización de ratones SP-/- permitió determinar que la ausencia de SPARC en el estroma genera un aumento en la velocidad de crecimiento de los tumores. La diferencia en el volumen tumoral obtenida en ratones C57 BL SP+/+ versus SP-/- sería consecuencia de una reducción en la tasa de apoptosis generada por un menor número de células tumorales con caspasa-3 activa; no se observaron diferencias en la capacidad proliferativa de las células tumorales creciendo en ambos genotipos (Puolakkainen et al., 2004). Asimismo, la ausencia de SPARC en el estroma no sólo aumentaría la velocidad de crecimiento del tumor, sino que también favorecería la diseminación metastásica a partir de un aumento en la expresión de MMP9(Arnold et al., 2010) y un aumento en la permeabilidad de los vasos que irrigan al tumor (Bramwell et al., 2010).

En este trabajo, donde nos centramos en modelos de **cáncer de mama,** hemos demostrado que la capacidad de crecimiento *in vivo* de la línea IBH-6, es similar en un ambiente SP+/+ o SP-/-, dato que coincide con lo reportado por Wong y colaboradores, quienes presentaron evidencias de que SPARC secretada por el estroma no es suficiente para promover la iniciación o progresión del tumor en modelos de cáncer de mama y próstata (Wong et al., 2008). Sin embargo, Sangaletti y colaboradores, utilizando el modelo murino N2C demostraron que la ausencia de SPARC en el estroma genera una reducción del tamaño del tumor, a partir de la inhibición de la deposición de colágeno IV, y un aumento en el reclutamiento de leucocitos que pueden penetrar más fácilmente en el parénquima tumoral. Nosotros también encontramos estas modificaciones en el microambiente tumoral, asociadas a la ausencia de SPARC en el estroma (ver Tabla 9), sin embargo ellas no impactan de manera significativa en el crecimiento del tumor. Asimismo, estos autores utilizando el modelo de 4T1 y la misma cepa Balb/c ratones transgénicos SP-/-, no encuentran que SPARC secretado por el estroma afecte significativamente el crecimiento tumoral, aunque sí favorece la diseminación metastásica. Estos datos señalan que el efecto que tiene la expresión de SPARC del estroma sobre el crecimiento del tumor es dependiente del modelo que se utilice; en base a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que el efecto que tiene la expresión de SPARC del estroma depende de los niveles de expresión de esta proteína en el epitelio tumoral.

Al mismo tiempo, es importante resaltar que los estudios realizados utilizando muestras de pacientes que asocian la expresión de SPARC en el estroma tumoral a un marcador de buen o mal pronósitco, la encuentran expresada en el endotelio o los fibroblastos (Barth, et al. 2005); Witkiewicz et al., 2010); (van Beijnum et al., 2009); la utilización de modelos que evalúen la expresión de SPARC en estos tipos celulares y su relación con el crecimiento del cáncer de mama es un campo que permanece sin explorar.

**2-Evaluación de la contribución de SPARC del epitelio a la progresión tumoral**

A-Efecto sobre la proliferación

Si nos centramos sólo en la célula tumoral, encontramos que el silenciamiento de los niveles endógenos de SPARC en la línea IBH-6 L.51 no generó diferencias significativas en cuanto a la velocidad de proliferación con respecto a la línea control *in vitro*, dato que coincide con lo

reportado por nuestro grupo en melanoma (Prada et al., 2007). Sin embargo, otros autores encontraron que en otras líneas celulares de melanoma, la disminución en los niveles endógenos de SPARC genera un arresto en las fases G2/M del ciclo celular, lo cual indicaría que SPARC expresada por las células tumorales favorece la proliferación y la progresión del ciclo celular (Fenouille et al., 2011b), aunque este efecto sería dependiente del modelo que se utilice. Por otro lado, en líneas celulares de cáncer de mama se demostró que la expresión de SPARC disminuye el número de células en fase S del ciclo celular,en la línea MDA-MB-213(Dhanesuan et al., 2002). Por el contrario, Koblinski y colaboradores no encontraron diferencias en la velocidad de proliferación *in vitro* al expresar SPARC en la misma línea celular (Koblinski et al., 2005), dato que coincide con lo reportado por Briggs y colaboradores en el modelo de MCF-7 (Briggs et al., 2002).

Al analizar el efecto del silenciamiento de SPARC en la línea IBH-6 *in vivo,* encontramos que la disminución de los niveles endógenos de SPARC en la línea IBH-6 L.51 lleva a un aumento en la velocidad de crecimiento de los tumores generados en ratones salvajes. Este aumento en el crecimiento podría ser consecuencia de un mayor número de células en proliferación,de acuerdo a lo observado mediante la marcación para ki67. Sin embargo, también observamos que la matriz de colágeno depositada en los tumores IBH-6 L.51 deficientes en SPARC es más laxa, hecho que contribuiría al aumento del volumen de los tumores.

Las evidencias encontradas en cuanto al rol de la expresión de SPARC en epitelio y la proliferación no son concluyentes y señalan una fuerte dependencia de los resultadosdel modelo estudiado y el contexto en el cuál se expresa la proteína.

B-Efecto sobre la migración e invasión

Nuestros resultados sobre el efecto de la expresión de SPARC en cuanto a la capacidad migratoria e invasiva de la célula tumoral son consistentes con lo descripto en otros modelos. Al bajar los niveles de expresión de SPARC en la línea IBH-6, encontramos una reducción significativa en la capacidad migratoria e invasiva *in vitro,* y si bien no podemos evaluar la capacidad metastásica *in vivo* con este modelo, encontramos indicios de que al bajar los niveles de expresión de SPARC, el tumor pierde capacidad invasiva en la periferia tumoral. Asimismo, numerosos trabajos utilizando muestras de pacientes reportan que la expresión de

SPARC es un marcador de mal pronóstico asociado a fenotipos más invasivos (Helleman et al., 2008); (Sarrió et al., 2008); (Min et al., 2008); (Lien et al., 2007); (Jansen et al., 2005);(Lakhani et al., 2005); (Watkins et al., 2005); (Amastschek et al., 2004); (Dairkee et al., 2004);(Woelfle et al., 2003); (Jones et al., 2004);(Graham et al., 1997); (Bellahcene and Castronovo, 1995).

Esta reducción en la capacidad invasiva de las células IBH-6 puede estar asociada a la pérdida del fenotipo mesenquimatico que encontramos al bajar los niveles de expresión de SPARC; aunque no fue evaluado en este sistema experimental, nuestro grupo demostró que la reducción de SPARC en melanomarevierte el fenotipo mesenquimatico generando una inhibición importante de la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales (Girotti et al., 2011).

Si analizamos en conjunto los resultados de proliferación e invasión encontrados para la modulación de SPARC en la línea IBH-6 en presencia de SPARC en el estroma, podemos destacar que mientras existe una tendencia a que las células que expresan SPARC generen tumores primarios más pequeños (Figura 29), los mismos parecen ser más invasivos que su contraparte con baja expresión de SPARC (Figura 31). Un aumento de la proliferación y una disminución en la capacidad invasiva generadas por la disminución en la expresión de SPARC son hechos previamente reportados en la literatura, asociados a la pérdida de la capacidad adhesiva generada por SPARC (Rempel et al., 2002).

3- Evaluación de la contribución de SPARC del epitelio y del estroma al crecimiento tumoral

Iniciamos este trabajo con el objetivo de poder determinar si existe una función diferencial de la expresión de SPARC por parte del epitelio o del estroma tumoral. Los resultados obtenidos para este modelo no reportaron un aporte significativo de SPARC del estroma al crecimiento del tumor. Por el contrario, al bajar los niveles de expresión de SPARC en el epitelio encontramos un aumento de la capacidad proliferativa concomitantemente con una reducción de la capacidad invasiva.

Lo novedoso de nuestro trabajo respecto a lo reportado previamente en la literatura, fue que al combinar la presencia o no de SPARC en el estroma, con la reducción de los niveles de expresión de SPARC en el epitelio, encontramos que la velocidad de crecimiento de los tumores se reduce significativamente en ratones SP-/- respecto a ratones SP+/+, y que dicha

reducción es acompañada de un aumento en el número de neutrófilos que son capaces de invadir el parénquima tumoral. La reducción en los niveles de expresión de SPARC y un mayor reclutamiento y activación de neutrófilos que inhiben el crecimiento del tumor, ya ha sido reportada por nuestro grupo en modelos de melanoma (Prada, 2007). Sin embargo, en melanoma este efecto se observa al silenciar SPARC en el epitelio, mientras que en nuestro modelo de cáncer de mama sólo lo encontramos al reducir los niveles de SPARC en todos los componentes celulares del tumor. Esto puede deberse a diferencias en los niveles de expresión de SPARC totales dentro del tumor, ya que en melanoma asumimos que el principal productor de SPARC es el epitelio.

El hecho de que al bajar los niveles de expresión de SPARC en las células epiteliales(IBH-6 L.51) éstas modifiquen su velocidad de crecimiento en presencia o ausencia de SPARC exógeno, mientras que las célulasepiteliales con altos niveles de expresión de SPARC (IBH-6) se mantienen refractarias a variaciones de SPARC exógena, ya fue reportada en varios trabajos del grupo en modelos de melanoma (Prada et al., 2008; Lopez-Haber el al., 2008; Girotti et al., 2010). Esto podría explicar algunas de las inconsistencias observadas en distintos modelos tumorales. Aunque todavía no hemos diseñado experimentos para comprobar esta hipótesis, nuestra observación, consistente en melanoma y en cáncer de mama, nos invita a evaluar esta posibilidad en futuros proyectos.

¿Cómo se relacionan nuestros hallazgos con la evidencia encontrada en muestras de tumores humanos? Diversos trabajos determinaron que la expresión de SPARC en el estroma correlaciona con un mal pronóstico en carcinomas mamarios, de pulmón, de hígado y de ovario, entre otros (Porter et al., 1995; Smith et al., 2010; Witkiewicz et al., 2010). Barth y colaboradores reportaron que la expresión de SPARC y SMA (actina de músculo liso) sólo se detecta en fibroblastos de lesiones malignas, mientras que en la mama normal los fibroblastos son negativos para SPARC (Barth et al., 2005); más recientemente se correlacionó la expresión en el estroma con un menor tiempo de recurrencia en tumores ductales *in situ*(Witkiewicz et al., 2010). Sin embargo, otros autores proponen que la expresión de SPARC por parte del estroma correlacionaría con una mejor supervivencia (Beck, 2008; Bergamaschi, 2008).

Nosotros hemos evaluado la localización e intensidad de la expresión de SPARC en cortes de tejido de carcinoma mamario de pacientes con o sin metástasis ganglionares. Nuestro trabajo

es el primero que propone la cuantificación de la señal de SPARC de manera objetiva utilizando herramientas digitales simples, y esto nos permitió definir un nivel umbral en la medición de la intensidad de la expresión de SPARC para estimar la aparición de metástasis axilares. Encontramos que en el 80% de los casos con metástasis ganglionares, la señal global de la expresión de SPARC fue mayor a un valor de 13,5 (determinado por cuantificación en unidades arbitrarias) sin discriminar si la señal era positiva en la célula tumoral o el estroma. Asimismo, la utilización de árboles binarios de decisión nos permitió establecer que si la intensidad de la señal es menor a 13,5 pero el estroma es positivo, aumenta la frecuencia de aparición de metástasis axilares. Es importante destacar que no encontramos correlación ninguna estadísticamente significativa entre la marcación positiva en estroma y la aparición o no de metástasis ganglionares. Sin embargo, no podemos descartar que así sea,dado el escaso número de casos de los cuales teníamos información de metástasis ganglionares. De cualquier modo, estos datos aportan más evidencia a favor de la utilización de la expresión de SPARC como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama.

El hecho de haber encontrado que de todos los parámetros analizados en los tumores humanos, los niveles totales de expresión de SPARC hayan sido los que mejor explican la aparición de metástasis, sugiere que tanto la expresión de SPARC en el epitelio como en el estroma deben considerarse al momento de determinar la agresividad de un tumor. Asimismo, una posible explicación a los datos contradictorios reportados en la literatura, podría radicar en la evaluación de la presencia de SPARC en todos los componentes del tumor, y los niveles totales de SPARC en el microambiente tumoral.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir del modelo IBH-6 en combinación con los resultados de las muestras de los pacientes, podemos concluir que:

- Un epitelio negativo o con baja expresión de SPARC inmerso en un estroma positivo para SPARC aumenta su proliferación, y en el caso de los tumores humanos la probabilidad de encontrar metástasis axilares es mayor.
- Si ambos componentes epitelio y estroma son positivos para SPARC, entonces la progresión del tumor se ve favorecida. A mayores niveles de expresión de SPARC, la frecuencia de aparición de metástasis axilares aumenta. Lo mismo ocurre si sólo se

detectan elevados niveles de expresión de SPARC en el epitelio inmerso en un estroma negativo.

- Si ambos componentes del tumor son negativos, los tumores proliferan menos y la capacidad invasiva de las células tumorales disminuye significativamente.

## *Capítulo III Caracterización de la función biológica de SPARC en el crecimiento y la diseminación metastásica en un modelo murino de cáncer de mama en ratones inmunocompetentes.*

Los experimentos mostrados en el capítulo III de esta tesis utilizando el modelo de 4T1, dan cuenta de que SPARC posee un rol central en la agresividad tumoral. Este es el primer reporte en el cual se muestra que el silenciamiento de SPARC en el modelo de 4T1,suprime completamente la generación de metástasis pulmonares espontáneas *in vivo.* Es interesante que en este modelo, donde utilizamos ratones inmunocompetentes, SPARC también está favoreciendo el crecimiento del tumor primario ortotópico. Más aún, presentamos evidencias de que la regulación de estos eventos sería a través de mecanismos independientes; en efecto, si bien los tumores generados a partir del Clon 1 pueden llegar al tamaño que presentaban los tumores control al momento del sacrificio, ninguno de los animales tenía metástasis pulmonares en ese punto. Sin embargo, dado que existen evidencias de que los genes que favorecen la generación de metástasis, entre los que se encuentra SPARC, también le confieren ventajas proliferativasal tumor primario(Minn et al., 2007), no podemos descartar que en nuestro modelo, los efectos encontrados sean consecuencia de la acción de los mismos genes.

La ausencia de metástasis pulmonares generadas por la reducción de los niveles de expresión de SPARC en la línea 4T1 podría ser consecuencia tanto de la pérdida de la capacidad invasiva del tumor primario, como de la pérdida de la capacidad de colonizar el pulmón. Según los resultados obtenidos, el efecto inhibitorio de SPARC sobre la capacidad metastásica estaría asociado principalmente a la incapacidad de colonizar el pulmón, ya que al inyectar las células con SPARC silenciado directamente en el torrente sanguíneo, éstas son capaces de llegar al pulmón, pero el número y tamaño de las metástasis es significativamente menor que con la línea control en dos de los tres clones analizados y están ausentes en el tercero de esos clones.De todos modos, la capacidad de las células de salir del tumor primario y entrar en circulación no ha sido evaluada en este trabajo y es un efecto que no podemos descartar.

El modelo murino de 4T1 ya ha sido utilizado para evaluar la participación de SPARC en el fenotipo metastásico, aunque con una estrategia diferente. En el trabajo reportado por Sangaletti y colaboradores se asocia la expresión de SPARC por parte de los macrófagos al favorecimiento del fenotipo metastásico (Sangaletti et al., 2008), aunque con el uso de ratones SP -/- sólo observan una reducción estadísticamente significativa en el número de metástasis pulmonares y no su completa desaparición. En cambio, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron una inhibición completa del fenotipo metastásico al silenciar SPARC en el epitelio, resaltando la potencia de SPARC expresada por el epitelio sobre el fenotipo metastásico en este modelo.

Una condición experimental que quedó sin evaluar fue el comportamiento de los clones 1, 5 y 18 en un ambiente SP-/-; sin embargo, en función de la evidencia presentada por nosotros y otros grupos, no creemos posible que la eliminación del fenotipo metastásico se revierta en presencia de un estroma SP-/-.

## *Capítulo IV Búsqueda de mediadores de la función biológica de SPARC en cáncer de mama, mediante la técnica de microarreglos de ADN.*

Para relacionar el silenciamiento de SPARC con la capacidad metastásica desde el punto de vista molecular, decidimos realizar dos experimentos de microarreglos de ADN. En el primero de ellos, nos centramos en los cambios ocurridos a partir de la modulación de SPARC sobre la célula epitelial creciendo en cultivo, experimento denominado **microarreglo *in vitro***. En el segundo experimento, nos centramos en los cambios generados por la supresión de SPARC en los tumores creciendo ortotópicamente en la glándula mamaria, y la metástasis pulmonar derivada de éste, denominamos a dicho experimento**microarreglo *in vivo***.

Los experimentos de microarreglos son técnicas de búsqueda de alto rendimiento. Cada experimento de microarreglos arroja cientos de posibles interacciones y procesos biológicos diferencialmente modulados en el sistema experimental evaluado. Se requiere un detallado análisis de la información obtenida para luego pasar a la validación biológica y funcional que permite definir con mayor precisión, cuáles son los genes que contribuyen activamente al fenotipo encontrado.

A manera de resumen, se puede destacar que la comparación de ambos experimentos muestra coincidencias y diferencias en los efectos de SPARC sobre las vías moleculares que dominan el comportamiento tumoral. En ambos experimentos de microarreglos, los términos que mayor número de genes diferencialmente expresados contenían, estaban asociados a la regulación de la matriz o del espacio extracelular. Para el término "**espacio extracelular**" en el microarreglo *in vitro* obtuvimos 20 genes diferencialmente expresados a partir de la modulación de SPARC en la célula epitelial; para el mismo término en el experimento de microarreglo *in vivo*, obtuvimos 33 genes diferencialmente expresados entre los tumores primarios obtenidos a partir de la modulación de SPARC en el epitelio. Este resultado refleja una vez más la importancia de SPARC como proteína moduladora del espacio extracelular. Si bien está ampliamente reportado que SPARC genera alteraciones en la matriz extracelular a partir de modificaciones postranscripcionales (Chlenski, 2011; Framson, 2004 y citas incluídas en él; Arnold, 2009 y citas incluídas en él),en este trabajo presentamos abundante evidencia a favor la de la modulación transcripcional de genes pertenecientes al espacio extracelular por parte de SPARC. Asimismo, en ambos experimentos de microarreglos encontramos que cobran relevancia en función de la modulación de SPARC, los términos asociados a la "**unión a glicosaminoglicanos**" y a la "**regulación positiva de la adhesión al sustrato**". Esto muestra una vez más la relevancia de SPARC sobre adhesividad celular, y la importancia de esta función en relación al fenotipo metastásico.

Por otra parte, el experimento de microarreglo *in vitro* arrojó además un importante número de genes asociados a la "**regulación del ciclo celular",** hecho que no se vio reflejado tan claramente en el experimento de microarreglo *in vivo,* posiblemente debido a que cobran relevancia otras señales emergentes del estroma tumoral. Como corroboración de esta teoría, en el experimento de microarreglo *invivo* encontramos una importante modulación en términos asociados a la "**respuesta inmune"**, ya sea tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, que no resultó evidente en el experimento de microarreglo *in vitro.*

La relevancia que cobra la modulación de estos términos en el contexto de nuestro modelo experimental, en el cual la disminución en los niveles de expresión de SPARC en la célula epitelial reduce el crecimiento tumoral e inhibe completamente el fenotipo metastásico, será discutida a continuación.

**Regulación del espacio extracelular**

El primer paso de la cascada metastásica implica la ruptura y remodelación de la membrana basal, una matriz extracelular especializada que posee un rol crítico en el mantenimiento de la estructura del tejido epitelial. Además del rol estructural, la membrana basal actúa de repositorio de factores de crecimiento que pueden ser liberados por la acción de metaloproteasas secretadas por las células epiteliales. Asimismo, la membrana basal también juega un rol crucial en procesos de transducción de señales dentro de las células tumorales a través de vías de señalización que se activan a partir de interacciones entre integrinas de la membrana celular con proteínas de la matriz extracelular. Estas alteraciones modifican la polaridad celular, proliferación, invasión y sobrevida de las células tumorales (Bissell and Hines, 2011).

Está ampliamente reportado que la expresión de SPARC aumenta concomitantemente con la activación de la deposición de la matriz extracelular (Framson et al., 2004). La expresión de SPARC es requerida para la correcta secreción, deposición y entrecruzamiento de las fibras de colágeno durante el desarrollo, cierre de heridas y progresión tumoral (Bradshaw et al., 2001). La modulación de la rigidez de la matriz extracelular generada por la alteración en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno, favorece la progresión del cáncer de mama alterando la señalización vía integrinas (Levental et al., 2009). Los resultados obtenidos en esta tesis resaltan la importancia de SPARC como proteína reguladora del espacio extracelular, no ya a nivel meramente funcional sino como resultado de modulaciones en la expresión de genes concretos de matriz extracelular. La modulación del espacio extracelular a partir de la expresión de SPARC ha sido una de las áreas de interés de nuestro laboratorio en los últimos años. A partir de experimentos de proteómica y de biología celular demostramos que en melanoma, SPARC actúa enviando señales a la célula para la regulación transcripcional y postranscripcional de proteínas relevantes para la invasión y migración celular (Sosa et al., 2007) ; (Girotti et al., 2011). Dicha señalización se lleva a cabo, al menos en parte, de manera indirecta a través de receptores de proteínas de matriz extracelular que son modificadas cuali y cuantitativamente por SPARC. Aunque no se conoce todavía de qué manera se lleva a cabo esta modificación, se sospecha que la unión de SPARC a proteínas de matriz (bien documentada en la literatura) alteraría la afinidad de distintos ligandos (por ej. colágenos) por receptores de membrana (por ej. integrinas) y ello podría afectar una serie de procesos aguas

abajo de esta interacción. En línea con esta hipótesis, se ha descripto a SPARC como una chaperona de tipo “secuestradora” (*Scavenger*) de proteínas de matriz extracelular, las cuales son internalizadas junto con SPARC en procesos tales como la invasión (Chlenski et al., 2011).

Esta dinámica de aparición/desaparición de moléculas de la matriz inducida por SPARC por combinación de efectos a nivel transcripcional y postraduccional justificaría la generación de diversas señales originadas desde el espacio extracelular hacia el interior las células, favoreciendo diferentes procesos celulares involucrados en crecimiento y diseminación tumoral. Un aspecto que queda sin explorar en esta tesis es si estos cambios generados en el espacio extracelular justifican por sí solos los dos fenotipos más fuertemente alterados a partir de la disminución de SPARC (reducción del tamaño tumoral y pérdida completa de la capacidad metastásica), o si además ocurren otros efectos dependientes de SPARC pero no mediados por proteínas de matriz extracelular.

Un dato llamativo fue que los genes diferencialmente expresados obtenidos en ambos experimentos no se comparten, a excepción de dos de ellos: Slpi y MMP9. En relación a esta última es más llamativo aún encontrar que en el experimento *in vitro* aparece sobreexpresada en el clon 18 deficiente en SPARC, mientras que en el experimento *in vivo* aparece subexpresada en el tumor del clon 18. Podemos interpretar este resultado de dos maneras: por un lado podemos pensar que este gen cambia su nivel de expresión en la célula tumoral en respuesta a cambios en el microambiente que se generan a partir de la inoculación de las células en el animal. Otra posibilidad sería que el resultado neto de cambio en los niveles de expresión de este gen en el tumor resulte de la suma de la expresión del gen por la célula epitelial y por células del estroma. En ese sentido, la expresión de MMP9 en el tumor ha sido asociada a una firma que contiene genes estromales (Bergamaschi et al., 2007), y en particular, se la encontró expresada en células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (Benaud et al., 1998), lo cual apoya la segunda hipótesis. De todas maneras, se sabe que altos niveles de MMP9 representan un factor de mal pronóstico en cáncer de mama, independientemente del tipo celular que la esté expresando (Li et al., 2004; Pellikainen et al., 2004); (Sullu et al., 2011) y su función como molécula clave para degradar la membrana basal. El hecho de encontrar este gen subexpresado en el clon 18, la señalan entre los genes candidatos a ser responsables de la inhibición del fenotipo metastásico observado.

El resultado obtenido en el experimento de microarreglo *in vivo* señala que muchos de los genes de los términos asociados al espacio extracelular están relacionados con contactos de adhesión focal e interacciones entre receptores y proteínas de la matriz extracelular. En este sentido, encontramos que al bajar SPARC, se reduce la expresión de Fn2, MMP9, y Pi3kr2. Existen abundantes evidencias de que cuando el receptor $\alpha$5 integrina entra en contacto con la fibronectina presente en la matriz extracelular, se produce la activación de Pi3K que conduce a la expresión y activación de MMP9, favoreciendo la capacidad invasiva de las células(Maity et al., 2011; Makita et al., 2010; Raghu et al., 2010; Sil et al., 2011). Por otro lado, el otro gen de matriz extracelular desregulado tanto en el experimento in vitro como el in vivo es Slpi. El hecho de que se haya encontrado que la expresión de Slpi, en cáncer de pulmón ovario y gástrico, promueva el fenotipo metastásico a partir de un aumento en la expresión de MMP-2 y MMP9 (Choi et al., 2011), nos lleva pensar que ambos genes funcionarían concomitantemente favoreciendo del fenotipo metastásico dependiente de SPARC.

**Validación de Mmp3**

El gen presenta el mayor grado de inhibición en su expresión al silenciar SPARC en el experimento *in vitro* resultó ser Mmp33. Encontramos que al bajar los niveles de expresión de SPARC, la expresión de Mmp3 medida por PCR en tiempo real disminuye por lo menos cuatro veces. En la literaturaestá reportada la relación mutua entre SPARC y MMP3. SPARC es clivada por MMP3, aumentando su afinidad por colágeno I, IV y V (Sasaki et al, 1997), al mismo tiempo,MMP3 cliva a SPARC, generando polipéptidos que estimulan la angiogénesis (Sage et al., 2003). En modelos de glioma, la expresión de SPARC aumenta la expresión de MMP3, favoreciendo el fenotipo metastásico (Rich et al., 2003). Asimismo, la expresión de MMP3 en líneas de cáncer de mama está asociada al fenotipo invasivo y metastásico(Balduyck et al., 2000; Hahn-Dantona et al., 1999; Phromnoi et al., 2009; Ramos-DeSimone et al., 1999). En particular, se destaca su función como favorecedora de la permeabilidad vascular que facilita la generación de metástasis pulmonares (Huang et al., 2009). El hecho de haber validado por otras metodologías el cambio de niveles de expresión de MMP3 en función de la modulación la expresión de SPARC, y su relevancia en la biología tumoral, coloca a este gen entre los candidatos para una posterior validación funcional. Es de destacar, sin embargo, que MMP3 no se encuentra entre los genes diferencialmente expresados en el experimento de microarreglo *in vivo,* lo cual sugiere que en el entorno tumoral las diferencias en los niveles de esta proteína

pueden estar localizadas en una porción del tumor, por ejemplo en el borde invasivo, y el resto del tejido puede "diluir" esta diferencia. Futuros estudios se concentrarán en evaluar la localización de la misma dentro del tumor.

**Regulación de la adhesión y dinámica de los contactos de adhesión focal**

En repetidas ocasiones a lo largo de esta tesis enfatizamos la importancia de la matriz extracelular en relación con el destino y la función celular, y resaltamos la importancia de SPARC en este contexto. En el experimento de microarreglo *in vivo* encontramos tres vías de señalización reguladas diferencialmente a partir de la expresión de SPARC: interacción con la matriz extracelular, contactos de adhesión focal y JAK-STAT, involucradas en la modulación de la adhesión con implicancias en la proliferación y la migración celular.

La transducción de la señal desde el exterior hacia el interior de la célula, comienza en el espacio extracelular y requiere de un receptor en la membrana celular que internaliza dicha señal y activa una cascada de señalización. Río abajo de ese receptor, se activa un mecanismo que modificaría el estado de adhesión de la célula y le permite migrar o proliferar. Trabajos de nuestro grupo demostraron que SPARC modula la capacidad invasiva de las células de melanoma a partir de un eje que involucra a TGF$\beta$1/ colágeno tipo I/ integrinas $\alpha 2\beta 1$ (Girotti et al. 2011).

En este experimento de microarreglo *in vivo*, no solo encontramos que SPARC puede regular la capacidad adhesiva de la célula a partir de la modificación del espacio extracelular, sino que también regula, a nivel transcripcional, la vía de contactos de adhesión focal a partir de la modulación de un receptor, Sdc3 (Syndecan 3) y de moléculas río abajo de esta señal, como Pi3kr2 (PI3K) y Arhgap5 (RHOGAP). Si bien se ha descripto que SPARC influencia moléculas río abajo de la señalización mediada por integrinas, en particular ILK (Shi et al., 2007; Said et al., 2007) en este trabajo encontramos nuevas moléculas mediadoras de la función de SPARC sobre la adhesión y migración como Sdc3, PI3k y RHOGAP.

**Regulación del ciclo celular**

Inicialmente se describió a SPARC como una proteína con función antiproliferativa en células no tumorales (Sage et al, 2001). Particularmente en cáncer de mama, el aumento de SPARC

retarda la progresión haciala fase S del ciclo celular (Dhanesuan et al., 2002), mientras que es capaz de inducir la apoptosis en el cáncer de ovario (Yiu et al., 2001). Sin embargo, en los últimos años se reportó que SPARC podría estar favoreciendo el ciclado en diversas líneas de melanoma. En particular, muy recientemente Horie y colaboradores (Horie et al., 2010) proponen que el silenciamiento de SPARC genera un arresto de las células en la fase G1, mientras que Fenouille y colaboradores (Fenouille et al, 2011) reportaron que el arresto generado por la inhibición de SPARC era en la fase G2/M del ciclo celular.

A pesar de no haber encontrado coincidencias en cuanto a la expresión de SPARC y su relación con la proliferación celular en los modelos IBH-6 y 4T1, esto no resulta sorprendente, dada la gran cantidad de datos que reportan una función dual para esta proteína en la regulación del ciclo celular. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental de 4T1, en relación a los genes expresados diferencialmente al bajar los niveles de expresión de SPARC y asociados a la regulación del ciclo celular (por ej. inhibición en la expresión de Ccnb2, ORC4 y aumento en la expresión de Wee, Mdm2, Sfn y Cdc27), son señales inhibitorias de la progresión del ciclo celular, representando una importante evidencia a favor de la hipótesis de que el silenciamiento de SPARC genera un arresto del ciclo celular.

La validación biológica de los resultados del análisis ontológico, nos lleva a pensar que el arresto inducido por la inhibición en la expresión de SPARC, podría estar a nivel del punto de control "*checkpoint*" de la transición G1/S. Dado que Mdm2 es uno de los blancos transcripcionales de P53, el aumento en los niveles del ARNm de Mdm2 sugiere que deberíamos encontrar un aumento de p53 activa, que sería la responsable de generar la inhibición en la proliferación de las líneas con bajos niveles de expresión de SPARC en el modelo de 4T1. En la actualidad esta hipótesis está siendo evaluada en el laboratorio.

**Modulación de la respuesta inmune**

Entre las funciones biológicas descriptas para SPARC, se encuentra su propiedad antiinflamatoria (Sangaletti et al., 2008 y citas incluidas en el). Asimismo, trabajos de nuestro grupo reportaron que SPARC es un potente inhibidor de la activación de neutrófilos en melanoma (Alvarez et al., 2005; Prada et al., 2007). Es este trabajo encontramos que la modulación de SPARC tiene efecto sobre la regulación de la respuesta inflamatoria, sin

embargo también hallamos evidencias de que SPARC estaría regulando la respuesta inmune innata, en particular, la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas, la proliferación de linfocitos B, la activación de linfocitos T y la diferenciación de células NK. Si bien está reportado que SPARC modula la migración y activación de linfocitos T (Sangaletti et al., 2005), estos estudios no fueron realizados en el contexto de la modulación de la progresión tumoral. Los resultados obtenidos en este sentido, abren un interesante campo de estudio en relación a la expresión de SPARC y la regulación de la respuesta inmune innata.

**Metaanálisis de los resultados**

Tanto en lo que respecta a la comparación entre genes que diferencian el tumor (y su correspondiente metástasis) generado por la línea **4T1 SCR** versus el tumor generado por el **Clon 18** deficiente en SPARC, como en lo que respecta a la comparación entre el**tumor primario** y la **metástasis** derivada del mismo(generada por el tumor de la línea 4T1 SCR), se obtuvieron genes expresados diferencialmente, comunes a otras firmas moleculares descriptas en la literatura. Entre ellos, se destacan los genes dependientes de SPARC quefueron encontrados en firmas de **virulencia metastásica** (Tabla 37).Estos genes representan aquellos que se expresan tempranamente en el tumor como resultado de la modulación de los niveles de expresión de SPARC en las células epiteliales, que son relevantes para la formación de las metástasis. Es necesario validar la potencia de dicha firma como pronosticador de metástasis mediante un metaanálisis de los datos disponibles en las bases de datos respectivas y/o mediante el análisis de expresión de genes en biopsias de tumores de mama. Confiamos en poder realizar el metaanálisis sugerido en los próximos meses.

Por otra parte, también son notables los numerosos genes expresados diferencialmente pertenecientes a la categoría “matriz extracelular” que están presentes en firmas de **estroma tumoral** (tabla 24), lo cual resalta el aporte del estromaa la progresión del tumor. En efecto, 5 de los 16 genes de la firma de estroma, Slpi, SPP1, Fn1, Dcn y Stat5b, pertenecen a la firma mínima, que contiene a los genes de mayor influencia sobre el fenotipo observado. Es de destacar que la Fn1 aparece como molécula conectora entre muchos de los genes modulados por SPARC (Figura 74). En función de las interacciones reportadas entre el eje Fn1, $\beta$1 integrina, ILK y SPARCy el ensamblado de la matriz extracelular (Barker et al., 2005) proponemos que la Fn1 podría ser una de las moléculas mediadoras de la función de SPARC.

Finalmente, del metaanálisis de firmas tumorales también se desprende la relevancia delos genes diferencialmente expresados correlacionados con la **respuesta inmune**, lo que indica que muchos de los cambios que se observan en tumores humanos y que están relacionados con modulación del sistema inmune podrían responder a los niveles de SPARC expresados por el epitelio tumoral.

Notablemente, muchos de los genes dependientes de SPARC que forman la firma temprana que distinguiría las metástasis no están representados entre las firmas de metástasis evaluadas en la literatura. Podemos especular que algunos de esos genes podrían representar nuevos candidatos a formar firmas moleculares con mayor sensibilidad para pronosticar progresión de la enfermedad. Entre los genes tempranos interesantes para posteriores validaciones que ya han sido asociados al fenotipo metastático se encuentran Ccne, Apoe, MMP9, Angpt1 y Ect2. Entre los que no han sido reportados podemos considerar aDcn, Tmem 128 y Olfml1 como genes interesantes para posteriores estudios.

En resumen, el exhaustivo análisis de la literatura realizado, tanto a nivel de las evidencias biológicas como a nivel de las firmas moleculares ya descriptas para cáncer de mama, refleja que SPARC es una proteína esencial para el establecimiento y progresión del tumor, y que esto lo hace actuando sobre el estroma (especialmente sobre las células del sistema inmune) y la matriz extracelular.

# Conclusiones

Los dos grandes objetivos abordados a lo largo de esta tesis fueron la relación de la participación de SPARC del epitelio o del estroma en el crecimiento tumoral, y la participación de SPARC en el proceso de diseminación metastásica.

A lo largo de los dos primeros capítulos abordamos el primer interrogante, y en función de los datos obtenidos tanto a partir de muestras de pacientes, como de la línea IBH-6 y ratones SP-/- proponemos el siguiente modelo que permite explicar los resultados obtenidos. Como conclusión general podemos decir que SPARC es una proteína que favorece tanto el crecimiento del tumor como la capacidad invasiva de las células. Si el epitelio es positivo, el efecto de SPARC del estroma deja de ser relevante. El rol de SPARC del estroma como favorecedor del crecimiento del tumor y el fenotipo invasivo cobra relevancia cuando interactúa con un epitelio negativo para SPARC.

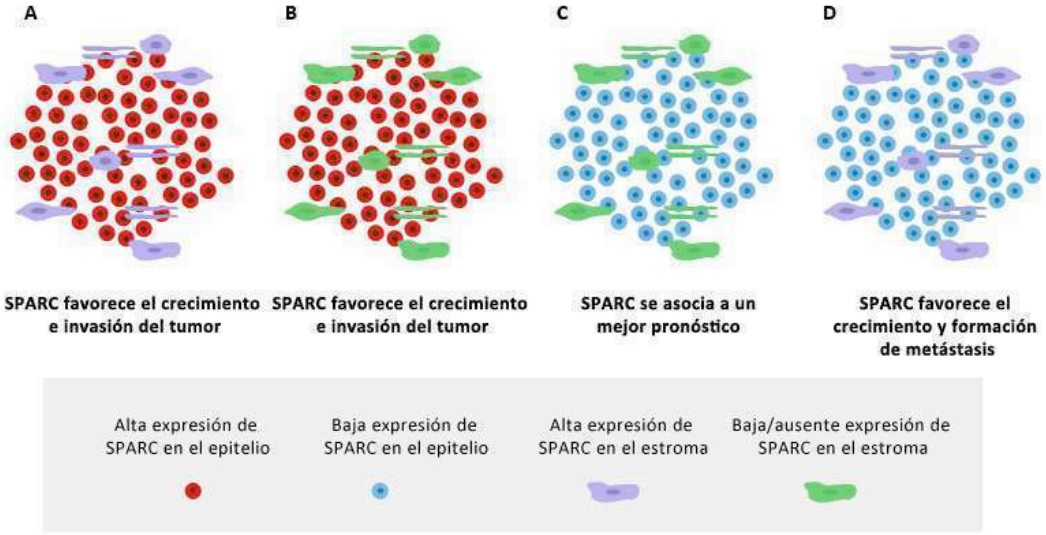



**Figura 75 Participación del SPARC del epitelio y SPARC del estroma en el crecimiento y capacidad invasiva de los tumores de mama.** A-Si el tumor presenta altos niveles de expresión de SPARC tanto en el epitelio como en el estroma, SPARC favorece el crecimiento y capacidad invasiva del tumor. B- Si el estroma es negativo pero el epitelio es positivo para SPARC, efecto principalmente debido a la capacidad invasiva del epitelio. C- Si el epitelio y el estroma son negativos para SPARC, el tumor se asocia a un mejor pronóstico. D- Si el epitelio es negativo pero el estroma positivo, SPARC favorece el crecimiento del tumor y formación de metástasis.

En base a los resultados obtenidos utilizando todos los modelos y herramientas desarrolladas a lo largo de esta tesis, y al efecto que ya se conoce de SPARC sobre la progresión tumoral,

proponemos nuevos genes que puedan explicar las funciones ya conocidas de la proteína en el contexto de la progresión del cáncer de mama. En relación a la transición epitelio mesenquimatica (TEM) encontramos que SPARC regula la expresión de dos genes centrales de este evento, Snail y Twist. Además encontramos que SPARC regula positivamente la proliferación del epitelio, a partir de la modulación de la expresión de genes del ciclo celular como CcnB2, CcnE y MDM2. Asimismo mostramos la importancia que posee SPARC como regulador del espacio extracelular. Entre los genes cuyos productos pertenecen al espacio extracelular y cuya expresión se encuentra afectada por SPARC, consideramos relevantes a: Fn, Dcn, OPN o SPP1 y dos proteínas homólogas a SPARC, Smock2 y SPOCK2. Proponemos que la modulación de la señal generada por las modificaciones en el espacio extracelular es transducida a través de RHOGAP5 y PI3K. Presentamos evidencias de que SPARC favorece la progresión tumoral a partir de la inhibición de la respuesta inmune, tanto la inmunidad innata como la adaptativa, a partir de la modulación de genes comoIl-6, Casp3, Stat5b, Fabp, Apoe, C1ra y Cfb. Finalmente proponemos entre los genes candidatos a estar asociados al fenotipo metastásico en etapas tempranas de la cascada metastásica a: Ect2, CcnE, Col6a1, Angpt1, MMP9, MMP3, Slpi1, y como genes de virulencia metastásica a Ncf2, Ccng2, Ptgs y Col1a2. Los resultados obtenidos se resumen en laFigura 76.

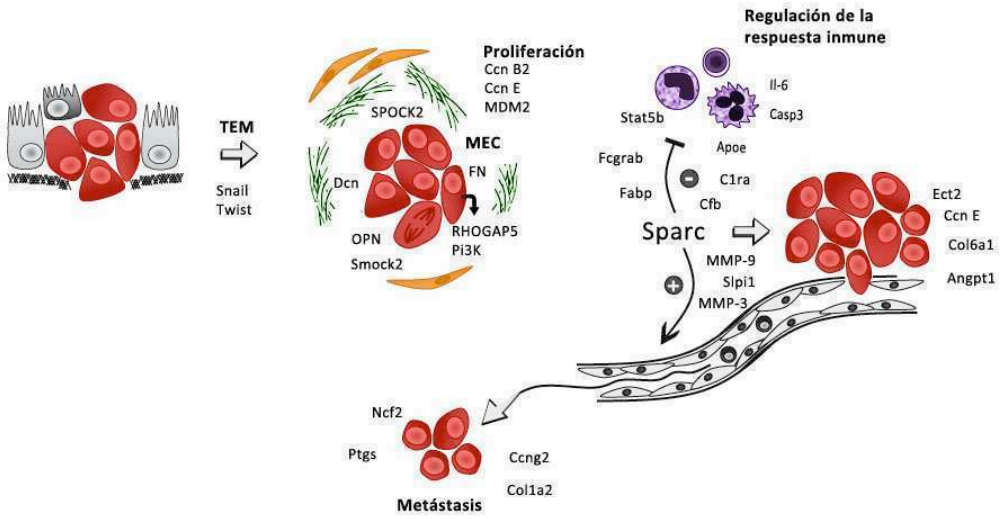



**Figura 76 Resumen de los resultados obtenidos y genes candidatos a regular la progresión tumoral favorecida por la expresión de SPARC.** Imagen adaptada de Prada etal,. 2007. En la figura se representaron las diferentes etapas de la progresión tumoral y los genes propuestos a mediar el efecto de SPARC sobre la transición epitelio mesenquimatica, la proliferación, la matriz extracelular, la inhibición de la respuesta inmune y el fenotipo metastásico favorecido por SPARC.

# Materiales y métodos

## *Cultivos Celulares*

La línea IBH-6 deriva de un adenocarcinoma mamario infiltrante, fue obtenida por la Dra. Isabel Luthy y sus colaboradores en el Instituto de Biología y Medicina Experimental. Esta línea crece en medio D-MEM F12 suplementada con 10% de suero fetal bovino. Cuando se inyecta en ratones nude da origen a carcinomas poco diferenciados sin diferenciación glandular con una alta tasa de proliferación. Las células poseen forma fibroblastoidea) (Figura 77), expresan Receptor de progesterona B y citoqueratinas. La expresión del Receptor de estrógeno sólo está presente en el núcleo de algunas células y resultan negativas para vimentina (Bruzzone et.al, 2009).

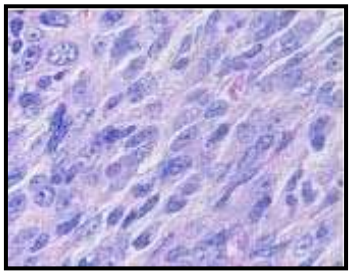


**Figura 77 Foto representativa de la morfología de las células de la Línea IBH-6 implantada en la glándula mamaria de ratones Nu/Nu y teñidas con hematoxilina-Eosina**

La línea 4T1 es una variante resistente a tioguanina aislada del tumor 410.4 originado espontáneamente en la glándula mamaria de ratones de la cepa BALB/cfC3H(Aslakson and Miller, 1992). Metastatiza espontáneamente en pulmón e hígado de hembras que poseen la línea implantada tanto subcutáneamente como en la glándula mamaria. Presenta un fenotipo epitelial.

Debido a su alta capacidad invasiva, es posible detectar células circulando en los vasos sanguíneos, en los nódulos linfáticos, en el hígado y en los pulmones a los 10 días de haber inyectado 50000 células subcutáneas.

Las células fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino.

### *Mantenimiento de líneas celulares*

Las células de la línea IBH-6 fueron rutinariamente crecidas en placas de 150 mM de diámetro (P150), en medio denominado D-MEM F-12 (Sigma-Aldrich), las de la línea 4T1 fueron crecidas en medio RPMI (Sigma-Aldrich), suplementados 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 de cultivo completo y plaqueadas nuevamente en P150, normalmente en diluciones al cuarto de la placa inicial. Cada uno de estos tratamientos de división del contenido celular una placa en cuatro 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.

## Producción y generación de vectores Lentivirales

### *Preparación de plásmidos a mediana escala*

La preparación de plásmidos utilizados para generar los vectores lentivirales así como también del utilizado para expresar SPARC de ratón, se realizó con el kit QIAGEN plasmid Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), que se basa en una modificación del método de lisis alcalina. En este caso se realiza la purificación del plásmido por una columna conteniendo una resina con grupos dietilaminoetanol (DEAE) cargados positivamente a los que se une el ADN plasmídico, permitiendo la remoción de ARN, proteínas e impurezas de bajo peso molecular por lavado con soluciones conteniendo concentraciones medias de sales mientras que el ADN plasmídico permanece unido a la resina, eluyendo sólo a altas concentraciones de sales.

### *Generación de los vectores lentivirales*

Se cortaron 10μg del vector pRNATin H1.4 (Genscript) con las enzimas BamHI y XhoI (invitrogen) y 10 μg de cada uno de los siguientes oligos (Tabla 39):

**Tabla 39 Secuencias de los siRNA contra SPARC humano y murino**

| | |
|---|---|
| **51** | tggatcccgcggcaggcagagcgcgctctcttgatatccggagagcgcgctctgcctgccgtttttttccaactcgagg |
| **SCR51** | ggatcccgcctcgatacggcgtgcggccggttgatatccgcggcgcacgccgtatcgaggtttttttccaactcgac |
| **52-1** | Ggatcccgaccttcgactcttcctgcttgatatccggcaggaagagtcgaaggtctttttttccaactcga |
| **SCR 52-1** | Ggatcccgttgacgaggcaagcgaggattgatatccgtcctcgcttgctcgtcaattttttccaactcgag |
| **518** | TggTccGatGtaGcgGatAtcAacTaaCtaCatCggAccA |
| **52-2** | Tgacaagtacatcgccctgttcaagagacagggcgatgtacttgtcat |

Los fragmentos cortados se corrieron en geles de agarosa y los fragmentos a clonar se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN illustra (GE). Los insertos y los vectores se cuantificaron y se ligaron en relación 3:1 y 5:1 (inserto:vector) utilizando Ligasa I (invitrogen). Estas ligaciones se utilizaron para transformar bacterias stbl3 (invitrogen).

## *Secuenciación de ADN*

Los siRNA clonados en los vectores lentivirales así como también los productos de amplificación por PCR en tiempo real para SPARC y el vector conteniendo la secuencia de SPARC de ratón, fueron secuenciados en el servicio de secuenciación provisto por la Fundación Instituto Leloir, utilizando cebadores específicos para cada fragmento a analizar.

## *Producción de lentivirus*

Para la producción de los vectores de lentivirales se transfectaron $5x10^6$ células 293FT con los siguientes plásmidos y cantidades por placa $100mm^2$: pRNATin H1.4/lenti 51, lenti 52-1 o sus respectivas secuencias scramble(Genscript) (8μg), Gag/pol (12 μg), Env (VSV-G) (2 μg) y Rev (5 μg) utilizando 25 μl de lipofectamina 2000 (Inivtrogen). Al día siguiente se cambio el medio y el sobrenadante conteniendo los lentivirus se colecto cada 12 horas desde las 24 hasta las 72 horas post transfección. Cada lote de medio conteniendo los virus se centrifugó a 1200 rpm, se filtró por 0,22 μm y se almacenó a -80ºC hasta su utilización

## *Transducción de células IBH-6 y 4T1 con los vectores lentivirales*

Se sembraron 100.000 células IBH-6 pasaje 32 y 100000 células 4T1 pasaje 20 en multipocillos 6 hoyos, a las 4 horas cada hoyo se transdujo con un 1ml de medio conteniendo los vectores lentivirales, L. 51, L.52-1 o sus respectivos controles SCR utilizando polybrene (8μg /ml). Se

repitió la transducción a las 24 horas. A las 48 horas posteriores a las primer transducción se seleccionaron las células transducidas utilizando G418 (300μg/ml). Luego de 15 días selección se procedió a la amplificación y almacenamiento de las líneas IBH-6 L.51, IBH-6 L.SCR 4T1 L.52-1 y 4T1 L.SCR.

# Clonado de la secuencia de SPARC de ratón en un vector de expresión

El mensajero de SPARC de ratón fue obtenido a partir del ADN copia de la línea 4T1, para amplificar dicho mensajero se utilizaron los cebadores detallados en la Tabla 40 que además poseían los sitios de corte de las enzimas SacI y BamHI para posteriormente clonarlo en el vector pCDNA6 (Invitrogen). Para ello, el Fragmento de PCR de 938 pares de bases fue purificado, cortado con las enzimas SacI y BamHI al igual que el vector pCDNA6 y purificado nuevamente para su posterior ligación.

**Tabla 40 secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el mensajero completo de SPARC de ratón**

| | |
|---|---|
| mSP completo Se | AtgAggGccTgAtcTtcTttCtcC |
| mSP completo As | TtaGatCacCagAtcCttGttGatGtcC |

# Western blot de medios condicionados y extractos celulares

## *Obtención de medios condicionados*

Cuatro millones de células IBH-6 L.SCR o L.51, 4T1 L.SCR o L.52-1 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 D-MEM F-12 o RPMI según corresponda sin suero y se colectó el medio condicionado 24 hs después. La colección de cada medio condicionado se realizó independientemente 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 I). 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.

### *Cuantificación de proteínas totales en medios condicionados*

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

### *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 I). Finalmente, las muestras fueron cuantificadas con el 2D Quant Kit.

## *Western blot*

Para confirmar la expresión diferencial de SPARC y otras proteínas en los sobrenadantes o extractos celulares de las líneas celulares IBH-6 SCR o L.51, 4T1 SCR o L.52-1, se llevaron a cabo *western blots* revelados con anticuerpos específicos. Para ello se sembraron 5μg de cada muestra de medios condicionados concentrados(obtenida según se describió anteriormente),o 30-40 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 resolutiva 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 (DevelopmentalStudies Hybridoma Bank); anti mSPARC (R&D) 1/500 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.

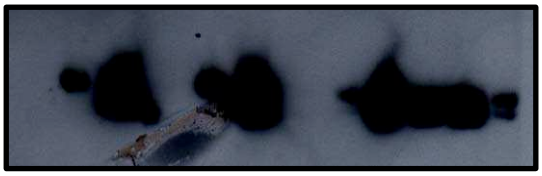
Luego la membrana fue incubada por 40 minutos a temperatura ambiente con una solución 1:200 de IgG de cabra con especificidad anti-IgG de ratón, conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson); o 1:200 de IgG de cabra con especificidad anti-IgG de conejo, conjugada a peroxidasa de rábano picante (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 IBH-6 SCR o 4T1 SCR.

## Purificación de SPARC a partir de medio condicionado de células de melanoma humano, A375

Para la obtención de entre 0.8 y 1 mg de proteína con más de un 85% de pureza, se utilizó el método descripto por Lopez-Haber ( Lopez-Haber et al., 2008). Brevemente, se parte un litro de medio condicionado de células de melanoma humano A375. El medio se concentra no más de seis veces utilizando una membrana con un cut off de 10KD. Se dializa en buffer tris20mM pH7.9 durante 24 horas con 3 cambios, y se pasa por una columna de intercambio iónico Hi-Trap Q HP 5ml, utilizando el equipo AKTA. Se colectan las fracciones y se someten a western blot y marcación de proteínas totales para seleccionar las fracciones con mayor cantidad de SPARC. (Figura 78)

**C6 C5 C4 B7 B6 B5 A5 A4 A3 Dialz Conc Pre**



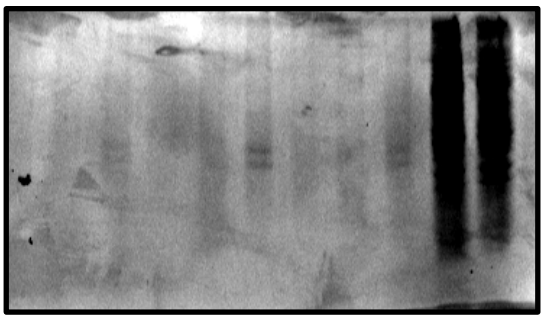
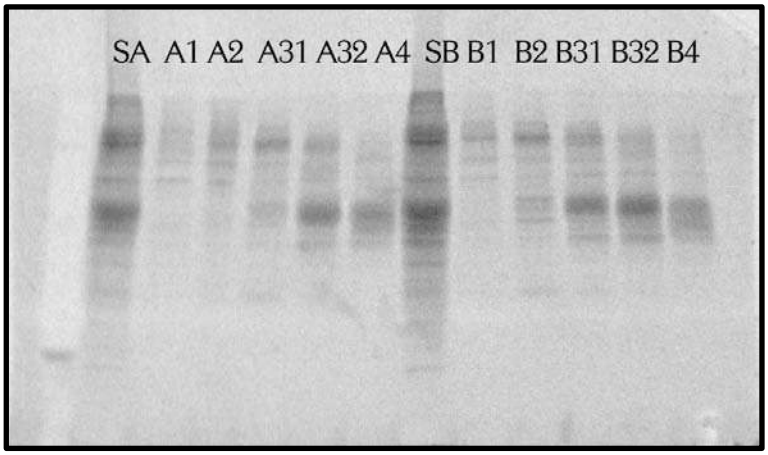


**Figura 78 Imagen representativa de la cantidad de proteínas (panel superior) y de SPARC (panel inferior) contenidas en las distintas fracciones colectadas de la columna de intercambio iónico. En la parte superior se señalan las fracciones sembradas y al final se sembró el dializado, concentrado y medio sin concentrar.**

Una vez seleccionadas las fracciones con mayor cantidad de SPARC, se vuelve a concentrar utilizando un concentrador vivaspin (Sartorius) con un cut off de 10KDa, para llevar a 1ml e intercambiar a buffer TE. Finalmente se pasa por un tamiz molecular utilizando la Columna S-200, y la selección de la fracción final se realiza por Western blot y marcación de proteínas totales. (Figura 79). Las fracciones seleccionadas se concentran en PBS hasta llegar a 0.8 a 1mg/ml de proteína.



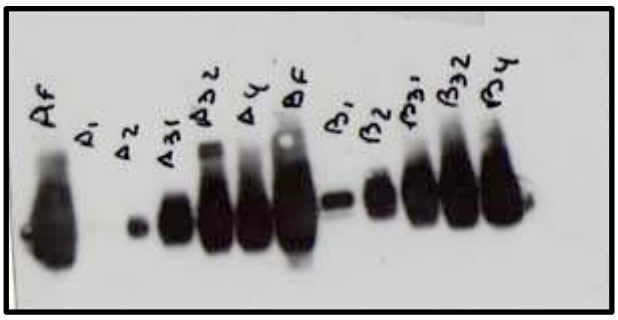



**Figura 79 Imagen representativa de proteínas totales (panel superior) y SPARC (panel inferior) utilizada en los ensayos**

# Obtención de ARN para experimentos de PCR en tiempo real y de microarreglos de ADN.

## *Obtención de ARN*

Se purificó ARN de una placa de 100 $mm^3$ al 70% de confluencia de las líneas celulares utilizando el kit de G&E Illustra ARN miniSpin. Los ARNs fueron almacenados en agua a -80º hasta el momento de su utilización.

Para la obtención de ARNs de tejidos se utilizó el kit de purificación de ARN de Quiagen. Se extrajeron los tumores implantados en la glándula mamaria o las metástasis pulmonares bajo condiciones de esterilidad utilizando material quirúrgico libre de ARNasas, las piezas de tumores se pesaron y en caso de pesar más de 20 mg se fragmentaron. Posteriormente se agregaron 350 μl buffer de lisis, de acuerdo a las especificaciones del kit de purificación de ARN de Quiagen. Para homogeneizar el tejido se utilizó el equipo Prescellys24 utilizando 3 ciclos a 6500 rpm de 10 segundos cada uno. El homogenato obtenido conteniendo los ARNs se procesó según el protocolo descripto por el fabricante.

## *Cuantificación y control de calidad del ARN*

Los ARNs obtenidos a partir de líneas celulares y de tejidos, fueron cuantificados utilizando el espectrofotómetro a pequeña escala Nanodrop ND-1000 (Nanodrop). Para los ARN obtenidos a partir de líneas celulares, la integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa 1% (Figura 80) y por evaluación de la relación entre las absorbancias 268/280, si la misma es mayor a 1,7 y

se ven bien definidas las bandas de 14 y 28s en el gel, el RNA está apto para ser retrotranscripto.

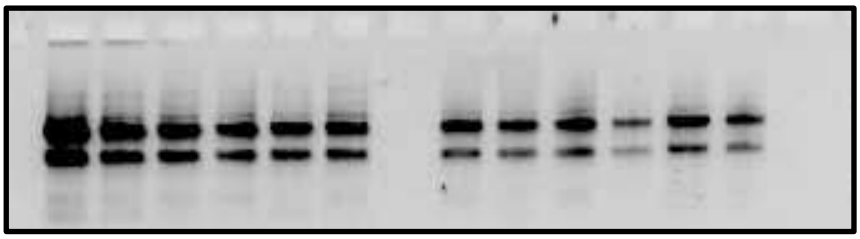


**Figura 80 Imagen representativa de la calidad del ARN utilizado para las reacciones de PCR en tiempo real**

Para los ARNs utilizados en los ensayos de microarreglos de ADN el control de calidad se realizó mediante la plataforma para análisis de micro fluidos Bioanalyzer (Agilent). Este método está basado en los principios tradicionales de la electroforesis de ácidos nucleicos pero se hace en un chip. El formato de este chip reduce drásticamente el tiempo de separación así como el consumo de muestra.

El chip se compone de 16 pocillos. Todos los pocillos están interconectados. 3 pocillos están destinados a la mezcla gel-colorante que se intercala entre las bases del ARN y permite hacer el seguimiento de la movilidad en el gel a partir de la medición de fluorescencia. 1 pocillo está destinado al marcador de peso molecular (ladder).

En los 12 pocillos restantes es donde se siembran muestras. Las muestras se siembran junto con un Marker que normaliza posibles variaciones en el corrimiento de las muestras, señalando el inicio de la corrida.

Cada uno de los 16 pocillos va a tomar contacto con un electrodo (hay 16 electrodos) y cada electrodo está conectado a una fuente independiente. Las moléculas cargadas de ARN se mueven por el voltaje aplicado. Las moléculas del colorante se intercalan entre las moléculas de ARN y son detectados por fluorescencia inducida por láser (LIF). Todo este proceso se monitorea en tiempo real a partir de la medición de florescencia que da cuenta de la cantidad de moléculas de ARN de 28 y 18s. A partir de los datos obtenidos, se utiliza un algoritmo denominado RNI que representa la calidad del ARN. Según los protocolos estándares, solo

serán utilizados en los ensayos de microarreglos aquellas muestras que posean un RIN mayor a 6. El equipo permite visualizar los datos a partir de gráficos de intensidad de florescencia en función del tiempo, y en forma de gel virtual correspondiente a una corrida del ARN en un gel de agarosa. (Figura 81).

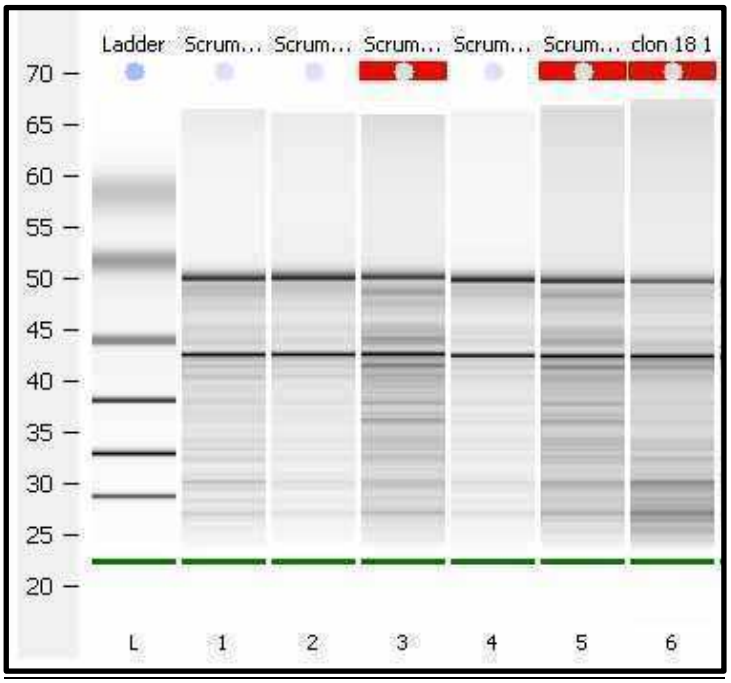



**Figura 81 Imagen representativa de un electroferograma donde el ARN presenta RIN mayores a 6.**

## *Retrotranscripción y cuantificación del ADN copia para RT-PCR y PCR en tiempo real.*

Dos µg de ARN fueron retro-transcriptos utilizando 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) y 500 ng de cebadores oligo dT. Posteriormente se procedió a la degradación alcalina del ARN sometiendo a las muestras a un tratamiento con NaOH durante 0 minutos a 65°C. Luego los ADN copia fueron precipitados con acetato de sodio y etanol y finalmente resuspendidos en agua para ser cuantificados.

En el caso de que los ADN copia fueran utilizados para PCR en tiempo real previamente fueron cuantificados utilizando el reactivo Oligreen (Invitrogen). Este reactivo fluorescente, se intercala entre las moléculas de ADN copia de manera proporcional a la concentración. Brevemente se

prepara una curva de calibrado con un ADN copia de concentración conocida que va de 0 a 100ng/ μl. Se prepara una dilución del reactivo Oligreen 1/200 en buffer TE. En una placa de 96 pocillos negra, se siembran 100μl de TE, 1 μl de muestra o punto de la curva de calibrado y 100 μl de Oligren. Luego se mide fluorescencia en un espectrofotómetro a 485/535 nm. Se grafica la curva de calibrado y se calcula la concentración de la muestra por extrapolación de los puntos. Cada medición se realiza por duplicado.

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 Mg2Cl, 2.5 mg BSA, 0.01% Glicerol, 200 mM of dNTPs, 0.3 X solución SYBR Green y 0.4 mM de cebadoresespecíficos**.** 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 fueron normalizados con los obtenidos para HPRT o $B_2M$ y expresados como fracción de los niveles de expresión de la línea control SCR que fue seteada como valor de referencia 1.0 para cada gen estudiado.

| **Gen** | **Secuencia sentido** | **Secuencia anti sentido** |
|---|---|---|
| **SPARC** | AACCGAAGAGGAGGTGGT | GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA |
| **Twist** | GCTATGTGGCTCACGAGC | GAAACAATGACATCTAGGTCTCCG |
| **MMP3** | AGCATCCCCTGATGTCCTCGTGG | TTGCGCCAAAAGTGCCTGTCTTT |
| **$B_2M$** | ATTCACCCCCACTGAGACTGA | CTCGATCCCAGTAGACGGTC |
| **Actina** | AGAAAATCTGGCACCACACC | CAGAGGCGTACAGGGATAGC |
| **HPRT** | AGACTGAAGAGCTATTGTAAT | CAGCAGTCTGCGACCTTGAC |

**Tabla 41Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de PCR.**

Para amplificar selectivamente por PCR SPARC humano y de ratón se utilizaron los cebadores señalados en la Figura 82, siguiendo el protocolo de PCR convencional.

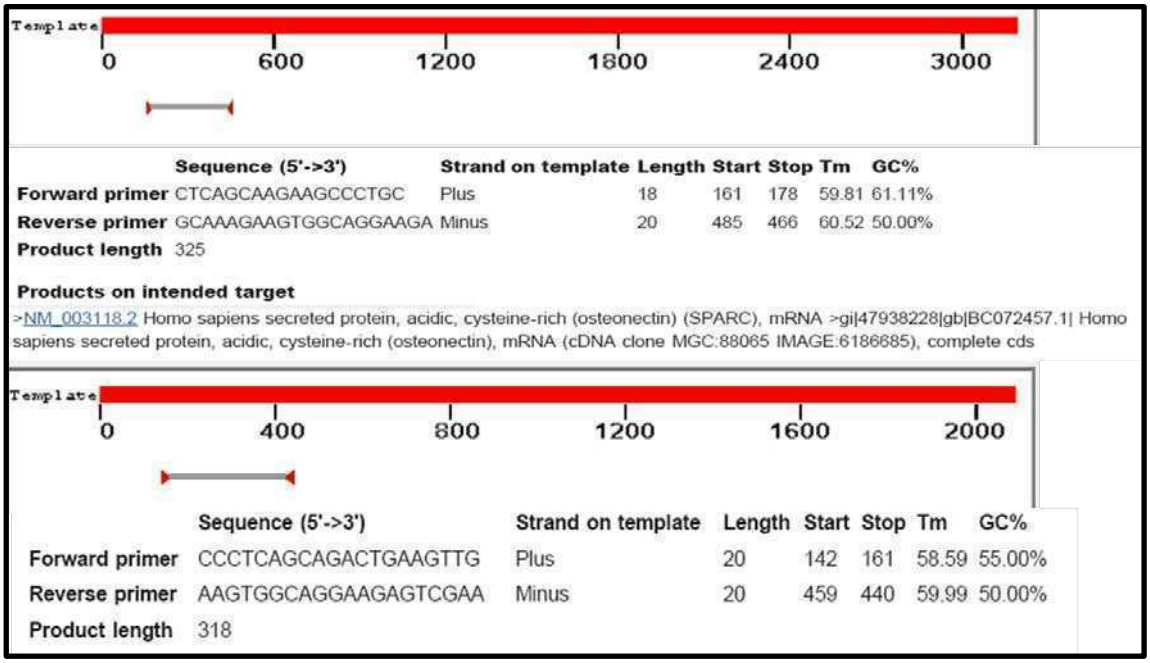



**Figura 82 Esquema de los cebadores utilizados para amplificar SPARC humano o de ratón y las regiones de los mensajeros a las cuales se unen**

## *Ensayos de microarrelgos de ADN*

**Marcaje e hibridación del microarreglo**

Para la amplificación y marcaje del ARN, se utilizó el kit comercial SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como templado de cada reacción se utilizó 1μg de RNA total proveniente de las líneas celulares, los tumores primarios o metástasis

Los vidrios utilizados para la hibridación fueron 48,5K The Murine Exonic Evidence Based Oligonucleotide (MEEBO) (Microarray Inc, Huntsville, USA), desarrollados por Universidad de Stanford e Illumina. Estos vidrios están constituidos por un set 39.000 sondas, que codifican para secuencias exonicas y splicing alternativos.

La sonda de hibridación correspondió a 60 pmoles de aRNA de referencia, que consistió en una mezcla de todas las condiciones a ensayar, marcado con Alexa Fluor 555 y 60 pmoles de aRNA de la condición experimental marcado con Alexa Fluor 647 en un volumen final de 50μl con 1X buffer de hibrididación (SSC 5x, formamida50%, SDS 0,1%, DNA esperma de salmón 0.01%). Esta mezcla fue incubada por 2 min a 95 ºC y se aplicó al vidrio previamente incubado con SSC 5x, SDS 0,1% y 0,1% BSA por 30 min a 50°C. La hibridación se realizó en una cámara humedecida con SSC 2X (InSlide Out) durante 16 horas a 42°C. Tras la hibridación, los vidrios fueron lavados una vez por 5 min a 42°C con SSC 2x, SDS 0,1% y 5 min a temperatura ambiente con SSC 0,1x, SDS 0,1% y 2 veces por 1 minuto con SSC 0,1x. Finalmente, los vidrios fueron secados por centrifugación y escaneados con el scanner Axon Genepix 4000b, a 532 y 635 dmp .La intensidad de la señal de fue cuantificada con el SoftwareGenepix Pro 6.1, utilizando el archivo GPR correspondiente el modelo de microarreglos de ADN utilizado (Mouse MI ReadyArray49K Mouse Genomic Array).

Nuestro diseño experimental para el experimento de microarreglo *in vitro* contó con 4 réplicas biológicas de cada línea celular (SCR o clon 18); en nuestro experimento de microarreglo *in vivo* utilizamos también 4 réplicas biológicas (tumores generados por la línea SCR o clon 18, y metástasis pulmonares generadas a partir del tumor SCR). Cada muestra, fue marcada con el fluoróforo Alexa 555 (verde). Como referencia se utilizó una mezcla de todas las muestras utilizadas en el experimento marcada con el fluoróforo Alexa 647 (rojo). En total se utilizaron 8

microarreglos para experimento *in vitro* y 12 para el experimento *in vivo*, cada uno de los cuales fue hibridado durante toda la noche con 60 pmoles de la correspondiente muestra biológica más 60 pmoles de referencia.

**Análisis de datos**

El procesamiento y análisis de los datos obtenidos fue realizado en Universidad Católica de Córdoba por el grupo de minería de Bio-Datos dirigido por el Dr. Elmer Fernandez.

Antes de comenzar con el análisis estadístico de los genes diferenciales se realizó la normalización de los resultados utilizando el paquete Limma (Smyth, 2003) en lenguaje R, (www.r-project.org) disponible en Bioconductor (www.bioconductor.org). Luego se definieron los genes diferencialmente expresados mediante análisis estadísticos basados en modelos lineales mixtos. Se utilizó el consenso entre los valores p de las muestras sin normalizar entre chips, normalizando vía estandarización de escala y normalizando entre chips por cuantiles(deg.consenso=deg.cy3.noscale & deg.cy3.scale & deg.cy3.quantile) y un $p<0.05$, como criterios de corte que definieron a un gen como “diferencial”.

El preprocesamiento de las intensidades crudas se realizó utilizando el lenguaje R y paquetes de Bioconductor [R Development Core Team et al. 2009, Gentleman et al. 2004,]. Los spots que según el fabricante se encuentran saturados y/o que no se encuentran presentes en al menos la mitad de las réplicas biológicas de cada grupo experimental, no han sido consideradas en el análisis. Posteriormente se normalizaron las intensidades entre los vidrios, a los efectos de lograr que sean comparables utilizando el método de “quantile” y “scale”. La obtención de genes diferencialmente expresados entre las condiciones experimentales fue realizada a partir del consenso obteniendo para los dos tipos de normalizaciones utilizadas. Para ello se generó un modelo lineal moderado por Bayes con el paquete Limma [Smyth 2004] para cada tipo de normalización. Luego, se aplicó la corrección de Benjamini & Hochberg (BH)[Ref] sobre los p-valores. Finalmente se fijó un umbral de corte sobre los valores p ajustados y veces de cambio de expresión mínima a los efectos de obtener una cantidad manejable de genes. Adicionalmente se construyeron los correspondientes mapas de calor utilizando distancia euclídea sobre los valores crudos de los genes candidatos (previo normalización “scale”), a los efectos de comprobar visualmente si el agrupamiento inducido

lograba separar las condiciones experimentales. En todos los casos se logró una correcta separación.

Una vez obtenidos los genes diferenciales, se utilizó la plataforma DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) [Dennis et al 2003, Huang et al. 2007] para realizar el correspondiente análisis de enriquecimiento bajo la metodología conocida en la literatura como "Set Enrichment Analysis" [Khatri et al. 2005, Huang et al. 2009]. En esta oportunidad se utilizó la notación completa de la ontología de Gene Ontology (GO, Ashburner et al. 2000) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG, REF), obteniendo los correspondientes "Functional Chart" completos, utilizando como referencia la lista de genes del chip y la del genoma (Fresno Cristóbal, 2011). A fin de favorecer el análisis de los resultados ontológicos, los resultados fueron integrados con el lenguaje R y paquete "GOStats" [Falcon & Gentleman 2007] a los efectos de utilizar la propia estructura de grafos de GO cada categoría principal de GO (BP, MF y CC). En cada uno de los grafos, los conceptos/términos biológicos se encuentran representados por nodos que poseen genes anotados con dichas funciones. A su vez, los nodos se encuentran relacionados entre ellos mediante relaciones del tipo "es un" o "es parte de" formando una estructura jerárquica por niveles. Así la raíz es el término más genérico (BP, MF o CC) y contienen la totalidad de los genes anotados. Luego a medida que descendemos en el grafo, los términos se tornan cada vez más específicos y por ello se reduce la cantidad de genes asociados a ellos. En este sentido, resulta útil emplear un patrón de colores para aquellos términos enriquecidos por el diseño experimental, es decir, que posean un p-valor $< 0.05$. A su vez, se generaron vistas complementarias para el cada uno de los grafos, donde cada nodo se representó con un diagrama de secciones, representando visualmente la proporción de genes integrantes de dicho nodo que se encontraron sobre o subexpresados. Estos resultados se integran en un reporte HTML interactivo que permite tener rápidamente una visión funcional global del experimento, para focalizar nuestra atención sobre aquellos nodos enriquecidos con mayor grado de especificidad (nodos terminales u hojas de una rama). Por otra parte, en el caso de la inspección de las vías metabólicas de KEGG se generaron tablas HTML de resumen de información, a los efectos de obtener vías candidatas para su exploración; realizando una posterior inspección desde DAVID.

# Generación de la colonia de ratones transgénicos Nu/Nu SP+/+ y SP-/-

Los ratones Nu/Nu SP-/-, fueron generados por la Dra. Koblinsky insertando dos cassettes de resistencia a neomicina en el gen de SPARC en ratones de la cepa C57 BL que posteriormente fueron retrocruzados con ratones de la cepa Nu/Nu para obtener ratones nude SP-/- .Recibimos como donación tres hembras y un macho SP-/-los cuales fueron a su vez nuevamente retrocurzados con ratones de la cepa Nu/Nu para obtener los ratones nude SP+/+ y SP-/- con el mismo fondo genético.

## *Genotipificación de los animales*

Para la genotipificación se obtuvo ADN genómico a partir del tratamiento de un trozo de 2mm de la cola de los animales utilizando 180ul de una solución de lisis (Ver receta en el AnexoI) durante 4-5 horas a 55 grados. Posteriormente las colas fueron sometidas a 95 grados por 10 minutos para inactivar la proteinasa K.

Las reacciones de PCR para genotipificar los ratones nude se hicieron con 2ul de ADN genómico utilizando los siguientes cebadores (Tabla 42)

**Tabla 42 Secuencias de los cebadores utilizados para la genotipificación de ratones Nu/Nu SP-/- para SPARC**

| | |
|---|---|
| **SPARC for** | Gatgagggtctggcccagccctagatgcccctcac |
| **SPARC Rev** | Cacccacacagctgggggtgatccagataagccaag |
| **Neo Rev** | Gttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacccag |

Y el siguiente programa

1min 96ºC
45´´ 96ºC } 40 ciclos

45´´ 70ºC

6min. 74ºC

10 min. 74ºC

Los productos de PCR esperados son de 296pb para ratones WT y de 450pb para ratones SP-/- (Figura 83)

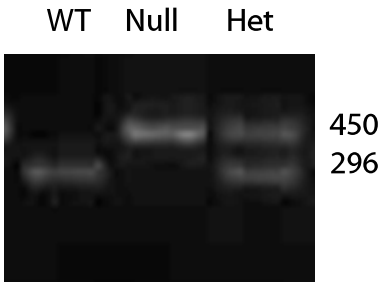



**Figura 83 Resultado de la PCR de tres ratones con genotipo WT, Null y heterocigota**

# Experimentos *in vivo*

## *Condiciones experimentales de crecimiento tumoral*

Ratones atímicos N:NIH(S)-nude mice de 8 a 10 semanas de edad, recibieron una inyección en la glándula mamaria de 10 x $10^6$ células IBH-6 (L.SCR o L.51) un volumen total de 100 µl. Se estudiaron 6 ratones por tipo celular ensayado. Ratones de la cepa Balb/C fueron inoculados con 200000 células 4T1 (L.52-1 o L.SCR) en la glándula mamaria en un volumen total de 100 µl.

Se evaluó el crecimiento tumoral utilizando un calibre y se calculó el volumen utilizando la siguiente fórmula $Dxd^2/2$ donde d es el diámetro menor y D es el diámetro mayor.

Los animales fueron sacrificados a los 35 días post inoculación de las células por dislocación cervical para el caso de los ratones inyectados con la línea 4T1 o cuando alcanzaron el tamaño tumoral de 2 $cm^3$, momento en el cual fueron sacrificados de acuerdo a las normas aprobadas por las CICUAL.

Los tumores y trozos de órganos fueron fijados en Paraformaldehído 4% a las 48hs, 72hs, 7 y 20 días post inyección y procesados para su posterior análisis histológico.

### *Marcación de las células con CMDiI*

24 horas antes de inocular las células, las mismas fueron marcadas con el colorante CMDiI (invitrogen), un colorante fluorescente supravital que se une a grupos tioles presentes en péptidos y proteínas de la membrana celular. Para la marcación se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y agregaron 6 ml de medio fresco conteniendo una dilución de 5 μl de CMDiI en 100 μl de PBS Al día siguiente se lavaron y resuspendieron. Posteriormente se inyectaron 50000 células directamente en la vena de la cola y luego de 24 horas se verificó que las células hubieran llegado al pulmón. Para ello se anestesiaron los animales y se midió la señal fluorescente del CMDiI utilizando un bioluminómetro.

### *Ensayo de metástasis experimentales*

Para los ensayos de metástasis experimentales se marcaron las células con CMDiI y se inyectaron 100000 células resuspendidas en 50 μl en la vena de la cola de hebras de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad. A las 24 horas se controló que las células no hayan quedado retenidas en la cola a partir de la medición de la señal fluorescente emitida por las células utilizando el bioluminómetro Xenogen Ivis Lumina II.

### *Detección de células circulantes utilizando el bioluminómetro*

Los animales fueron anestesiados utilizando isofluorano en cámara de anestesia. Luego fueron colocados en la plataforma del equipo y se tomaron imágenes de la señal fluorescente utilizando el filtro de 553nm.

### *Fijación de pulmones con Bouin*

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los pulmones para ser fijados en solución de Bouin (ver receta en el Anexo I) durante 24 horas. Luego los pulmones fueron lavados varias veces en etanol 70% para eliminar los restos de ácido pícrico y se procedió al recuento de metástasis visibles y posterior inclusión en parafina para detección de micrometástasis.

## Inmunomarcaciones y tinciones histológicas

### *Inmunocitoquímica*

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células IBH-6 (SCR o L.51) y 4T1 (SCR o L.52-1) 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 anti-SPARC humano (R&D Systems) o anti-SPARC murino (R&D Systems)diluidos 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-raton conjugado con el fluoróforo Cy3 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).

### *Inmunohistoquímica*

**Preparación de las muestras incluidas en parafina**

Los tumores sólidos fueron disectados post-eutanasia mediante dislocación cervical. Dependiendo del tamaño, la muestra fue seccionada para su mejor fijación en formol 4% diluido en PBS. En el caso de necesitar muestras crio preservadas el 50% del tumor fue separado para dicho protocolo (Ver más adelante muestras incluídas en OCT). El tiempo de fijación fue estandarizado en 6hs y el volumen de fijador utilizado correspondió al 40% del volumen de la

pieza. Luego fueron embebidos en parafina, siguiendo protocolos clásicos y fueron cortados en láminas de 8 µm para su posterior análisis histológico.

Se evaluaron cortes tumorales de 8 µm de espesor obtenidos de tumores de IBH-6 (L.SCR o L.51) a las 48hs, 72hs, 7 y 20 días post inyección. Estos cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados en gradiente de etanol.

**Tinción Inmunohistoquímica**

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 humana (R&D Systems). 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 (VectorLaboratories), 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.

## *Inmunohistoquímica de las muestras incluidas en OCT*

Como se mencionó anteriormente, un 50% de cada tumor fue separado para realizar inmuno marcaciones con anticuerpos que no son compatibles con el procesamiento de parafina. Para el

caso de la detección de CD31 y de Ki-67, los tumores fueron fijados en PFA 4% en PBS por 3hs, luego se pasaron a sacarosa 30% y se incubaron durante toda la noche 4º. Posteriormente se incluyeron en OCT y ser almacenó a -20º. Mediante la utilización de un criostato se cortaron secciones de 9 μm de espesor y se montaron sobre portaobjetos gelatinizados. La rehidratación de las muestras se realizó en diluciones seriadas de etanol y. Para la recuperación antigénica se realizó una digestión de 3 min. En pepsina (0,1mg/ml final). Luego de retirar la pepsina y hacer dos lavados con PBS se bloquearon los sitios de pagado inespecífico con PBS 10% suero de cabra durante 1hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados toda la noche con el anticuerpo anti CD31 (PharMigen) a una dilución 1/600 o con el anticuerpo anti KI-67 (Dako) a una dilcuión 1/100. Luego de los lavados las secciones fueron incubadas con una dilución 1/400 de un anticuerpo biotinilado anti-Rata hecho en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories) para el caso de CD31 y anti-Conejo hecho en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories). La amplificación de la señal y el revelado de la reacción se realizaron siguiendo las indicaciones anteriormente descriptas. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá. El control del primer anticuerpo de todas las inmunohistoquímicas fue realizado mediante una incubación en PBS.

### *Ensayo control de especificad del anticuerpo de SPARC por bloqueo con la proteína*

La especificidad de la señal del anticuerpo contra SPARC se evaluó bloqueando el anticuerpo con la proteína SPARC purificada de medio condicionado de células de melanoma, para ello se incubaron 5μg de anticuerpo con 20μg de SPARC o Seroalbumina bovina como control, en PBS tritón durante una hora y media a 37°C. Luego se centrifugó a máxima velocidad a temperatura ambiente durante 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para realizar la tinción inmunhistoquímica.

### *Tinción Inmunoflourescente*

Para cuantificar macrófagos y neutrófilos se utilizaron cortes 8 μm de espesor d tumores embebidos en OCT. Luego de realizar los cortes de los tumores en el criostato, los mismos fueron mantenidos a -20 °C hasta su utilización. Para realizar la tinción inmuno fluorescente, los cortes se dejan 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloquearon durante

30 minutos a temperatura ambiente en PBS-tritón 0.05% con 10% de suero fetal bovino. Para cuantificar neutrófilos se utilizó el anticuerpo NIMP-R14 (abcam) y para cuantificar macrófagos se utilizó el anticuerpo Mac-1 (abcam)ambos en dilución 1/100 en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes fueron lavados 3 veces en PB-Tween 0.05% e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a cy3 en dilución 1/250 en PB. A partir de este punto todos los pasos se realizan protegidos de la luz. Luego, se lavaron nuevamente 3 veces con PB y se marcaron los núcleos con el colorante de Hoechst durante 30 minutos a temperatura ambiente en dilución 1/1000 en PB. Finalmente los cortes se lavaron 3 veces y se sellaron con cubreobjetos conteniendo Gelvatol.

### *Tinción tricrómica de Masson y cuantificación de colágeno*

Para la detección de colágeno total en los sitios de inyección las secciones fueron desparafinadas y teñidas con la coloración tricrómica de Masson siguendo el protocolo estándar. Para la cuantificación de la señal se tomaron entre 4 y 5 fotos por tumor de 3 tumores por tiempo y se utilizó un algoritmo implementado en el programa MATLAB que permitió determinar qué % de la foto tenía señal azul (correspondiente a la marca de colágeno) y qué intensidad de azul tenía dicha señal. (http://www.mathworks.com/products/matlab/tryit.html)

### *Tinción con hematoxilina-eosina*

Las secciones ya sean de parafina o de cortes por congelación, fueron sometidas según los protocolos estándares a la hidratación del tejido. Se incubaron durante 5 minutos en hematoxilina de Harris, se viraron por agua corriente y se pasaron por Eosina. Se procedió a la deshidratación y montaje según el tipo de muestra, siguiendo protocolos estándares.

## Estudios realizados con muestras de pacientes

### *Análisis histopatológico*

El análisis histopalógico estuvo a cargo de la Dra Ines Bravo, directora del área de inmnupatología del Hospital interzona Eva Perón de San Martín. Para el diagnóstico de las

pacientes se tuvo en cuenta la clasificación WHO (World Health Organization: classification of tumours breast) y el grado histológico de acuerdo a Nottingham- Histologic score.

## *Datos analizados*

La información de cada una de las muestras analizadas se organizó de la siguiete manera: Orígen del tumor: ductal o lobulillar; evolución del tumor: In situ o infiltrante; Expresión de SPARC: Intensidad de la expresión de la proteína y porcentaje de área positiva; Localización: Nuclear/citoplasmática; estroma: SPARC positivo o negativo para fibroblastos y endotelio; respuesta inflamatoria: Presencia o ausencia de polimorfos nucleares y linfocitos peritumorales ; Metástasis ganglionares: Positivo o negativo; Cuantificacion de los ganglios : Número de ganglios positivos o negativos en función de los ganglios aislados. Ver tabla con los datos completos en el anexo.

## *Procesamiento de las imágenes*

El procesamiento de las imágenes estuvo a cargo de Maximiliano Neme, encargado del área de microscopía de nuestro instutito.

Las imágenes fueron procesadas por medio de un algoritmo implementado en MatLab, una plataforma para computación numérica y visualización de datos. Su elemento básico de trabajo son las matrices con las que se pueden describir diferentes objetos de una forma flexible y matemáticamente eficiente, las imágenes se almacenan como arreglos bidimensionales (matrices) en los cuales cada elemento de la matriz corresponde a la intensidad de un pixel de la imagen.

Las imágenes color son transformadas a imágenes binarias donde cada a cada pixel se le asigna un valor 1 ó 0 según el pixel sea positivo o negativo para el color analizado. En caso de ser positivo, ese pixel será blanco y en caso de ser negativo será negro. En la Figura 84, se muestra un ejemplo de una tinción inmunohistoquímica contra SPARC y cómo queda la imagen, luego de ser procesada para la cuantificación de la señal. Se realizó un procesamiento similar para el análisis de colágeno. De cada imagen se obtuvo la intensidad de la señal, el porcentaje de área marcada y el desvió estándar de ambas mediciones.

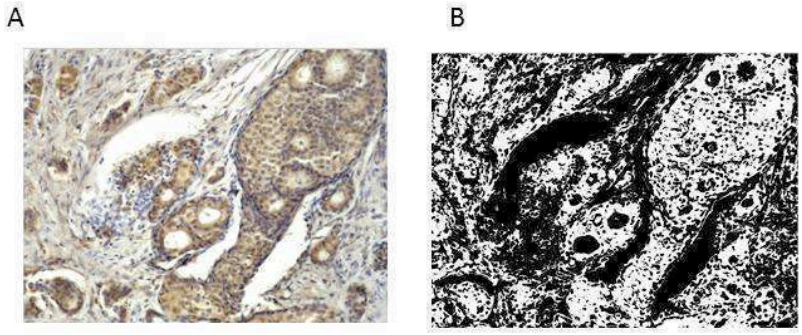



**Figura 84 Procesamiento de las imágenes para cuantificar la intensidad de la señal y el porcentaje de área marcada.** A- Imagen de una marcación inmunohistoquímica para SPARC en un tumor de mama ductal infiltrante. B- Transformación binaria de la señal, los pixeles marrones se convirtieron en blancos y el resto de los colores se transformaron a negro.

### *Análisis estadístico*

El análisis de los datos estuvo a cargo del Dr. Elmer Fernandez, director del área de Bio-Minería de datos de la Universidad Católica de Córdoba. Para analizar los datos, se utilizó una herramienta no paramétrica de clasificación a partir de un modelo de árboles binarios de decisión (Quinlan, 1996).

## Ensayos *in vitro*

### *Ensayo de migración en fibronectina o invasión en Matrigel*

Los ensayos de invasión en Matrigel o migración en fibronectina 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 ocluídos por incubación con Matrigel 0.5 mg/ml o fibronectina (Becton Dickinson) a 37º durante 60 minutos. La suspensión celular fue cargada en los pocillos del compartimento superior mientras que en el pocillo inferior se agregó medio de cultivo suplementado con diferentes % de suero fetal bovino a modo de quimioatractante.

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 está enriquecido en proteínas de la membrana basal como colágeno IV, laminina y entactina. Estas proteínas también son las que 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.

Luego de 5 o 7 hs las células que lograron invadir mediante la degradación proteolítica del Matrigel o migraron a través de la fibronectina 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 representó 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.

## *Ensayos de invasión en esferas de Matrigel*

Se realizó una adaptación de la técnica publicada recientente (Wiggins and Rappoport, 2010). Experimentalmente el ensayo consiste en sembrar en placas de 6 pocillos 5 gotas de 10ul de Matrigel por pocillo, una vez solidificado el Matrigel se agregaron 250000 células. Luego de 48 horas se fijaron las células con Paraformaldehído 4% y los núcleos se marcaron con colorante de Hoechst. Se tomaron 4 fotos de cada gota de Matrigel y se cuantificó el número de células que invadieron la gota utilizando el programa ImageJ

## *Ensayos de proliferación in vitro*

La proliferación de las células in vitro crecidas sobre plástico se realizó mediante el método colorimétrico del MTS (Promega).

El ensayo se basa en la conversión del MTS a formazán soluble por acción de la enzima dehidrogenasa presente en células metabólicamente activas. La medición de formazán a 490 nm es directamente proporcional al número de células viables. Experimentalmente el ensayo consiste en sembrar entre 500 y 1000células por pocillo en policubetas de 96 pocillos en un volumen final de 100μl de medio de cultivo adecuado. Al momento del análisis, se agregaron 20 μl de MTS/PMS preparado según las especificaciones del fabricante a cada pocillo conteniendo 100 μl de medio de cultivo. Luego de tres horas de incubación, la DO de cada pocillo fue leída en un lector de Elisa de microplacas a 490nm. Cada condición experimental fue realizada por cuadruplicado.

### *Citometría de flujo*

Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y se fijaron con 100% de etanol a -20˚C. La tinción se realizó con 50 µg/ml de ioduro de propidio con el agregado de 100 µg/ml de RNasa Alibre de DNasas y 0,1% de Tritón X-100, durante 30 min a temperatura ambiente y enoscuridad. Luego del pasaje por el citómetro utilizando, se analizaron los datos utilizando el programa Summit.

### *Marcación con BrdU*

Se sembraron alrededor de 12.000 células de cada línea sobre vidrios en placas de 24 pocillos. Luego de 24 horas, las células fueron tratadas con BrdU (5-bromo2'-deoxy-uridina) (Invitrogen) dilución 1/1000 durante 2 minutos y fueron fijadas con metanol a -20°C por 20 minutos e inmediatamente después fijadas con acetona por 40 segundos. A continuación se desnaturalizo con HCL 2.5N por 30 minutos y se permeabilizaron las células con tritón 0.1% 15 minutos a 4°C y se dejó bloqueando O.N con suero donkey. Para la detección del BrdU se realizó una tinción inmunofluorescente utilizando el anticuerpo primarios anti-BrdU (GE) dilción 1/500 y el anticupero secundario anti-mouse Cy3 (Jackson)dilucion 1/200. Posteriormente se marcó del núcleo de todas las células con el colorante de Hoechst. Se cuantificó el % de células positivas para BrdU/cs. totales.Se cuantificaron más de 150 núcleos por tratamiento.

### *Marcación con Histona H3 fosforilada*

Se sembraron la misma cantidad de células para cada línea celular en placas de 24 pocillos. 24hs mas tarde las células se fijaron con PFA 4% , se permeabilizaron con triton 0.1% durante 15 minutos a 4°C  y se dejó bloqueando O.N con suero donkey. Para la detección de la histona H# fosforilada se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-Histone H3(ser10), clone 3H10 (Millipore) dilución 1/500, y el anticuerpo secundario anti mouse Cy3 (Jackson) dilución 1/200. Luego se hizo una marcación de núcleo con Hoeshst. Se cuantificó el % de células positivas para H3(Ser10)/cs. Totales. Se cuantificaron más de 150 núcleos por tratamiento.

### *Análisis estadístico*

Los datos se expresaron como la media y su desvió estándar. Las comparaciones se realizaron mediando ANOVA de una vía y contrastes de Bonferroni. Previo a la realización del ANOVA, se comprobó que los datos cumplieran con los principios de normalidad y homocedacea. Los experimentos de crecimiento *in vivo*fueron analizados mediante un ANOVA de mediciones repetidas. El test t de student fue aplicado solamente para calcular la significancia estadísticasólo cuando se contrastaron dos condiciones. Para el análisis estadístico del recuento de metástasis pulmonares se uilizó Modelo POISON para variables discretas con correccion por exceso de ceros.

# Referencias bibliográficas

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.

Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K. H.*, et al.* (2004). Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. Cancer Research *64*, 844-856.

Arnold, S. A., Rivera, L. B., Miller, A. F., Carbon, J. G., Dineen, S. P., Xie, Y., Castrillon, D. H., Sage, E. H., Puolakkainen, P., Bradshaw, A. D., and Brekken, R. A. (2010). Lack of host SPARC enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma. Dis Model Mech *3*, 57-72.

Ascierto, M. L., Kmieciak, M., Idowu, M. O., Manjili, R., Zhao, Y., Grimes, M., Dumur, C., Wang, E., Ramakrishnan, V., Wang, X. Y.*, et al.* (2011). A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat.

Aslakson, C. J., and Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. Cancer Res *52*, 1399-1405.

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.

Balduyck, M., Zerimech, F., Gouyer, V., Lemaire, R., Hemon, B., Grard, G., Thiebaut, C., Lemaire, V., Dacquembronne, E., Duhem, T.*, et al.* (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis *18*, 171-178.

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.* (2005a). SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. J Biol Chem.

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.* (2005b). SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. J Biol Chem *280*, 36483-36493.

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*, 532-536.

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.* (2000). Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. Kidney International *57*, 117-128.

Beck, A. H., Espinosa, I., Gilks, C. B., van de Rijn, M., and West, R. B. (2008). The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma. Lab Invest *88*, 591-601.

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

Benaud, C., Dickson, R. B., and Thompson, E. W. (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. Breast Cancer Res Treat *50*, 97-116.

Bergamaschi, A., Tagliabue, E., Sorlie, T., Naume, B., Triulzi, T., Orlandi, R., Russnes, H. G., Nesland, J. M., Tammi, R., Auvinen, P.*, et al.* (2008). Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. J Pathol *214*, 357-367.

Bissell, M. J., and Hines, W. C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. Nat Med *17*, 320-329.

Boivin, G. P., O'Toole, B. A., Orsmby, I. E., Diebold, R. J., Eis, M. J., Doetschman, T., and Kier, A. B. (1995). Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice. American Journal of Pathology *146*, 276-288.

Bonnet, F., Perin, 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., 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*, 1569-1579.

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.

Bramwell, V. H., Pritchard, K. I., Tu, D., Tonkin, K., Vachhrajani, H., Vandenberg, T. A., Robert, J., Arnold, A., O'Reilly, S. E., Graham, B., and Shepherd, L. (2010). A randomized placebo-controlled study of tamoxifen after adjuvant chemotherapy in premenopausal women with early breast cancer (National Cancer Institute of Canada--Clinical Trials Group Trial, MA.12). Ann Oncol *21*, 283-290.

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*, 487-495.

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

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*, 7077-7091.

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. Gynecological Oncology *75*, 25-33.

Bruzzone, A., Vanzulli, S. I., Soldati, R., Giulianelli, S., Lanari, C., and Luthy, I. A. (2009). Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice. J Cell Physiol *219*, 477-484.

Bull Phelps, S. L., Carbon, J., Miller, A., Castro-Rivera, E., Arnold, S., Brekken, R. A., and Lea, J. S. (2009). Secreted protein acidic and rich in cysteine as a regulator of murine ovarian cancer growth and chemosensitivity. Am J Obstet Gynecol *200*, 180 e181-187.

Campo McKnight, D. A., Sosnoski, D. M., Koblinski, J. E., and Gay, C. V. (2005). Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. J Cell Biochem.

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.

Clezardin, P., Malaval, L., Ehrensperger, A. S., Delmas, P. D., Dechavanne, M., and McGregor, J. L. (1988). Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. European Journal of Biochemistry *175*, 275-284.

Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., and Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun *3*, 207-212.

Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M. F., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-β1 in vivo. Cell *93*, 1159-1170.

Chin, D., Boyle, G. M., Williams, R. M., Ferguson, K., Pandeya, N., Pedley, J., Campbell, C. M., Theile, D. R., Parsons, P. G., and Coman, W. B. (2005). Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. Int J Cancer *113*, 789-797.

Chlenski, A., Guerrero, L. J., Salwen, H. R., Yang, Q., Tian, Y., Morales La Madrid, A., Mirzoeva, S., Bouyer, P. G., Xu, D., Walker, M., and Cohn, S. L. (2011). Secreted protein acidic and rich in cysteine is a matrix scavenger chaperone. PLoS One *6*, e23880.

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.

Choi, B. K., Jung, J. H., Suh, H. Y., Yoo, Y. J., Cho, K. S., Chai, J. K., and Kim, C. K. (2001). Activation of matrix metalloproteinase-2 by a novel oral spirochetal species Treponema lecithinolyticum. J Periodontol *72*, 1594-1600.

Chung, C. Y., Murphy-Ullrich, J. E., and Erickson, H. P. (1996). Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. Molecular Biology of the Cell *7*, 883-892.

Chung, J., Gao, A. G., and Frazier, W. A. (1997). Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin αIIbβ3. The Journal of Biological Chemistry *272*, 14740-14746.

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.

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.

Defresne, F., Bouzin, C., Grandjean, M., Dieu, M., Raes, M., Hatzopoulos, A. K., Kupatt, C., and Feron, O. (2011). Preconditioned endothelial progenitor cells reduce formation of melanoma metastases through SPARC-driven cell-cell interactions and endocytosis. Cancer Res *71*, 4748-4757.

Denoix, P. F. (1959). [Methods of early diagnosis of human cancer]. Presse Med *67*, 15-17.

Desai, N., Trieu, V., Damascelli, B., and Soon-Shiong, P. (2009). SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients. Transl Oncol *2*, 59-64.

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*, 73-85.

Eckhardt, B. L., Parker, B. S., van Laar, R. K., Restall, C. M., Natoli, A. L., Tavaria, M. D., Stanley, K. L., Sloan, E. K., Moseley, J. M., and Anderson, R. L. (2005). Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. Mol Cancer Res *3*, 1-13.

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.

Escobar, P. F., Patrick, R. J., Rybicki, L. A., Weng, D. E., and Crowe, J. P. (2007). The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups. Ann Surg Oncol *14*, 143-147.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E.*, et al.* (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Nat Med *15*, 68-74.

Fenouille, N., Puissant, A., Tichet, M., Zimniak, G., Abbe, P., Mallavialle, A., Rocchi, S., Ortonne, J. P., Deckert, M., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2011a). SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. Oncogene.

Fenouille, N., Robert, G., Tichet, M., Puissant, A., Dufies, M., Rocchi, S., Ortonne, J. P., Deckert, M., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2011b). The p53/p21Cip1/ Waf1 pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression. Pigment Cell Melanoma Res *24*, 219-232.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer *3*, 453-458.

Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A.*, et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. Nat Med *14*, 518-527.

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.

Fischer, D., Brown-Ludi, M., Schulthess, T., and Chiquet-Ehrismann, R. (1997). Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. Journal of Cell Science *110*, 1513-1522.

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.

Framson, P. E., and Sage, E. H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? J Cell Biochem *92*, 679-690.

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. D., Brekken, R. A., Motamed, K., Murri, C., Wang, T., and Sage, E. H. (2004). SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. J Cell Biochem *91*, 915-925.

Francki, A., Motamed, K., McClure, T. D., Kaya, M., Murri, C., Blake, D. J., Carbon, J. G., and Sage, E. H. (2003). SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. J Cell Biochem *88*, 802-811.

Fresno Cristóbal, L. A. S., Girotti María Romina, Valacco María Pía, Lopez Juan Alberto, Podhajcer Osvaldo Luis, Balzarini Mónica G, Prada Federico, Fernandez Elmer (2011). The Multi-Reference Contrast Method: facilitating set enrichment analysis. Computers in Biology and Medicein *CBM-D-11-00162R1*.

Frisch, S. M., and Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. Current Opinion in Cell Biology *9*, 701-706.

Funk, S. E., and Sage, E. H. (1991). The $Ca^{2+}$-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.

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. (1996). Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. The Journal of Biological Chemistry *271*, 4511-4517.

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.

Girotti, M. R., Fernandez, M., Lopez, J. A., Camafeita, E., Fernandez, E. A., Albar, J. P., Benedetti, L. G., Valacco, M. P., Brekken, R. A., Podhajcer, O. L., and Llera, A. S. (2011). SPARC Promotes Cathepsin B-Mediated Melanoma Invasiveness through a Collagen I/alpha2beta1 Integrin Axis. J Invest Dermatol *131*, 2438-2447.

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.

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.

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. European Journal of Cancer *33*, 1654-1660.

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.

Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Sipley, J., Nagase, H., French, D. L., and Quigley, J. P. (1999). Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. Ann N Y Acad Sci *878*, 372-387.

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

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646-674.

Hasselaar, P., Loskutoff, D. J., Sawdey, M., and Sage, E. H. (1991). SPARC induces the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry *266*, 13178-13184.

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.

Helleman, J., Jansen, M. P., Ruigrok-Ritstier, K., van Staveren, I. L., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G., Sleijfer, S., Foekens, J. A., and Berns, E. M. (2008).

Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. Clin Cancer Res *14*, 5555-5564.

Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J. N., and Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular $Ca^{2+}$-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 $Ca^{2+}$-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. The Journal of Cell Biology *105*, 473-482.

Horie, K., Tsuchihara, M., and Nakatsura, T. (2010). Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G arrest induction. Cancer Sci *101*, 913-919.

Hoskins, E., Rodriguez-Canales, J., Hewitt, S. M., Elmasri, W., Han, J., Han, S., Davidson, B., and Kohn, E. C. (2011). Paracrine SLPI secretion upregulates MMP-9 transcription and secretion in ovarian cancer cells. Gynecol Oncol *122*, 656-662.

Hsiao, Y. H., Lien, H. C., Hwa, H. L., Kuo, W. H., Chang, K. J., and Hsieh, F. J. (2010). SPARC (osteonectin) in breast tumors of different histologic types and its role in the outcome of invasive ductal carcinoma. Breast J *16*, 305-308.

Huang, Y., Song, N., Ding, Y., Yuan, S., Li, X., Cai, H., Shi, H., and Luo, Y. (2009). Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. Cancer Res *69*, 7529-7537.

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.

Hynes, R. O., and Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. The Journal of Cell Biology *150*, F89-F95.

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.

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.

Jansen, M. P. H. M., Foekens, J. A., van Staveren, I. L., Dirkzwager-Kiel, M. M., Ritstier, K., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Sieuwerts, A. M., Portengen, H., Dorssers, L. C. J.*, et al.* (2005). Molecular Classification of Tamoxifen-Resistant Breast Carcinomas by Gene Expression Profiling. J Clin Oncol *23*, 732-740.

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.

Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E.*, 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*, 3037-3045.

Jones, F. S., and Jones, P. L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Developmental Dynamics *218*, 235-259.

Kamangar, F., Dores, G. M., and Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol *24*, 2137-2150.

Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., and Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell *3*, 537-549.

Karnoub, A. E., and Weinberg, R. A. (2006). Chemokine networks and breast cancer metastasis. Breast Dis *26*, 75-85.

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.

Kleinman, H. K., and Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. Semin Cancer Biol *15*, 378-386.

Kmieciak, M., Worschech, A., Nikizad, H., Gowda, M., Habibi, M., Depcrynski, A., Wang, E., Godder, K., Holt, S. E., Marincola, F. M., and Manjili, M. H. (2011). CD4+ T cells inhibit the neu-specific CD8+ T-cell exhaustion during the priming phase of immune responses against breast cancer. Breast Cancer Res Treat *126*, 385-394.

Koblinski, J. E., Kaplan-Singer, B. R., VanOsdol, S. J., Wu, M., Engbring, J. A., Wang, S., Goldsmith, C. M., Piper, J. T., Vostal, J. G., Harms, J. F.*, et al.* (2005). Endogenous Osteonectin/SPARC/BM-40 Expression Inhibits MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Metastasis. Cancer Res *65*, 7370-7377.

Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA *90*, 770-774.

Kupprion, C., Motamed, K., 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.

Lakhani, S. R., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Penault-Llorca, F., van der Vijver, M., Parry, S., Bishop, T., Benitez, J., Rivas, C., Bignon, Y. J.*, et al.* (2005). Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. Clin Cancer Res *11*, 5175-5180.

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

Lapyckyj, L., Castillo, L. F., Matos, M. L., Gabrielli, N. M., Luthy, I. A., and Vazquez-Levin, M. H. (2010). Expression analysis of epithelial cadherin and related proteins in IBH-6 and IBH-4 human breast cancer cell lines. J Cell Physiol *222*, 596-605.

Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and -2. Current Opinion in Cell Biology *12*, 634-640.

Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E. L., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1998). Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. The Journal of Clinical Investigation *101*, 982-992.

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.

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, H. C., Cao, D. C., Liu, Y., Hou, Y. F., Wu, J., Lu, J. S., Di, G. H., Liu, G., Li, F. M., Ou, Z. L.*, et al.*(2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat *88*, 75-85.

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.

Liotta, L. A., Stracke, M. L., Aznavoorian, S. A., Beckner, M. E., and Schiffmann, E. (1991). Tumor cell motility. Semin Cancer Biol *2*, 111-114.

Liu, B. P., and Burridge, K. (2000). Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins. Mol Cell Biol *20*, 7160-7169.

Liu, P., Lu, J., Cardoso, W. V., and Vaziri, C. (2008). The SPARC-related Factor SMOC-2 Promotes Growth Factor-induced Cyclin D1 Expression and DNA Synthesis via Integrin-linked Kinase. Mol Biol Cell *19*, 248-261.

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.*

Maillard, C., Malaval, L., and Delmas, P. D. (1992). Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. Bone *13*, 257-264.

Maity, G., Choudhury, P. R., Sen, T., Ganguly, K. K., Sil, H., and Chatterjee, A. (2011). Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. Tumour Biol *32*, 129-138.

Makita, S., Abiko, A., Naganuma, Y., Nagai, M., and Nakamura, M. (2010). Chronic kidney disease is associated with increased carotid artery stiffness without morphological changes in participants of health check-up programs. Atherosclerosis *213*, 306-310.

Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani, Y., Fukuda, T., Oguri, Y.*, et al.*(2008). Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 12849-12854.

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.

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.

Mason, I. J., Murphy, D., Munke, M., Francke, U., Elliott, R. W., and hogan, B. L. M. (1986). Developmental and transformation-sensitive expression of SPARC gene on mouse chromosome 11. EMBO Journal *5*, 1831-1837.

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.

Maurer, P., Gohring, W., Sasaki, T., Mann, K., Timpl, R., and Nischt, R. (1997a). Recombinant and tissue-derived mouse BM-40 bind to several collagen types and have increased affinities after proteolytic activation. Cell Mol Life Sci *53*, 478-484.

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., Jeno, 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. (1997b). Structural and functional characterization of the extracellular calcium-binding protein BM-40/secreted protein, acidic, rich in cysteine/osteonectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. European Journal of Biochemistry *248*, 209-216.

Mayer, U., Aumailley, M., Mann, K., Timpl, R., and Engel, J. (1991). Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. European Journal of Biochemistry *198*, 141-150.

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., Padua, D., Bos, P., Nguyen, D. X., Nuyten, D., Kreike, B., Zhang, Y., Wang, Y., Ishwaran, H.*, et al.* (2007). Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 6740-6745.

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.

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.

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.

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.

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.

Murphy-Ullrich, J. E., Gurusiddappa, S., Frazier, W. A., and Höök, M. (1993). Heparin-binding peptides from thrombospondin 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. The Journal of Biological Chemistry *268*, 26784-26789.

Murphy-Ullrich, J. E., Lightner, V. A., Aukhil, I., Yan, Y. Z., Erickson, H. P., and Hook, M. (1991). Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. The Journal of Cell Biology *115*, 1127-1136.

Murphy-Ullrich, J. E., and Poczatek, M. (2000). Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. Cytokine and Growth Factor Reviews *11*, 59-69.

Nagai, M. A., Gerhard, R., Fregnani, J. H., Nonogaki, S., Rierger, R. B., Netto, M. M., and Soares, F. A. (2011). Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat *126*, 1-14.

Nagashima, S., Yagyu, H., Takahashi, N., Kurashina, T., Takahashi, M., Tsuchita, T., Tazoe, F., Wang, X. L., Bayasgalan, T., Sato, N.*, et al.* (2010). Depot-Specific Expression of Lipolytic Genes in Human Adipose Tissues. J Atheroscler Thromb.

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.

Nie, J., Chang, B., Traktuev, D. O., Sun, J., March, K., Chan, L., Sage, E. H., Pasqualini, R., Arap, W., and Kolonin, M. G. (2008). IFATS Series: Combinatorial Peptides Identify {alpha}5{beta}1 Integrin as a Receptor for the Matricellular Protein SPARC on Adipose Stromal Cells. Stem Cells.

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.

Olmeda, D., Moreno-Bueno, G., Flores, J. M., Fabra, A., Portillo, F., and Cano, A. (2007). SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. Cancer Res *67*, 11721-11731.

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.

Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A., and Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. J Cell Sci *117*, 2827-2839.

Pellikainen, J. M., Ropponen, K. M., Kataja, V. V., Kellokoski, J. K., Eskelinen, M. J., and Kosma, V. M. (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. Clin Cancer Res *10*, 7621-7628.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., Rijn, M. v. d., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A*., et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumors. Nature *406*, 747-752.

Perrot-Applanat, M., Vacher, S., Toullec, A., Pelaez, I., Velasco, G., Cormier, F., Saad Hel, S., Lidereau, R., Baud, V., and Bieche, I. (2011). Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies. PLoS One *6*, e21589.

Phromnoi, K., Yodkeeree, S., Anuchapreeda, S., and Limtrakul, P. (2009). Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. Acta Pharmacol Sin *30*, 1169-1176.

Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E., and Llera, A. S. (2008a). The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. Cancer Metastasis Rev.

Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E., and Llera, A. S. (2008b). The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. Cancer Metastasis Rev *27*, 691-705.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. J Clin Invest *117*, 3155-3163.

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.

Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., and Bokoch, G. M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. Mol Biol Cell *9*, 1863-1871.

Pulaski, B. A., and Ostrand-Rosenberg, S. (1998). Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. Cancer Res *58*, 1486-1493.

Pulaski, B. A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. Curr Protoc Immunol *Chapter 20*, Unit 20 22.

Puolakkainen, P. A., Brekken, R. A., Muneer, S., and Sage, E. H. (2004). Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. Mol Cancer Res *2*, 215-224.

Quinlan, J. R. (1996). Improved Use of Continuous Attributes in C4.5. Journal of Artificial Intelligence Research *4*, 77-90.

Raghu, H., Sodadasu, P. K., Malla, R. R., Gondi, C. S., Estes, N., and Rao, J. S. (2010). Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. BMC Cancer *10*, 647.

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.

Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nature Genetics *33*, 49-54.

Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Sipley, J., Nagase, H., French, D. L., and Quigley, J. P. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J Biol Chem *274*, 13066-13076.

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.

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.

Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C. T., Bigner, D. D., Counter, C. M., and Wang, X. F. (2003). Bone-related Genes Expressed in Advanced Malignancies Induce Invasion and Metastasis in a Genetically Defined Human Cancer Model. J Biol Chem *278*, 15951-15957.

Richardson, A., Malik, R. K., Hildebrand, J. D., and Parsons, J. T. (1997). Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. Mol Cell Biol *17*, 6906-6914.

Rody, A., Holtrich, U., Pusztai, L., Liedtke, C., Gaetje, R., Ruckhaeberle, E., Solbach, C., Hanker, L., Ahr, A., Metzler, D.*, et al.* (2009). T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. Breast Cancer Res *11*, R15.

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.

Rumpler, 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. (2001). Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. The Journal of Clinical Investigation *107*, 781-783.

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 $Ca^{2+}$ binding EF-hand sequence. Journal of Cellular Biochemistry *57*, 127-140.

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

Sage, E. H., Reed, M., Funk, S. E., Truong, T., Steadele, M., Puolakkainen, P., Maurice, D. H., and Bassuk, J. A. (2003). Cleavage of the Matricellular Protein SPARC by Matrix Metalloproteinase 3 Produces Polypeptides That Influence Angiogenesis. J Biol Chem *278*, 37849-37857.

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 $Ca^{2+}$-dependent binding to the extracellular matrix. The Journal of Cell Biology *109*, 341-356.

Sage, E. H., and Vernon, R. B. (1994). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. Journal of Hypertension *12*, S145-152.

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., 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.

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., and Motamed, K. (2005). Absence of Host-Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Augments Peritoneal Ovarian Carcinomatosis. Am J Pathol *167*, 1739-1752.

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., and Colombo, M. P. (2008). Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. Cancer Lett *267*, 245-253.

Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Rumio, C., Brekken, R. A., Chiodoni, C., and Colombo, M. P. (2008). Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. Cancer Res *68*, 9050-9059.

Sangaletti, S., Gioiosa, L., Guiducci, C., Rotta, G., Rescigno, M., Stoppacciaro, A., Chiodoni, C., and Colombo, M. P. (2005). Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. J Cell Sci.

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, jem.20030202.

Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype. Cancer Res *68*, 989-997.

Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G., and Timpl, R. (1997). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. The Journal of Biological Chemistry *272*, 9237-9243.

Sasaki, T., Hohenester, E., W, 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.

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. Molecular Biology of the 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.

Shankavaram, U. T., DeWitt, D. L., Funk, S. E., Sage, E. H., and Wahl, L. M. (1997). Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. Journal of Cellular Physiology *173*, 327-334.

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.

Shibanuma, 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.

Sil, H., Sen, T., and Chatterjee, A. (2011). Fibronectin-integrin (alpha5beta1) modulates migration and invasion of murine melanoma cell line B16F10 by involving MMP-9. Oncol Res *19*, 335-348.

Smith, H. L., Hickey, J., Jablin, M. S., Trujillo, A., Freyer, J. P., and Majewski, J. (2010). Mouse fibroblast cell adhesion studied by neutron reflectometry. Biophys J *98*, 793-799.

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.

Sotiriou, C., and Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med *360*, 790-800.

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.

Sullu, Y., Demirag, G. G., Yildirim, A., Karagoz, F., and Kandemir, B. (2011). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. Pathol Res Pract.

Swaroop, A., Hogan, B. L., and Francke, 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.

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. (2005a). Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. J Clin Invest, JCI23002.

Tai, I. T., Dai, M., Owen, D. A., and Chen, L. B. (2005b). 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.

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., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871-890.

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. The Journal of Cell Biology *121*, 1433-1444.

Trujillo, K. A., Heaphy, C. M., Mai, M., Vargas, K. M., Jones, A. C., Vo, P., Butler, K. S., Joste, N. E., Bisoffi, M., and Griffith, J. K. (2011). Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. Int J Cancer *129*, 1310-1321.

Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell *147*, 275-292.

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T*., et al.* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature *415*, 530-536.

van Beijnum, J. R., Petersen, K., and Griffioen, A. W. (2009). Tumor endothelium is characterized by a matrix remodeling signature. Front Biosci (Schol Ed) *1*, 216-225.

van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res *305*, 285-298.

Vazquez, S. M., Mladovan, A., Garbovesky, C., Baldi, A., and Luthy, I. A. (2004). Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. J Cell Physiol *199*, 460-469.

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.

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*, 267-272.

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, M706563200.

West, R. B., Nuyten, D. S., Subramanian, S., Nielsen, T. O., Corless, C. L., Rubin, B. P., Montgomery, K., Zhu, S., Patel, R., Hernandez-Boussard, T.*, et al.* (2005). Determination of stromal signatures in breast carcinoma. PLoS Biol *3*, e187.

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.

Wiggins, H., and Rappoport, J. (2010). An agarose spot assay for chemotactic invasion. Biotechniques *48*, 121-124.

Witkiewicz, A. K., Freydin, B., Chervoneva, I., Potoczek, M., Rizzo, W., Rui, H., Brody, J. R., Schwartz, G. F., and Lisanti, M. P. (2010). Stromal CD10 and SPARC expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) patients predicts disease recurrence. Cancer Biol Ther *10*, 391-396.

Woelfle, U., Cloos, J., Sauter, G., Riethdorf, L., Janicke, F., van Diest, P., Brakenhoff, R., and Pantel, K. (2003). Molecular Signature Associated with Bone Marrow Micrometastasis in Human Breast Cancer. Cancer Res *63*, 5679-5684.

Wong, S. Y., Crowley, D., Bronson, R. T., and Hynes, R. O. (2007). Analyses of the role of endogenous SPARC in mouse models of prostate and breast cancer. Clin Exp Metastasis.

Wong, S. Y., Crowley, D., Bronson, R. T., and Hynes, R. O. (2008). Analyses of the role of endogenous SPARC in mouse models of prostate and breast cancer. Clin Exp Metastasis *25*, 109-118.

Worschech, A., Kmieciak, M., Knutson, K. L., Bear, H. D., Szalay, A. A., Wang, E., Marincola, F. M., and Manjili, M. H. (2008). Signatures associated with rejection or recurrence in HER-2/neu-positive mammary tumors. Cancer Res *68*, 2436-2446.

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., Kyriakides, T. R., and Bornstein, P. (2000). Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. Molecular Biology of the Cell *11*, 3353-3364.

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.

Yost, J. C., and Sage, E. H. (1993). Specific interaction of SPARC with endothelial cells is mediated through a carboxy-terminal sequence containing a calcium-binding E-F hand. The Journal of Biological Chemistry *268*, 25790-25796.

Young, 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.

Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H. L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S. P., and Johnson, P. H. (2001). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. Cancer Res *61*, 5168-5178.