

ROL DEL GEN SPARC EN LA CAPACIDAD TUMORIGENICA DE CELULAS DE MELANOMA HUMANO*

M. FERNANDA LEDDA¹, SORAYA ADRIS¹, LAURA BOVER¹, ALICIA L. BRAVO², JOSE MORDOH¹, OSVALDO L. PODHAJECER¹

¹ Instituto de Investigaciones Bioquímicas Luis Leloir, Fundación Campomar; ² Hospital Eva Perón, San Martín, Buenos Aires

Resumen En un estudio previo demostramos que líneas celulares y tumores de melanoma humano expresan altos niveles de la proteína de matriz extracelular SPARC. Para determinar su rol en la progresión del melanoma humano, la línea IIB-MEL-LES fue transfectada con el cDNA de SPARC anti-sentido. Se aislaron tres clones con expresión disminuida de SPARC. Ninguno de ellos mostró cambios en la cinética de crecimiento in vitro comparado con las células control. La inyección s.c. de células control en ratones atímicos mostró desarrollo tumoral en el 100% de los animales, mientras que ninguno de los clones dio origen a tumores. Estos estudios demuestran que SPARC podría jugar un rol central en la progresión del melanoma humano.

Palabras clave: SPARC, RNA antisense, melanoma humano

La progresión neoplásica es un proceso de múltiples etapas durante las cuales la célula tumoral rompe las uniones preexistentes con el tejido de origen, migra e invade el estroma adyacente, evadiendo también la respuesta inmunológica. Luego de la intravasación y extravasación del sistema circulatorio, la célula tumoral producirá una metástasis, a partir de una nueva interacción generada con su tejido blanco.

Inicialmente, la capacidad de invasión fue asociada a la producción de proteasas por parte de la célula tumoral. El paradigma subyacente sostenía que la matriz extracelular cumpliría sólo un rol de barrera inerte. Los estudios de los últimos años demuestran claramente que la progresión

tumoral es un proceso que surge de la interacción de la célula tumoral con el estroma y le confiere un rol preponderante a los componentes de la matriz extracelular¹. La proteína de matriz extracelular SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), también denominada Osteonectina, BM40 y 43 K, fue inicialmente caracterizada como la proteína mayoritaria de hueso, excluido el colágeno². Estudios posteriores demostraron que SPARC se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de origen humano y murino y se encuentra altamente conservada a nivel evolutivo³. Diversos estudios han demostrado que SPARC es capaz de regular el crecimiento celular mediante su interacción con otros componentes de la matriz extracelular y con citoquinas³. Sin embargo, el rol de esta proteína es aún incierto, a pesar de que se ha descrito que posee un efecto antiadhesivo, induciendo la pérdida de contactos focales⁴. Mediante el uso de bancos de cDNA substractivos preparados a partir de mRNA de cáncer de mama pudimos clonar un cDNA cuya secuencia completa demostró que codificaba para SPARC⁵. Por técnicas de hibridación in situ e

* Premiado por la Fundación Lucio Cherny como el mejor trabajo de los que se presentaron en la *Sección Multidisciplinaria* durante la XL Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, el 10 XI 1995.

Dirección postal: Dr. Osvaldo L. Podhajcer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Luis F. Leloir, Fundación Campomar, Av. Patricias Argentinas 435, 1405 Buenos Aires, Argentina.

inmunohistoquímica, demostramos que SPARC es expresado por los fibroblastos que rodean a las células malignas del carcinoma mamario humano y murino⁵. Más recientemente, estudios que realizamos en melanoma humano nos permitieron demostrar que a diferencia de lo observado en cáncer de mama, SPARC es fuertemente expresado por las células malignas de melanoma humano⁶. Esta expresión se encuentra asociada al desarrollo del mismo. El 100% de los melanomas primarios y metastásicos estudiados expresó niveles elevados de SPARC, mientras que sólo el 16% de los nevos displásicos (patología benigna) expresó niveles discretos de SPARC. Los melanocitos normales no expresaron SPARC⁶.

En el presente trabajo reportamos que la disminución en los niveles de expresión de SPARC en la línea de melanoma humano IIB-MEL-LES, como resultado de la expresión del c-DNA antisentido de SPARC, reduce notablemente su capacidad invasiva *in vitro* y anula por completo su tumorigenicidad en ratones atímicos.

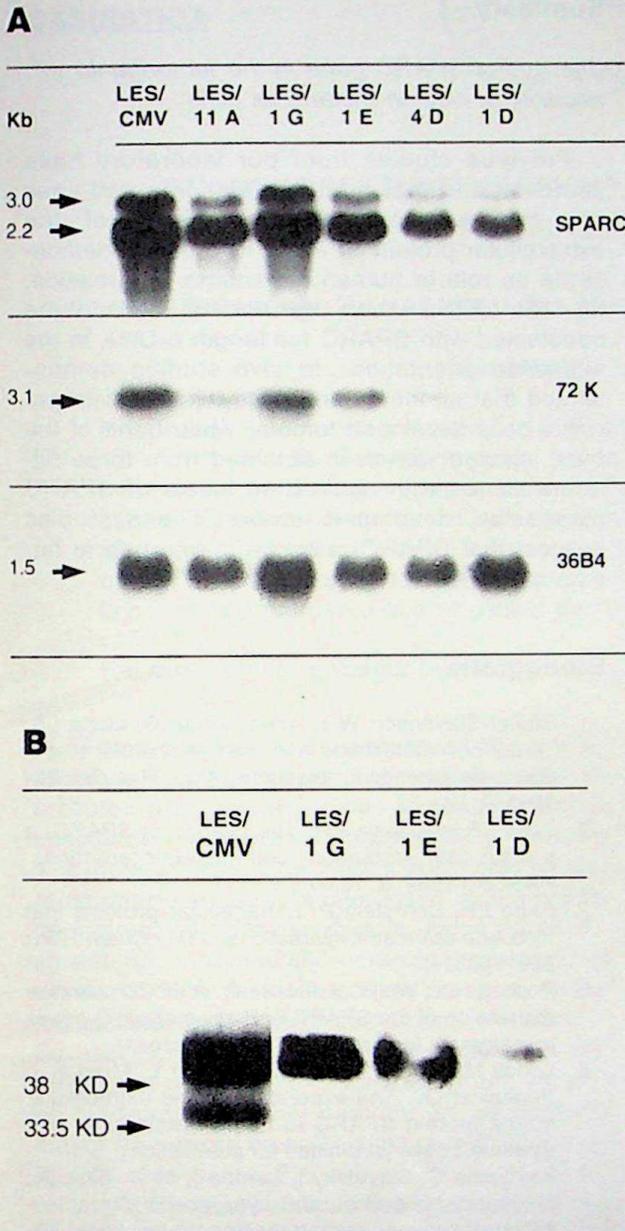
El cDNA completo de 1,7 Kb codificante para SPARC humano, fue inicialmente aislado del banco de cDNA de cáncer de mama y clonado en el sitio Sal I de pBlue Script SK⁺, en ambas orientaciones⁵. Un clon conteniendo el cDNA de SPARC en la orientación antisentido fue escindido con Hind III y Apa I y subclonado en la misma orientación en los sitios Hind III/Apa I del vector de expresión de mamíferos Rc/CMV (Invitrogen), bajo un promotor de citomegalovirus, para crear el plásmido pCMV/SPas.

Las células de melanoma humano IIB-MEL-LES⁷ poseen una alta capacidad invasiva *in vitro* a través de membranas de policarbonato recubiertas con matrigel en el sistema de transwells de Costar. Por otro lado, un inóculo de 3×10^6 células desarrolla tumor en el 100% de los ratones atímicos inyectados. Dichas células IIB-MEL-LES fueron transfectadas con el plásmido pCMV/SPas mediante la coprecipitación del DNA plasmídico con fosfato de calcio. Los clones celulares fueron seleccionados en G418 y aislados mediante «ring cloning». Doce de ellos fueron analizados para la expresión del mRNA de SPARC. Como control para los estudios *in vitro* e *in vivo*, se utilizaron células IIB-MEL-LES transfectadas con el vector Rc/CMV (LES/CMV).

Mediante el uso de la expresión del mRNA de GAPDH y 36B4 como controles internos, se seleccionaron tres clones (denominados LES/1G, LES/1E y LES/1D) que exhibieron una disminución en el nivel de mRNA de SPARC entre 20 y 80% (Figura 1A). Estos clones fueron también utilizados para verificar la disminución en los niveles de secreción de SPARC al medio condicionado, mediante el uso de Western blots. En estudios previos habíamos demostrado que SPARC es secretado al medio condicionado por fibroblastos normales como una única banda de 43 Kd de peso molecular⁶; por el contrario, células IIB-MEL-LES, secretan hasta 4 formas diferentes de la proteína, como producto de una glicosilación diferente a la de los fibroblastos y un clivaje extracelular⁶.

La Figura 1B muestra un Western blot donde se observa la completa desaparición de las bandas de bajo peso molecular en los tres clones celulares y una gradual disminución en los niveles de expresión de la banda de mayor peso molecular.

En comparación con la línea parental, la cinética de crecimiento *in vitro* de los tres clones no se vio afectada por la disminución en los niveles de expresión de SPARC (datos no mostrados). Sin embargo, los tres clones mostraron ciertas alteraciones morfológicas, en particular el clon LES/1D, que exhibió una morfología más estirada, indicando una mayor adhesividad al plástico. Estudios previos habían demostrado que SPARC era capaz de regular los niveles de expresión de ciertas metaloproteasas en fibroblastos gingivales normales⁹. En estudios iniciales no observamos ningún efecto sobre la expresión de gelatinasas, al agregar SPARC recombinante en forma exógena (datos no mostrados). Sin embargo, estudios de Northern demostraron una correlación directa entre la disminución en los niveles de mRNA de SPARC y la disminución en los niveles de mRNA de gelatinasa A (72 K) en los clones de melanoma humano (Figura 1A). Esto nos llevó a estudiar en una siguiente etapa, la capacidad de los diferentes clones de invadir membranas recubiertas con matrigel en el sistema de transwells. El nivel de invasividad, cuantificado luego de una incubación durante toda la noche, mostró una fuerte reducción en la capacidad invasiva de los tres clones. Los clones LES/1G y



LES/1E mostraron en promedio una reducción del 80% en su capacidad invasiva, mientras que el clon LES/1D fue esencialmente no invasivo. Dicha disminución correlacionó con la disminución en los niveles de expresión de mRNA de gelatinasa A.

La invasión del estroma normal adyacente por parte de una célula tumoral se encuentra íntimamente ligada a su capacidad para adherirse en forma previa a la matriz extracelular que forma parte de dicho estroma. En forma similar, la célula tumoral necesita adherirse *in vitro* al matrigel para posteriormente poder degradarlo. Por esta razón decidimos estudiar en qué medida se vio afectada la capacidad de adhesión celular a matrigel en los clones transfectados con SPARC antisentido. Nuestros estudios demostraron que los tres clones han perdido casi totalmente su capacidad de adherirse a matrigel, sugiriendo que su incapacidad de invadir proviene, al menos en parte, de la pérdida de adhesividad a dicha matriz.

Los resultados obtenidos *in vitro* sugirieron fuertemente que la disminución en la expresión de SPARC podría jugar un rol preponderante en la capacidad tumorigénica de las células de melanoma. Con este propósito 3×10^6 células correspondientes a cada uno de los clones LES/1G, LES/1E y LES/1D y a las células control LES/

Fig. 1.— Estudio de los niveles de expresión de SPARC y 72 K en clones transfectados con el cDNA antisentido del gen SPARC.

A) Análisis por Northern blot
Cada calle fue sembrada con 10 µg de RNA total. El blot fue hibridizado utilizando como sonda un cDNA de SPARC marcado con [³²P-α]-dCTP⁵, deshibridizado y rehibridizado con un cDNA de gelatinasa A (72K) y 36B4 sucesivamente.

B) Análisis por Western blot
Cada calle contiene 40 µg de proteína total obtenida por precipitación con sulfato de amonio a partir de medio libre de suero condicionado por los distintos clones.

TABLA 1.— Capacidad tumorigénica *in vivo* de células IIB-MEL-LES transfectadas en forma estable con el cDNA del gen SPARC en orientación antisentido. Ratones atímicos machos Balb/C nu/nu de 6-8 semanas de edad fueron inyectados con 3×10^6 células en forma subcutánea. El experimento 1 finalizó a los 120 días y el experimento 2, a los 150 días

	CLONES CELULARES			
	LES/CMV	LES/1G	LES/1E	LES/1D
Experimento 1	6/6 ^a	0/6	0/6	0/6
Experimento 2	7/7	0/7	0/7	0/7

a: Los datos se expresan como número de ratones que desarrollaron tumor sobre el total de ratones inyectados.

CMV, fueron inoculadas en ratones atímicos en forma subcutánea (6 ratones por grupo). En un primer experimento se observó que en un lapso de 120 días todos los ratones inyectados con las células control desarrollaron tumores y murieron. Sin embargo, ninguno de los ratones inyectados con células provenientes de alguno de los tres clones desarrolló tumor (Tabla 1). En un segundo experimento, utilizando 7 ratones por grupo, se observó que al cabo de 150 días todos los controles habían desarrollado tumor y muerto, mientras que ninguno de los ratones inyectados con células provenientes de los clones, desarrolló tumor (Tabla 1).

A los efectos de poder dilucidar el mecanismo mediante el cual la disminución en los niveles de SPARC sería antitumorigénica, las células tumorales fueron inyectadas en forma subcutánea y se tomaron muestras de la zona de inyección a las 24 y 72 horas. Comparado con el control (LES/CMV), la imagen histológica a las 24 horas de la zona de inyección de las células LES/1D muestra un mayor número de células tumorales necróticas, con un masivo infiltrado de polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Se observa además un fuerte edema con presencia de vasos activados. A las 72 horas la imagen histológica muestra pocas células tumorales viables y se mantiene el proceso inflamatorio observado a las 24 horas.

Nuestros resultados demuestran claramente que la expresión de SPARC estaría íntimamente ligada al proceso de progresión tumoral, ya que la disminución en la expresión de dicha proteína de secreción mediante el uso de estrategias antisentido, anula la capacidad tumorigénica de los melanomas humanos en ratones atímicos. Nuestros estudios también sugieren que los mecanismos mediante los cuales SPARC afectaría la progresión tumoral podrían estar asociados tanto a los procesos de adhesión e invasión de la célula tumoral, así como a una posible modulación de la respuesta inmunológica.

Summary

The role of SPARC gene in the tumorigenic capacity of human melanoma cells

Previous studies from our laboratory have demonstrated that human melanoma cell lines and tumors expressed high levels of the extracellular protein SPARC. In order to demonstrate its role in human melanoma progression, IIB-MEL-LES human melanoma cells were transfected with SPARC full length c-DNA in the antisense orientation. *In vivo* studies demonstrated that all the control mice injected with parental cells developed tumors, while none of the mice injected with cells obtained from three different clones with diminished levels of SPARC expression, developed tumors. These studies suggest that SPARC may play a key role in human melanoma progression.

Bibliografía

1. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-73.
2. Lane TF and Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994; 8: 163-73.
3. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 1991; 266: 14831-4.
5. Podhajcer OL, Wolf C, Lefebvre O, et al. Comparative expression of the SPARC and stromelysin-3 genes in mammary tumors. *The Breast* (in press).
6. Ledda MF, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. The expression of the extracellular matrix protein SPARC in human melanoma and dysplastic nevi. (submitted for publication).
7. Kairiyama C, Slavutsky I, Larripa I, et al. Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN.Pig. *Cells Res* 1995; 8: 121-32.
8. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodelling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 1993; 121: 1433-44.