



UNIVERSIDAD AUSTRAL  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

EL PAPEL DE SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in  
Cysteine*) EN LA FIBROSIS HEPÁTICA Y EL  
HEPATOCARCINOMA

---

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biomédicas por la Universidad Austral

Lic. Catalina Atorrasagasti

Director de tesis: Prof. Dr. Guillermo D. Mazzolini

Pilar, Argentina, Marzo de 2011

## **EL PAPEL DE SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*) EN LA FIBROSIS HEPÁTICA Y EL HEPATOCARCINOMA**

### ***Resumen***

La fibrosis hepática es una enfermedad caracterizada por una excesiva acumulación de componentes de la matriz extracelular y cambios en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC) que conducen a una distorsión de la arquitectura del parénquima hepático y, finalmente, a la insuficiencia hepática. La cirrosis es el estadio final de la fibrosis e incrementa el riesgo de aparición de hepatocarcinoma (HC), por ello es considerada una enfermedad preneoplásica. El HC es el sexto tumor más frecuente y la tercera causa de muerte asociada a cáncer a nivel mundial. SPARC (proteína secretada, ácida y rica en cisteínas) es una glicoproteína de la MEC con diversas funciones biológicas que se encuentra sobreexpresada en hígados con cirrosis y en particular en las células estrelladas hepáticas (CEH), células claves en el desarrollo de la fibrosis. A su vez, SPARC presenta expresión diferencial y distintas funciones en varios tipos tumorales, el HC entre ellos. El papel de SPARC en el HC no ha sido dilucidado completamente. SPARC posee efectos protumorales o antitumorales dependiendo del tipo tumoral. Su papel biológico se relaciona con diferentes procesos como remodelación tisular, migración celular, adhesión, morfogénesis y angiogénesis, entre otros. El objetivo de esta tesis de doctorado fue estudiar el papel de SPARC en la fibrosis hepática y en el HC. La inhibición de la expresión de SPARC atenuó significativamente el desarrollo de la fibrosis en ratas tratadas con tioacetamida (inductor de fibrosis hepática). Se observó disminución en los depósitos de colágenos, en la actividad inflamatoria y en la transdiferenciación *in vivo* de las CEH hacia un fenotipo activado, de tipo miofibroblástico, más dañino. Los ratones SPARC *null* (sin expresión de SPARC) también presentaron menor desarrollo de fibrosis frente a diferentes agentes fibrogénicos. Con el objetivo de dilucidar los mecanismos celulares relacionados con los efectos alcanzados se inhibió la expresión de SPARC en CEH *in vitro* y se observó reducción de diferentes mecanismos fibróticos como inhibición de la migración celular en respuesta a estímulos quimiotácticos como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), disminución de la síntesis de colágeno y la producción de TGF- $\beta$ 1. Por otro lado, la sobreexpresión de SPARC en HC inhibió la capacidad tumorigénica de las células tanto *in vitro* como *in vivo*, al menos en parte facilitando la transición

desde un fenotipo mesenquimal a uno de tipo epitelial y reduciendo la agresividad de las células del HC. En éste trabajo se presentan evidencias que demuestran un papel central de SPARC en fibrosis hepática y el HC; identificando a SPARC como un blanco potencial para el tratamiento de estas patologías.

# THE ROLE OF SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*) IN HEPATIC FIBROSIS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA

## **Abstract**

Liver fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components and changes in cell-cell and cell-ECM interaction, which ultimately leads to distortion of parenchymal architecture and hepatic failure. End stage of liver fibrosis is cirrhosis, which increases the risk of hepatocellular carcinoma (HCC). HCC is the sixth most common cancer and the third leading cause of cancer-related death worldwide. Therefore, liver fibrosis is considered a preneoplastic disease. Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) is an ECM protein with many biological functions, including tissue remodeling, cell migration and adhesion, morphogenesis and angiogenesis. SPARC is over-expressed in cirrhotic livers and up-regulated in activated hepatic stellate cells (HSC), key in the development of hepatic fibrosis. SPARC also has differential expression and functions in several tumor types, including HCC, but its role in hepatocarcinogenesis remains unclear. SPARC can also be related to tumor progression or regression, depending on the type of tumor cell. The aim of this thesis is to study the role of SPARC in liver fibrosis and HCC. Down-regulation of SPARC expression markedly attenuated the development of hepatic fibrosis in rats treated with thiocetamide, as a result of decreased collagen deposition, reduced inflammatory activity and suppressed transdifferentiation of HSC to the myofibroblasts like phenotype *in vivo*. SPARC *null* mice also present a lower degree of fibrosis in different experimental models, confirming these results in a genetic model. In order to uncover the cellular mechanisms involved, we have specifically knocked-down SPARC in HSC *in vitro* and found reduction in several fibrotic mechanisms, as decreased migration toward PDGF (platelet-derived growth factor), reduction of collagen synthesis and TGF- $\beta$ 1 production. On the other hand, SPARC over-expression in HCC cells inhibited their tumorigenic capacity *in vitro* and *in vivo*, partially through the induction of mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and a less aggressive HCC cell phenotype. In summary, we provide new evidence for a key role of SPARC in liver cirrhosis and HCC, with the prospect of being SPARC a potential therapeutic target for ameliorating liver fibrosis.

## AGRADECIMIENTOS

Esta es sin duda una de las partes más importantes. No hubiese podido llevar a cabo el trabajo de todos estos años sin la ayuda de tantas personas que de una u otra forma me acompañaron.

En primer lugar, Guillermo; gracias, muchas gracias. Por haberme guiado en este camino, por tu confianza y tu paciencia. Por tu optimismo y por haberme alentado en los momentos difíciles. Por haberme enseñado no solo ciencia sino, y más importante, calidez humana.

No puedo dejar de agradecer a la Universidad Austral, en particular a la Facultad de Ciencias Biomédicas, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo. Un agradecimiento especial al Dr. Rodolfo Martin por la cuidadosa lectura de este manuscrito.

A todo el laboratorio de “Terapia Génica”... somos muchos y es difícil escribir algo sobre cada uno pero todos saben lo que me ayudaron en mayor o menor medida. Recuerdo el primer día que fui al entre piso, ni paredes había...y ahora todos los que somos y todo lo que logramos en tan poco tiempo.

Mariana (MM), gracias por tu ayuda constante tanto en el laboratorio como en lo personal, por tu compañía y tu apoyo. Gracias por tantas charlas. Que hubiéramos hecho sin vos en el laboratorio! Tu orden, tus iniciativas, tus ganas de organizar cosas hicieron la convivencia de todos mucho mejor. Por todo esto y todo lo que me olvido, gracias!!

Pablo, si bien ahora estas más lejos...como nos divertimos con tu presencia en el laboratorio. Por tu compañía en los primeros paso del laboratorio y especialmente por ayudarme a probar leyes fundamentales de la física! Gracias.

Lau, con tu llegada el laboratorio empezó a agrandarse, cada vez más mujeres!...gracias por tu ayuda y por las catarsis cotidianas en nuestras vidas corriendo!

Mariana (MG), gracias por tu apoyo y por tantas consultas. Por soportarme mientras escribía la tesis en el 5 piso...En serio, gracias por saber que siempre cuento con tu ayuda.

Jorge, gracias por tu colaboración en este trabajo.

Gracias a todos los que están y los que ya no están: Ale, Dani, Miguel, Juan, Flavia, Esteban, Sole, Guille, Norma y Mariana (MI); Juan, Néstor, Leo gracias por la gran colaboración que han hecho a esta tesis y por soportar todas mi instrucciones sin quejarse!

Gracias a todos los chicos del “quinto piso”: a Marisa por la ayuda en los momentos de “desesperación” y en particular a quienes me acompañaron en los primeros pasos del laboratorio.

También quiero agradecer a los chicos del “107 y 108” por recibirme innumerables veces en su laboratorio, en especial a Lore por tantas qPCR y ratones compartidos.

A mis amigas, a todas las “Pandys” que me ayudaron y me escucharon durante todos estos años: Agus, Delfa, Anne, Lula, Vichy, Rous, Male, Merry, Bebel. Gracias, muchas gracias, quiero que sepan que sin su compañía este trabajo hubiese sido imposible.

Finalmente quiero agradecer a mi familia cuyo constante apoyo me permitió poder cumplir esta meta tan importante para mí. En especial quiero agradecer a mi mamá, a mi tía Ana y a mi prima Tere que me acompañaron durante este largo camino.

Sin embargo no hubiese podido completar esta tesis doctoral sin el constante apoyo de mi marido y mis hijos. Por esta razón quiero dedicar esta tesis a Fer, Belu y Nico. Fer, gracias por estar ahí siempre que te necesite, gracias por ayudarme y por empujarme a cumplir con este objetivo. Por no dejarme bajar los brazos. Gracias, muchas gracias.

## COLABORACIONES

Este trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias a las colaboraciones realizadas con:

- Dr. Osvaldo Podhajcer. Laboratorio de terapia molecular y celular. Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.
- Dr. Helen Sage. Universidad de Washington.
- Dr. Scott Friedman. Mount Sinai School of Medicine, New York.
- Dr. Jesús Prieto. Universidad de Navarra.
- Dr. Marcos Rojkin. Albert Einstein College of Medicine, New York
- Dr. Ramón Bataller. Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona.

**Resultados de este trabajo fueron publicados en las siguientes revistas:**

- *Journal of Gene Medicine* 10(9):993-100, 2008. "Adenovirus-mediated inhibition of SPARC attenuates liver fibrosis in rats". Camino AM<sup>\*</sup>, **Atorrasagasti C<sup>\*</sup>**, Maccio D, Prada F, Salvatierra E, Rizzo M, Alaniz L, Aquino JB, Podhajcer OL, Silva M, Mazzolini G. <sup>\*</sup>Ambos comparten primera autoría.
- *International Journal of Cancer* 126 (11): 2726-40, 2009. "Overexpression of SPARC obliterates the in vivo tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells". **Atorrasagasti C<sup>\*</sup>**, Malvicini M<sup>\*</sup>, Aquino JB, Alaniz L, Garcia M, Bolontrade M, Rizzo M, Podhajcer OL, Mazzolini G. <sup>\*</sup>Ambos comparten primera autoría.
- *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, en prensa, 2011. SPARC down-regulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta$ 1 and PDGF. **Atorrasagasti C**, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, Benedetti L, Friedman SL, Podhajcer O, Mazzolini G.
- *Gut*, enviado, 2011. "A role for SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) in liver fibrogenesis: attenuated hepatic inflammation and fibrosis in SPARC deficient mice". **Atorrasagasti C**, Aquino JB, Kippes N, Alaniz L, Malvicini M, Bataller R, Podhajcer O, Mazzolini G.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

**Ad:** adenovirus  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** copia del ácido ácido  
**AH:** ácido hialurónico  
**ALT:** alanina aminotransferasa  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ARNi:** ARN de interferencia  
**ARNm:** mensajero del ácido ribonucleico  
**AST:** aspartato aminotransferasa  
**BSA:** albúmina bovina  
**CEH:** células estrelladas hepáticas  
**cpm:** cuentas por minuto  
**DAB:** diaminobencidina  
**DMEM:** modificación de Dulbecco del medio mínimo esencial  
**DS:** desvío estándar  
**ELISA:** análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas  
**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico  
**FITC:** isotiocianato de fluoresceína  
**gr:** gramos  
**hs:** horas  
**i.p.:** intraperitoneal  
**kDa:** kilodalton  
**kg:** kilogramos  
**kb:** kilobases  
**Knockout:** ratones deficientes de un gen  
**M:** molar  
**MEC:** matriz extracelular  
**mg:** miligramos  
**min:** minutos  
**MMP:** metaloproteinasa  
**MOI:** multiplicidad de infección  
**nm:** nanómetro  
**ns:** no significativo  
**ON:** *over night*, durante el transcurso de la noche  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** buffer fosfato salino  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**pmoles:** picomoles  
**Px:** peroxidasa  
**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**s.c.:** subcutáneo  
**seg:** segundos  
**SFB:** suero fetal bovino

**TA:** temperatura ambiente  
**TBS:** tampón tris salino  
**TEM:** transición epitelio-mesenquimal  
**TME:** transición mesenquimal-epitelial  
**TIMP:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas  
**TGF- $\beta$ 1:** factor de crecimiento tumoral  $\beta$ 1  
**UA:** unidades arbitrarias  
**U:** unidades enzimáticas  
 **$\mu$ Ci:** microcurie  
 **$\mu$ g:** microgramos  
 **$\mu$ l:** microlitros  
 **$\mu$ m:** micrómetro  
**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular  
**vs.:** versus  
**WT:** salvaje  
 **$\alpha$ -SMA:** alfa actina de músculo liso

# ***ÍNDICE***

|                                                                                                 |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                                          | <b>1</b> |
| I El hígado: nuestro órgano de estudio                                                          | 2        |
| I.1 Anatomía macroscópica                                                                       | 2        |
| I.2 Anatomía microscópica                                                                       | 3        |
| I.3 Resumen de la fisiología hepática                                                           | 5        |
| II Daño hepático crónico y fibrosis hepática                                                    | 7        |
| II.1 Fibrosis hepática                                                                          | 7        |
| II.1.a <i>El proceso fibrogénico hepático</i>                                                   | 7        |
| II.1.b <i>Características de la fibrosis según las distintas causas que la producen</i>         | 9        |
| II.2 Cirrosis                                                                                   | 10       |
| II.2.a <i>Definición</i>                                                                        | 10       |
| II.2.b <i>Fisiopatogenia</i>                                                                    | 11       |
| II.2.c <i>Manifestaciones clínicas</i>                                                          | 11       |
| II.3 Las células estrelladas hepáticas: un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática | 13       |
| II.3.a <i>Localización y fenotipo</i>                                                           | 13       |
| II.3.b <i>Caracterización</i>                                                                   | 14       |
| II.3.c <i>El papel de las células estrelladas hepáticas en el proceso fibrogénico hepático</i>  | 15       |
| II.3.d <i>Estadios en la activación de las células estrelladas hepáticas</i>                    | 16       |
| II.4 Modelos experimentales <i>in vivo</i> de fibrosis hepática                                 | 22       |
| II.4.a <i>Modelo de fibrosis inducido por tioacetamida</i>                                      | 22       |
| II.4.b <i>Modelo de fibrosis inducido por ligadura del conducto colédoco</i>                    | 22       |
| II.5 Modelos experimentales de fibrosis hepática <i>in vitro</i>                                | 23       |
| II.6 Tratamiento y perspectivas                                                                 | 25       |
| III Complicaciones de la cirrosis hepática: el hepatocarcinoma                                  | 26       |
| III.1 Epidemiología                                                                             | 26       |
| III.2 Etiología y patogenia                                                                     | 26       |
| III.3 Diagnóstico y tratamiento                                                                 | 27       |
| III.4 Nuevas estrategias de tratamiento para el hepatocarcinoma avanzado                        | 28       |
| III.5 Modelos experimentales de hepatocarcinoma                                                 | 29       |
| IV SPARC                                                                                        | 30       |

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| IV.1 Estructura                                                                               | 30        |
| IV.2 Expresión funciones generales                                                            | 32        |
| IV.3 SPARC y fibrosis                                                                         | 32        |
| IV.3.a <i>SPARC y su relación con la organización de la MEC y la síntesis de colágeno</i>     | 33        |
| IV.3.b <i>SPARC y TGF-<math>\beta</math>1</i>                                                 | 35        |
| IV.3.c <i>SPARC y los procesos de adhesión, migración y proliferación celular</i>             | 37        |
| IV.3.d <i>SPARC y Apoptosis</i>                                                               | 39        |
| IV.4 <i>SPARC y Cáncer</i>                                                                    | 39        |
| IV.4.a <i>El papel protumorigénico y prometastásico de SPARC</i>                              | 40        |
| IV.4.b <i>El papel antitumoral de SPARC</i>                                                   | 46        |
| IV.4.c <i>SPARC y hepatocarcinoma</i>                                                         | 49        |
| V Terapia Génica                                                                              | 50        |
| V.1 Definición                                                                                | 50        |
| V.2 Vectores                                                                                  | 51        |
| V.2.a <i>Vectores no virales</i>                                                              | 51        |
| V.2.b <i>Vectores virales</i>                                                                 | 51        |
| V.3 Terapia génica en fibrosis hepática                                                       | 53        |
| V.4 Terapia génica en el hepatocarcinoma                                                      | 54        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                           | <b>56</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                | <b>59</b> |
| I PARTE                                                                                       | 60        |
| I.1 Líneas celulares                                                                          | 60        |
| I.2 Producción de los vectores adenovirales recombinantes                                     | 60        |
| I.2.a <i>Generación del vector Adenoviral AdasSPARC y del vector Ad-<math>\beta</math>gal</i> | 60        |
| I.2.b <i>Preparación del stock adenoviral y purificación de los vectores adenovirales</i>     | 61        |
| I.2.c <i>Titulación del adenovirus</i>                                                        | 61        |
| I.3 Animales empleados                                                                        | 62        |
| I.4 Terapia Génica <i>in vivo</i> y desarrollo de fibrosis en ratas                           | 62        |
| I.5 Desarrollo de fibrosis en ratones SPARC <i>null</i>                                       | 63        |
| I.5.a <i>Modelo de inducción de fibrosis con tioacetamida (TAA)</i>                           | 63        |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.5.b <i>Modelo de inducción de fibrosis por ligadura del conducto colédoco</i>       | 64 |
| I.6 Determinación de la eficiencia de infección hepática de los vectores adenovirales | 64 |
| I.7 Análisis de la expresión del ARNm hepático de SPARC por PCR en tiempo real (qPCR) | 65 |
| I.7.a <i>Extracción de ARN total de tejido hepático</i>                               | 65 |
| I.7.b <i>RT-qPCR</i>                                                                  | 65 |
| I.8 Tinciones Histológicas                                                            | 66 |
| I.9 Ensayo de inmunofluorescencia para detectar SPARC y $\alpha$ -SMA en tejidos      | 67 |
| I.10 Ensayos de inmunohistoquímica                                                    | 68 |
| I.11 Ensayo de Western blot                                                           | 70 |
| I.11.a <i>Preparación de los extractos de tejido hepático</i>                         | 70 |
| I.11.b <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot</i>                | 70 |
| I.12 Determinación de la actividad inflamatoria hepática y la fibrosis                | 70 |
| I.13 Tinción histoquímica para ácido hialurónico                                      | 71 |
| I.14 Determinación de la producción de TGF- $\beta$ 1 en suero de ratón               | 72 |
| II PARTE                                                                              | 73 |
| II.1 Líneas celulares                                                                 | 73 |
| II.2 Cultivo primario de células estrelladas hepáticas de rata                        | 73 |
| II.3 Transfección con ARN de interferencia                                            | 74 |
| II.4 Transfección de la línea celular LX2 con plásmido                                | 76 |
| II.5 Análisis de la expresión del ARNm por PCR en tiempo real                         | 76 |
| II.5.a <i>Extracción del ARN total</i>                                                | 76 |
| II.5.b <i>Retro transcripción de ARN</i>                                              | 77 |
| II.5.c <i>PCR en tiempo real</i>                                                      | 77 |
| II.6 Arreglo para PCR en tiempo real                                                  | 78 |
| II.7 Inmunofluorescencia para SPARC                                                   | 79 |
| II.8 Ensayos de proliferación celular y apoptosis                                     | 80 |
| II.9 Ensayos de migración                                                             | 80 |
| II.10 Ensayo de adhesión                                                              | 81 |
| II.11 Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ 1                                 | 82 |
| II.12 Tinción de faloidina                                                            | 82 |
| II.13 Análisis estadísticos                                                           | 82 |

|                                                                                           |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| III PARTE                                                                                 | 84     |
| III.1 Líneas celulares                                                                    | 84     |
| III.2 Generación de los vectores adenovirales recombinantes                               | 84     |
| III.3 Transducción de las líneas celulares HepG2, Hep3B y Huh7                            | 85     |
| III.4 Inmunofluorescencia para SPARC                                                      | 85     |
| III.5 Generación <i>in vitro</i> de esferoides tridimensionales                           | 86     |
| III.6 Ensayo de viabilidad <i>in vitro</i>                                                | 86     |
| III.7 Determinación de la apoptosis <i>in vitro</i>                                       | 86     |
| III.7.a <i>Morfología por microscopía de fluorescencia</i>                                | 87     |
| III.7.b <i>Medición de la apoptosis por Anexina V</i>                                     | 87     |
| III.8 Análisis del ciclo celular                                                          | 87     |
| III.9 Ensayo de migración                                                                 | 88     |
| III.10 Ensayo de formación de colonias                                                    | 88     |
| III.11 Análisis de la expresión de SPARC y caderina por Western blot                      | 88     |
| III.11.a <i>Preparación de los extractos proteicos</i>                                    | 88     |
| III.11.b <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot</i>       | 89     |
| III.12 Determinación de la expresión de caderina N por citometría de flujo                | 90     |
| III.13 Determinación de la expresión de caderina N y $\alpha$ -SMA por inmunohistoquímica | 90     |
| III.14 Estudio con animales                                                               | 91     |
| III.14.a <i>Animales empleados</i>                                                        | 91     |
| III.14.b <i>Desarrollo de tumores subcutáneos</i>                                         | 91     |
| III.15 Histología y ensayo de inmunohistoquímica para macrófagos                          | 91     |
| III.16 TUNEL <i>in vivo</i>                                                               | 92     |
| <br>4. RESULTADOS                                                                         | <br>93 |
| I PARTE                                                                                   | 94     |
| I.1 Transferencia génica en hígados de ratas                                              | 94     |
| I.2 Análisis de la expresión hepática del ARN mensajero para SPARC                        | 95     |
| I.3 Inhibición de la expresión de SPARC en ratas tratadas con tioacetamida y AdasSPARC    | 96     |

|                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I.4 La administración del vector AdasSPARC disminuye el grado de fibrosis hepática en ratas                                                                            | 99  |
| I.5 Disminución de la actividad necroinflamatoria hepática inducida por tioacetamida en ratas tratadas con el vector AdasSPARC                                         | 102 |
| I.6 La inhibición de la expresión de SPARC a nivel hepático se asocia a una reducción del número de células estrelladas hepáticas activadas y miofibroblastos          | 104 |
| I.7 El desarrollo de fibrosis induce la expresión de SPARC en ratones                                                                                                  | 106 |
| I.8 Los animales SPARC <i>null</i> presentan un menor grado de fibrosis y actividad necroinflamatoria                                                                  | 107 |
| I.9 La ausencia de SPARC se asocia a un cambio en las características de los depósitos de colágeno tras la administración crónica de tioacetamida                      | 111 |
| I.10 Menor activación de células estrelladas hepáticas y miofibroblastos en ratones SPARC <i>null</i>                                                                  | 112 |
| I.11 Disminución en la expresión y en los niveles sistémicos de TGF- $\beta$ 1 en ratones SPARC <i>null</i>                                                            | 114 |
| II PARTE                                                                                                                                                               | 116 |
| II.1 Inhibición de la expresión de SPARC en líneas celulares y cultivos primarios de células estrelladas hepáticas de rata utilizando ARN de interferencia específicos | 116 |
| II.2 La inhibición de SPARC reduce la capacidad migratoria de las células estrelladas hepáticas sin afectar su capacidad proliferativa                                 | 118 |
| II.3 La inhibición de SPARC modula la síntesis y secreción de TGF- $\beta$ 1 afectando la migración celular                                                            | 121 |
| II.4 La disminución de los niveles de expresión de SPARC aumentan la capacidad adhesiva de las células estrelladas hepáticas y alteran el citoesqueleto de actina      | 123 |
| II.5 La inhibición de SPARC disminuye la expresión de ARNm para colágeno                                                                                               | 125 |
| II.6 La inhibición de SPARC induce, en las células estrelladas hepáticas, un cambio de un fenotipo mesenquimal a uno epitelial                                         | 126 |
| III PARTE                                                                                                                                                              | 129 |

|                                                                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.1 Expresión de SPARC en células de hepatocarcinoma                                                                                                                       | 129        |
| III.2 La sobreexpresión de SPARC en células de hepatocarcinoma inhibe el crecimiento en esferoides                                                                           | 130        |
| III.3 La expresión endógena de SPARC en células de hepatocarcinoma no afecta su viabilidad                                                                                   | 131        |
| III.4 Inhibición de la capacidad migratoria y la capacidad de formar clones al sobreexpresar SPARC en células de hepatocarcinoma                                             | 135        |
| III.5 El aumento de la expresión de SPARC disminuye la viabilidad de las células de hepatocarcinoma y aumenta su susceptibilidad a la apoptosis en respuesta a quimioterapia | 138        |
| III.6 La sobreexpresión de SPARC inhibe la capacidad tumorigénica de células de hepatocarcinoma                                                                              | 139        |
| III.7 Las células de hepatocarcinoma que sobreexpresan SPARC muestran un incremento de la apoptosis <i>in vivo</i> y un aumento del infiltrado de macrófagos                 | 141        |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>                                                                                                                                                          | <b>143</b> |
| I PARTE                                                                                                                                                                      | 144        |
| II PARTE                                                                                                                                                                     | 149        |
| III PARTE                                                                                                                                                                    | 153        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>                                                                                                                                                       | <b>159</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                                                       | <b>163</b> |

# ***INTRODUCCIÓN***

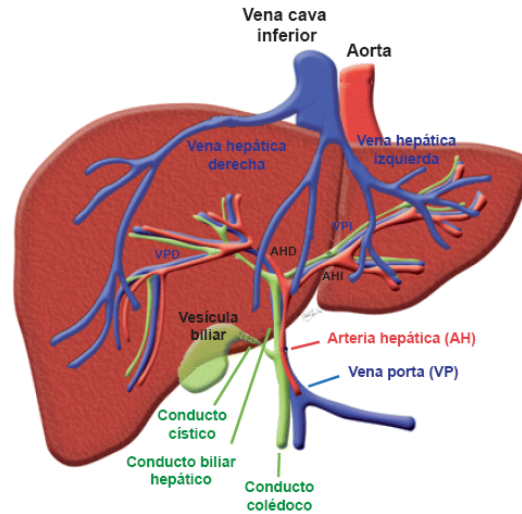
## I El hígado: nuestro órgano de estudio

---

### I.1 Anatomía macroscópica

El hígado es la víscera de mayor tamaño del organismo en el ser humano y en otros vertebrados y pesa, en el adulto, aproximadamente 1.300 gr. El hígado ocupa una posición estratégica entre la circulación esplácnica y la sistémica. Está integrado por cuatro lóbulos. Los lóbulos izquierdo y derecho, que son los más voluminosos, se encuentran separados por el ligamento falciforme, que une el hígado al diafragma y a la pared anterior del abdomen. Los otros dos lóbulos, el cuadrado y el caudado, son más pequeños y se sitúan dorsalmente en relación con los lóbulos principales. La vesícula biliar se encuentra en la cara inferior del lóbulo hepático derecho y tiene aspecto piriforme. El hígado se encuentra recubierto por la cápsula de Glisson y por el peritoneo visceral (Couinaud, 1957).

El hígado tiene doble irrigación sanguínea (**Figura 1**), la que proviene de la arteria hepática y la procedente de la vena porta. Entre el 65-85% de la irrigación hepática proviene de la vena porta que drena la sangre desde el tracto intestinal, rico en compuestos absorbidos después de la digestión, mientras que el porcentaje restante proviene de la arteria hepática y es sangre rica en oxígeno. La sangre proveniente de la vena porta y de la arteria hepática se mezclan en los sinusoides hepáticos. El flujo venoso que sale del hígado se realiza a través de las venas supra-hepáticas que, a su vez, drenan en la vena cava inferior (Porth, 2009). La vía biliar se origina en el canalículo biliar, constituido por el polo canalicular de hepatocitos adyacentes (Li *et al.*, 2004). El canalículo biliar es un pequeño canal localizado hacia la membrana apical de los hepatocitos adyacentes recubiertos de células epiteliales llamadas colangiocitos. El canalículo biliar forma una red de canales situados entre los hepatocitos que drenan en los conductos biliares intrahepáticos. Los conductos biliares interlobulares drenan en conductos progresivamente de mayor calibre y, finalmente, en el tracto biliar extrahepático. Este conducto se une al conducto cístico que proviene de la vesícula biliar y ambos forman el conducto colédoco que desemboca en el duodeno (Theise *et al.*, 1999).



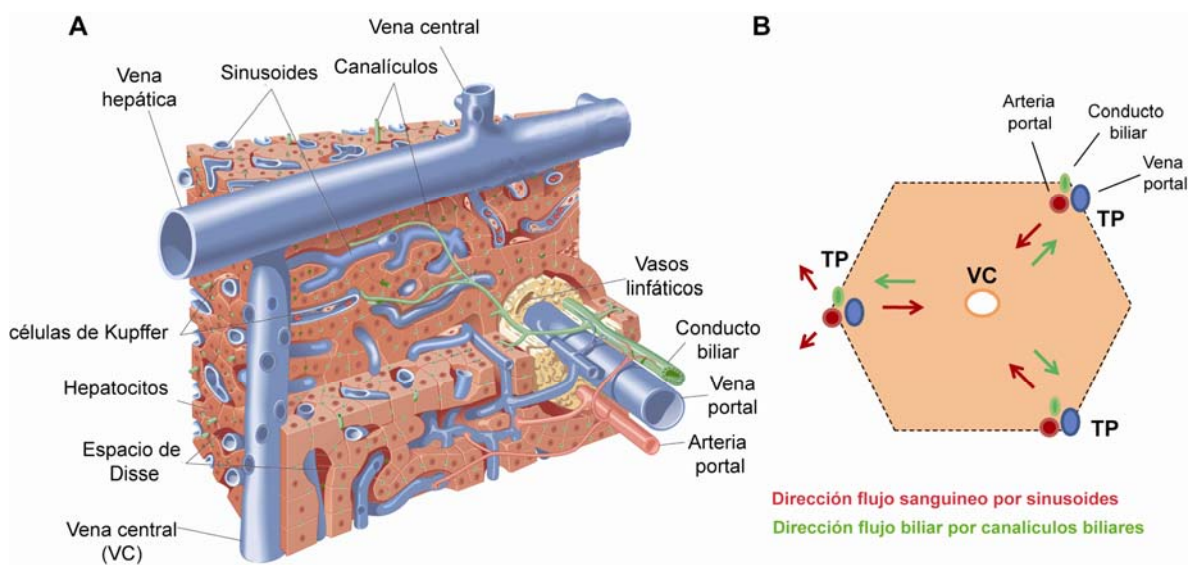
**Figura 1: Esquema de la vasculatura hepática.** Adaptado de *Vascular and Biliary Variants in the Liver: Implications for Liver Surgery* (Catalano et al., 2008). VPD, vena porta derecha; VPI, vena porta izquierda; AHD, arteria hepática derecha; AHI, arteria hepática izquierda.

## 1.2 Anatomía microscópica

La unidad microscópica del hígado es el lobulillo hepático (introducido por Ciernan en 1833). Cada lobulillo es una estructura cilíndrica (existen unos 100.000 lobulillos) y está organizado alrededor de una vena central (vena central del lobulillo o venas centrolobulillares) que drena en las venas hepáticas y finalmente en la vena cava inferior. En los extremos del lobulillo hepático clásico se encuentran los espacios porta, una estructura que contiene una rama de la arteria hepática, de la vena porta y un pequeño conducto biliar (**Figura 2**). Estos vasos están rodeados de tejido conectivo, fibroblastos y miofibroblastos. Desde los espacios porta las ramas terminales de la arteria hepática y la vena porta envían la sangre hacia los sinusoides hepáticos que se extienden desde la periferia del lobulillo hacia las venas centrolobulillares. Los sinusoides están revestidos por las células endoteliales sinusoidales. Las placas de células hepáticas, hepatocitos, no tienen más de dos capas de espesor por lo que están expuestas a la sangre que circula por el sinusoides y así incorporan y eliminan sustancias de la circulación. Los lobulillos también están compuestos por canalículos biliares ubicados entre las membranas celulares de los hepatocitos adyacentes. La bilis producida por los hepatocitos fluye hacia los canalículos y luego hacia la periferia del lobulillo que drena en conductos que van aumentando de tamaño progresivamente hasta salir del hígado y

conformar la vía biliar extra-hepática con los conductos hepáticos derecho e izquierdo que conforman el conducto hepático común (Porth, 2009).

Gracias a los estudios de Rappaport, se introdujo el concepto del acino hepático en reemplazo del lobulillo hepático; se constituye, de esta manera, una unidad tanto estructural como funcional. Así, el acino está centrado en el espacio porta y limitado por las venas centrolobulilares en la periferia. De esta manera, ante una situación de déficit de aporte de oxígeno o nutrientes, las zonas periportales son las que menos sufren y las más aptas para los procesos de regeneración (Rappaport, 1958).



**Figura 2: Anatomía e histoarquitectura hepáticas.** A) Representación estructural del tejido hepático. B) Modelo de la unidad estructural hepática, el lobulillo hepático. Las flechas rojas indican el flujo sanguíneo que circula por los sinusoides desde la zona portal hasta la VC. Las flechas verdes muestran la circulación de la bilis desde los hepatocitos que la producen hasta los conductos biliares. TP: tracto portal, VC: vena central, DB: ducto biliar. Adaptado de Wallace *et al*, 2008.

El componente epitelial, *hepatocitos*, se extiende a lo largo de los sinusoides y son las células que llevan a cabo la mayoría de las funciones biosintéticas y metabólicas del hígado. Por otro lado, las *células endoteliales* recubren los sinusoides. Dentro de los sinusoides hepáticos se encuentra una población celular mononuclear denominada *células de Kupffer*, o macrófagos hepáticos, que cumplen funciones fagocíticas principalmente de componentes celulares (eritrocitos envejecidos y hepatocitos) y macromoléculas provenientes del flujo sanguíneo, como

toxinas o bacterias. Las células de Kupffer conjuntamente con las células endoteliales sinusoidales forman el mayor sistema de remoción de células envejecidas y proteínas de la sangre. En caso de injuria hepática, las células de Kupffer participan en los mecanismos proinflamatorios relacionados y también con el proceso fibrogénico hepático (más adelante se ahondará en estas funciones). Los *colangiocitos* representan alrededor del 1% del total de células parenquimatosas hepáticas y están localizados mayoritariamente en los conductos biliares y tractos portales. Por otro lado, se estima que el hígado contiene alrededor de  $10 \times 10^{10}$  linfocitos de diferentes fenotipos localizados a lo largo de los sinusoides y tractos portales. Estos incluyen células T, NK (*"natural killer"* o asesinas naturales) y células dendríticas (CD). Entre el endotelio sinusoidal y la cara vascular de los hepatocitos se encuentra el espacio de Disse (**Figura 6**), o espacio perisinusoidal (Poli, 2000). Este espacio contiene matriz extracelular (MEC), parecida a la membrana basal, y es donde se encuentran las *células estrelladas hepáticas* (CEH) también denominadas células de Ito, lipocitos o células perisinusoidales almacenadoras de grasa (Bataller and Brenner, 2005; Friedman, 2008). Estas representan alrededor del 5-8% de las células hepáticas y desempeñan un papel clave en el proceso fibrogénico hepático (ver sección Introducción *II.3 Las células estrelladas hepáticas: un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática*).

### ***1.3 Resumen de la fisiología hepática.***

En el hígado ocurre una serie importante de procesos metabólicos y de síntesis, que son realizados principalmente por los hepatocitos.

***Metabolismo de la bilirrubina y de las sales biliares:*** el hígado es responsable de la captación de bilirrubina indirecta o no conjugada de la sangre procedente de la destrucción de los eritrocitos, la cuál es conjugada y excretada en la bilis (Porth, 2009). La bilis es esencial como vehículo para la excreción de bilirrubina, colesterol y ciertos productos del metabolismo orgánico; contiene sales biliares que son esenciales para la digestión de las grasas y la absorción de vitaminas liposolubles.

***Metabolismo de los aminoácidos:*** es una de las funciones hepáticas más importantes e involucra diferentes procesos como, la deaminación de aminoácidos (proceso necesario para poder usar las proteínas como fuente de energía y poder convertirlas en carbohidratos o lípidos), la formación de urea a partir del amonio, síntesis de aminoácidos, y síntesis de proteínas plasmáticas. En enfermedades crónicas como la cirrosis, las proteínas plasmáticas como la

albúmina pueden llegar a niveles muy bajos y tener implicancias en la generación de edemas. El hígado es también el responsable de la formación de la mayor parte de los factores involucrados en el proceso de la coagulación como fibrinógeno, protrombina, factor V y los factores II-V-VII-IX de la coagulación, denominados factores vitamina K dependientes (Guyton and Hall, 2000).

**Metabolismo de los lípidos:** Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, algunos aspectos del mismo se producen con mayor rapidez en las células hepáticas. Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes.

1. Un porcentaje elevado de beta-oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético.
2. Formación de lipoproteínas.
3. Metabolismo del colesterol y fosfolípidos.
4. Almacenamiento de vitaminas, en particular de vitamina A.

**Metabolismo de los hidratos de carbono:** Los carbohidratos se absorben en el tracto intestinal y pasan directamente al hígado desde la circulación esplácnica a través de la vena porta. Pueden ser usados inmediatamente por las células para obtener energía o almacenados en forma de glucógeno. En el período post-absortivo los hepatocitos tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de glucógeno a través de la glucogenogénesis aunque estas reservas se agotan en poco más de 24 horas en situaciones de ayuno. En el ayuno, la glucosa es capaz de liberarse (glucogenolisis); de esta forma, el hígado desempeña un papel central en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono.

**Metabolismo de los fármacos:** el hígado tiene la capacidad de detoxificar y excretar en la bilis muchas drogas (incluyendo sulfonamidas, ampicilina, eritromicina) y varias hormonas (como estrógenos, cortisol, aldosterona). La falla hepática puede causar una acumulación de estas sustancias causando efectos tóxicos.

**Funciones inmunológicas (o fagocitarias del hígado):** Las superficies internas de los sinusoides hepáticos están cubiertas por un elevado número de células de Kupffer, cuya función consiste en fagocitar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino, de modo que cuando se pierde esta función, como ocurre en pacientes con cirrosis, se generan episodios de endotoxemia. La activación de las células de Kupffer resulta en un incremento de la producción de citoquinas cuyas señales actúan sobre otros tipos de células

hepáticas. Las células de *Kupffer* tienen un importante papel en el procesamiento de antígenos durante la infección y la inflamación, iniciando la inmunidad mediada por células B y T.

## II Daño hepático crónico y fibrosis hepática

---

### II.1 Fibrosis hepática

#### II.1.a El proceso fibrogénico hepático

El hígado tiene una gran capacidad para la regeneración del parénquima en respuesta a distintos tipos de daño. De hecho, es capaz de recuperar su tamaño normal luego de pérdidas de hasta un 70% de su parénquima (Bataller and Brenner, 2005).

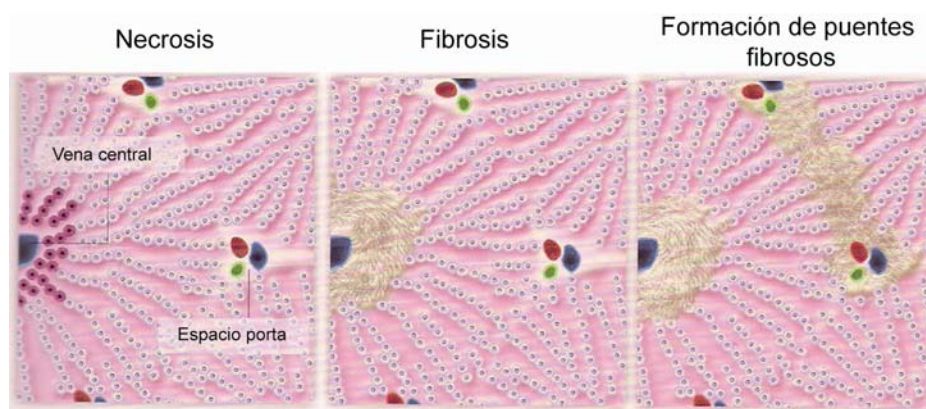
La fibrosis hepática es un proceso caracterizado por una excesiva acumulación de proteínas de la matriz extracelular en el hígado. En la actualidad se reconoce que la fibrogénesis es resultado de un proceso activo de cicatrización continuo. Desde un punto de vista histológico, la fibrosis se describe por un aumento de los depósitos de MEC tales como colágeno, elastina, glicoproteínas estructurales, proteoglicanos y carbohidratos (como por ejemplo el ácido hialurónico). Los depósitos de MEC comienzan en las zonas perisinusoidales (Espacio de Disse), extendiéndose, luego, a las zonas pericentrales o periportales, si bien esta distribución también depende en parte del tipo de lesión (ver apartado Introducción II.1.b *Características de la fibrosis según las distintas causas que la producen*). Al incremento en los depósitos de MEC se suma una disminución de los procesos normales de degradación de MEC (**Figura 3**). El continuo depósito de MEC dificulta el paso de solutos y nutrientes del sinusoides hasta el parénquima hepático contribuyendo a la muerte de los hepatocitos que conforman el parénquima. Este proceso contribuye a generar un estímulo continuo para la regeneración hepática (Friedman, 2003). La necrosis y apoptosis de los hepatocitos induce también el reclutamiento de células inflamatorias, otro evento crucial para el desarrollo de la fibrosis. Finalmente, como resultado de la inflamación y la remodelación hepáticas se altera la composición, metabolismo y depósito de MEC lo que conlleva a una distorsión de la arquitectura hepática y formación de cicatriz fibrosa.

La fibrosis avanzada altera la arquitectura normal del hígado, aumenta la resistencia al flujo sanguíneo portal lo cual contribuye a generar hipertensión portal. El incremento en la presión portal induce el desarrollo de numerosos cambios anatómicos, hemodinámicos y metabólicos conocidos en su conjunto como síndrome de Hipertensión Portal. Existen 2 grandes componentes

de esta resistencia al flujo sanguíneo portal: uno orgánico y el otro funcional, siendo este último susceptible de manipulación farmacológica y, por tanto, objeto de numerosas investigaciones.

El componente orgánico de la resistencia hepática está dado, fundamentalmente, por la alteración de la arquitectura normal y el depósito de tejido cicatricial que disminuyen la distensibilidad hepática, lo cual genera un incremento de la resistencia al flujo portal. En la hepatopatía alcohólica, previo a la aparición de la cirrosis, el mecanismo es aún más complejo. Existe un aumento de la resistencia a nivel sinusoidal debido a una reducción del lecho vascular por depósito de colágeno en el espacio de Disse, lo que se conoce como capilarización de los sinusoides, a lo que se asocia una compresión sinusoidal por el aumento del tamaño de los hepatocitos y una obstrucción postsinusoidal por esclerosis de las venas hepáticas centrales (Bosch, 2007). Una vez establecida la cirrosis, el desarrollo de nódulos de regeneración también comprimen el árbol venoso portal y contribuyen a la hipertensión portal.

El componente funcional de la resistencia hepática se encuentra modulado por sustancias endógenas producidas en el endotelio vascular, con propiedades vasodilatadoras y vasoconstrictoras, y con su principal sitio de acción sobre las CEH. Existe un desbalance en la producción de agentes vasoactivos, especialmente óxido nítrico y endotelinas, y en el tono simpático (Bataller and Brenner, 2005). El resultado final podría resumirse en que existe un exceso de actividad vasodilatadora periférica (extra-hepática) con un déficit intra-hepático de efectos vasodilatadores.

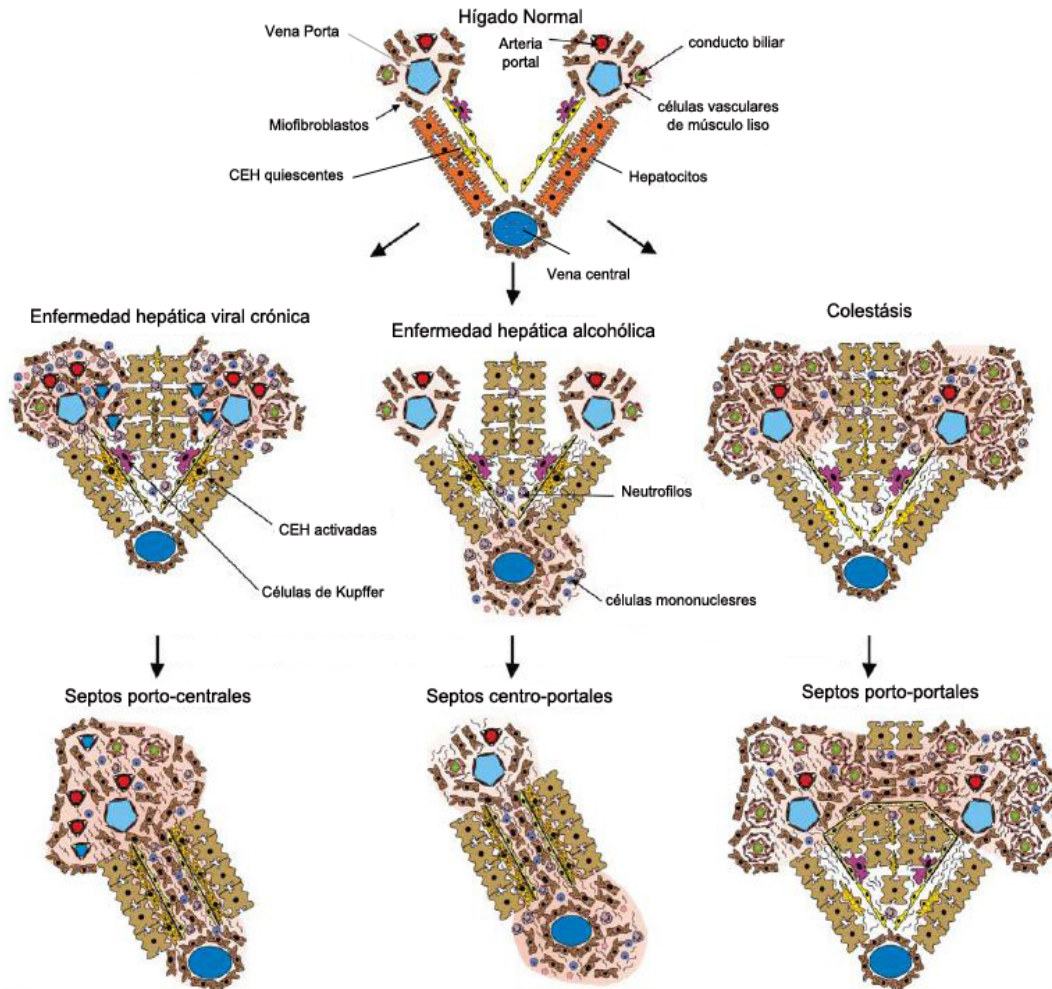


**Figura 3: Desarrollo de la fibrosis hepática.** Esquema secuencial del daño en la región pericentral. Necrosis de los hepatocitos (violeta), depósitos de matriz extracelular que conducen a una distorsión de la arquitectura hepática y a la formación de cicatriz (amarillo), formación de septos o puentes fibrosos. Adaptado de Atlas de cirrosis y cáncer hepático, fascículo 3, Bristol-Myers Squib.

En la cirrosis, y como consecuencia de la insuficiencia hepatocelular y de la hipertensión portal pueden aparecer las siguientes complicaciones: ictericia, hemorragia digestiva, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática, síndrome ascítico-edematoso, síndrome hepatorenal y hepatocarcinoma (Friedman, 1999; Bataller and Brenner, 2005).

### **II.1.b Características de la fibrosis según las distintas causas que la producen**

Existen diferentes agentes capaces de generar injuria hepática crónica. Entre ellos se encuentran la ingestión crónica de alcohol, infecciones virales crónicas ocasionadas por los virus de las hepatitis C (VHC) o B (VHB), fármacos hepatotóxicos (por ejemplo metotrexato), enfermedades metabólicas de depósito con base genéticas (por ejemplo hemocromatosis), enfermedades autoinmunitarias (como la hepatitis crónica autoinmune) y colestásicas, entre las más destacadas. Estos agentes son capaces de generar daño hepatocelular y al epitelio biliar y generar un proceso que concluye en un desequilibrio entre los procesos de fibrólisis y fibrogénesis, en favor de éste último (Bataller and Brenner, 2005) (**Figura 8**). En general, la fibrosis es un proceso que evoluciona a lo largo de varios años, solo se ha observado que puede progresar en menor tiempo en circunstancias especiales como consecuencia del daño causado por el VHC en el contexto del trasplante hepático o coinfecciones entre el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el VHC (Friedman, 2008). En otras palabras, la fibrosis hepática es la vía final común de un amplio espectro de procesos capaces de generar injuria hepática crónica, inflamación, reparación y perpetuación de este proceso. Independientemente de la causa, la fibrosis avanzada posee características similares e independientes del agente que la produjo; sin embargo, el patrón de fibrosis es diferente durante el progreso de la enfermedad. De esta forma, la hepatitis viral crónica, enfermedades colestásicas o hemocromatosis producen inicialmente fibrosis en la zona portal, mientras que la esteatohepatitis (alcohólica o no alcohólica) y la obstrucción crónica del flujo venoso producen fibrosis en la zona pericentral. Dependiendo de la causa también la formación de septos fibrosos es diferente, pueden dividirse en: porto-portales (luego de injurias colestásicas), porto-centrales (en el caso de hepatitis virales) o centro-portales (en enfermedades hepáticas derivadas del daño por alcohol) (Saile and Ramadori, 2007). En la **Figura 4** se ilustran estas diferencias.



**Figura 4: Progreso de la fibrosis dependiendo del agente causante del daño crónico.** En el hígado sano la vena central y el espacio porta se encuentran rodeados de tejido conectivo denso donde se encuentran miofibroblastos y fibroblastos portales. La sangre circula por los sinusoides desde la región portal hacia la vena central. Los sinusoides están revestidos de células endoteliales. Las CEH se localizan en el espacio perisinusoidal entre las células endoteliales y los hepatocitos. Frente al daño, las CEH (en amarillo) y los miofibroblastos se activan y producen MEC (zonas rosadas). En la enfermedad hepática viral la fibrosis comienza en la zona periportal y progresa con puentes porto-centrales; en la alcohólica es pericentral con puentes centro-portales. En la colestásis se forman puentes porto-portales con proliferación de conductos biliares, diferenciación y proliferación de miofibroblastos que se expanden en las zonas portales. En todos los casos aumentan las células inflamatorias (azules) en los septos y regiones con daño.

## II.2 Cirrosis

### II.2.a Definición

Podría definirse a la cirrosis como una enfermedad crónica del hígado, difusa e irreversible cuya característica dominante es la fibrosis extensa y la distorsión del parénquima hepático que

adquiere un aspecto nodular (Anthony *et al.*, 1978). El flujo sanguíneo intra-hepático se altera, se forman septos fibrosos y nódulos de regeneración de hepatocitos que, como dijimos, distorsionan la arquitectura hepática normal. El término cirrosis deriva del griego *kirrhos*, que hace referencia al color amarillo-anaranjado del hígado que ha padecido un extenso proceso de fibrosis. Cualquier proceso que induzca una injuria crónica al hígado puede causar la progresión hacia la fibrosis avanzada, incluso la cirrosis. A pesar de que existen numerosos mecanismos fisiopatogénicos que pueden ocasionar daño en el hígado, la vía común a todos ellos es la fibrosis permanente del parénquima hepático (Heidelbaugh and Bruderly, 2006).

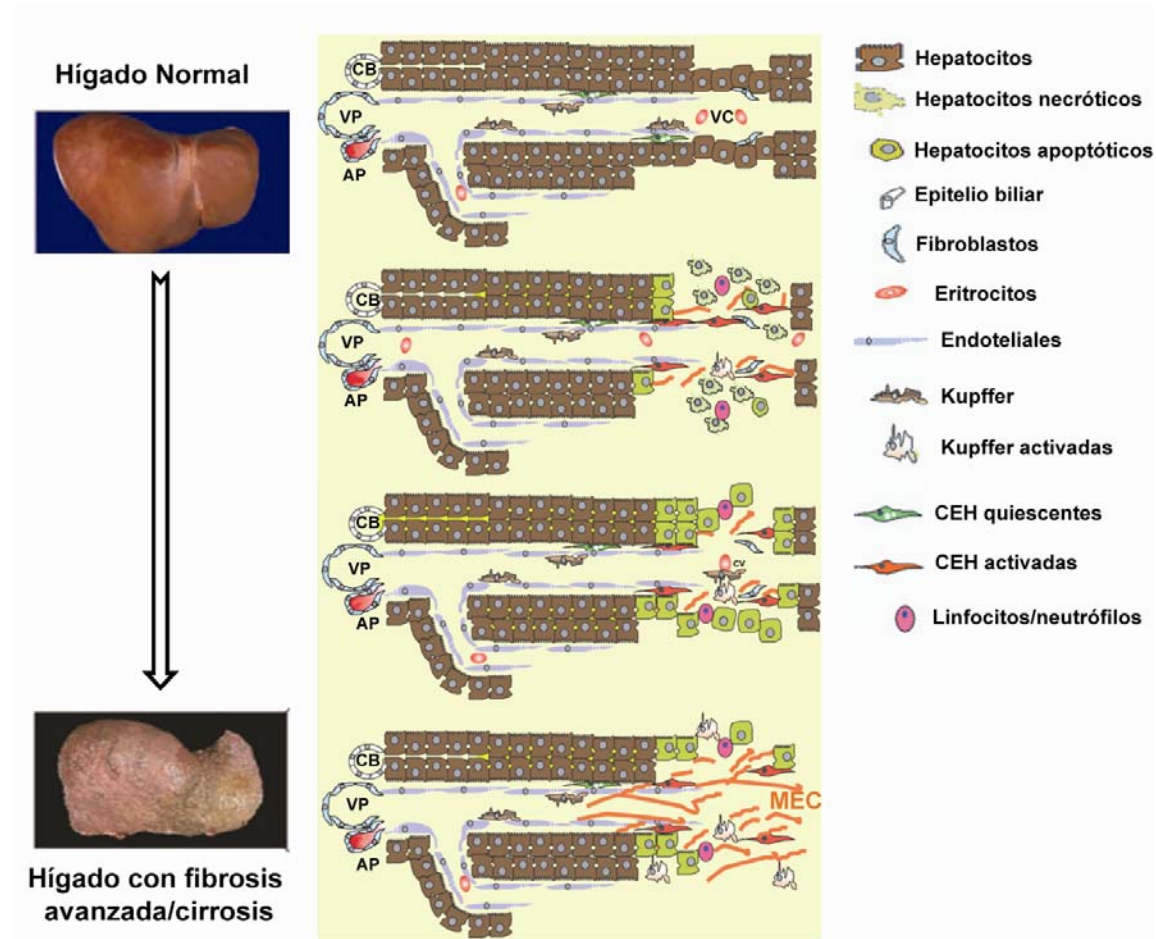
### **II.2.b Fisiopatogenia**

Luego de una lesión aguda capaz de generar necrosis, el hígado reemplaza a las células necróticas por nuevas células (Friedman and Bansal, 2006). Este proceso está asociado con una respuesta inflamatoria y con el depósito limitado de MEC. Si el proceso de agresión continúa, el de regeneración falla, y los hepatocitos son reemplazados por cantidades abundantes de proteínas de la MEC, que incluyen colágeno fibrilar, se terminan formando cicatrices fibrosas. A medida que la fibrosis progresa, las distintas zonas de depósito se unen por septos o puentes, y la cirrosis se instala como enfermedad (**Figura 5**).

Tanto la cantidad como la composición de la MEC se encuentran alteradas en la cirrosis. La MEC normal es degradada y reemplazada por hasta seis veces más de MEC rica en colágeno fibrilar (colágeno I, III y IV), fibronectina, elastina, laminina y proteoglicanos. Este incremento se debe a una mayor producción y a una menor degradación de la MEC, coincidente con la mayor expresión de los inhibidores de las proteinasas de la matriz. En este contexto se ha establecido claramente que las principales células generadoras de esta MEC alterada son las CEH (Friedman, 2004).

### **II.2.c Manifestaciones clínicas**

La cirrosis suele presentarse en pacientes entre los 40 y 70 años de edad, aunque puede hacerlo a cualquier edad dependiendo de la situación clínica. El diagnóstico puede en ocasiones hacerse en un paciente sin síntomas y sin complicaciones (cirrosis hepática compensada). En otras ocasiones, el paciente con cirrosis hepática puede diagnosticarse ante hallazgos como hepatomegalia, ictericia, esplenomegalia, estigmas cutáneos de hepatopatía crónica o como resultados de alteraciones del laboratorio (descenso del valor de las plaquetas, alteraciones en las pruebas de coagulación, entre otras); como parte de un examen de rutina o como consecuencia de estudiar a un paciente que consulta por síntomas diversos como fatiga, cansancio, pérdida de la



**Figura 5: Progresión de la fibrosis hacia la cirrosis** La flecha señala la progresión de los cambios desde un hígado sano hasta un hígado con fibrosis avanzada. La arquitectura normal del parénquima hepático está alterada. Con el transcurso del tiempo avanza el daño hepático. El daño induce muerte de hepatocitos y fibrosis, seguido de intento de regeneración hepática. Cuando esta falla la zona se reemplaza por tejido fibroso. VC, vena central; VP, vena porta; CB, conducto biliar; AP, arteria hepática. Modificado de *Liver fibrosis* (Wallace *et al.*, 2008).

libido, anorexia, náuseas. En otras circunstancias, el diagnóstico se hace cuando los pacientes presentan alguna complicación mayor de la cirrosis (cirrosis hepática descompensada) como la presencia de ascitis, sangrado digestivo, encefalopatía hepática o hepatocarcinoma. Los pacientes con cirrosis compensada tienen una supervivencia relativamente prolongada; por el contrario, cuando se presenta alguna de las complicaciones mayores, el pronóstico, en general, es ominoso en el corto plazo (García-Tsao *et al.*, 2010).

La mayoría de los pacientes con cirrosis tienen un elevado riesgo de padecer HC, y algunos trabajos muestran un incremento de la incidencia del HC de más de 20 veces, luego de tres años de producida esa enfermedad. El HC es una de las causas principales de muerte en pacientes con cirrosis (El-Serag and Rudolph, 2007).

### **II.3 Las células estrelladas hepáticas: un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática**

#### **II.3.a Localización y fenotipo**

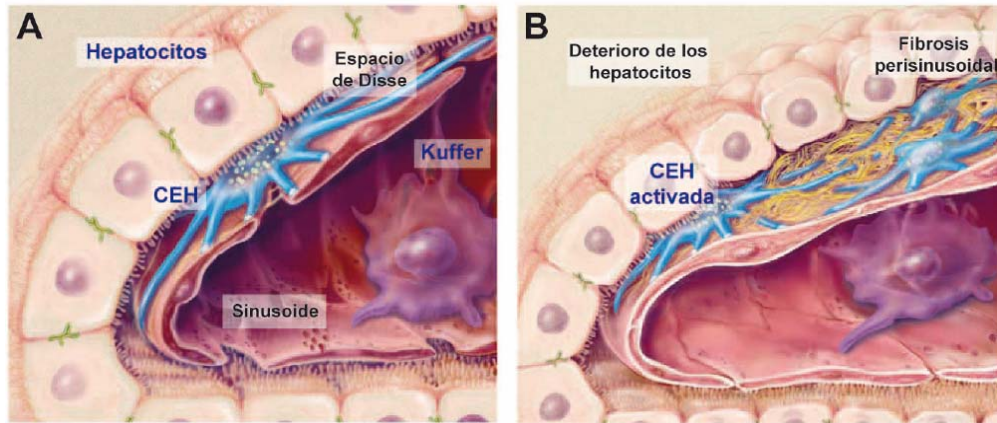
Las CEH representan entre el 5 y el 8% del total de las células del parénquima hepático (Geerts, 2001). Se encuentran situadas en el espacio de Disse y se caracterizan por presentar largas extensiones citoplasmáticas que rodean los sinusoides, característica que les permite participar de la regulación del flujo sanguíneo hepático, especialmente cuando se encuentran activadas y contraídas contribuyendo a la generación de hipertensión portal denominada dinámica o reversible (Pinzani, 1999).

En el hígado normal presentan un fenotipo de tipo quiescente y morfológicamente pueden ser identificadas por la presencia de vacuolas intra-citoplasmáticas que contienen vitamina A, un retículo endoplasmático rugoso (RER) poco desarrollado y un pequeño aparato de Golgi (Geerts, 2001). Las funciones de las CEH en ausencia de un estímulo fibrogénico son:

- a) Homeostasis y almacenamiento de vitamina A y retinoides;
- b) Regulación del recambio de la MEC: la síntesis y la degradación de la MEC hepática normal es esencial para la integridad del espacio de Disse y para la comunicación intra e intercelular entre las células vecinas;
- c) Secreción de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales contribuyen a la homeostasis de la MEC (Reynaert *et al.*, 2002);
- d) Control del diámetro de los sinusoides; regulando el flujo sanguíneo sinusoidal (Geerts, 2001).

En situaciones en las que existe injuria hepática, las CEH sufren un proceso de activación y transformación, adquiriendo un fenotipo tipo miofibroblasto. Este linaje se caracteriza por presentar una elevada capacidad proliferativa, sintética y contráctil (Lieber, 2005; Friedman, 2000). Los principales cambios morfológicos observados son: -la pérdida de gránulos de vitamina A, -la presencia de un RER y un aparato de Golgi muy desarrollados, -aumento del tamaño de los núcleos, -estiramiento citoplasmático y de las prolongaciones citoplasmáticas. Cuando la injuria

hepática se prolonga, todos estos cambios se perpetúan. En la **Figura 6** se muestra, esquemáticamente, este cambio de fenotipo.



**Figura 6:** Cambios en el espacio de Disse durante la activación de las CEH. **A)** Arquitectura típica de un sinusoide normal con CEH quiescentes (azul). **B)** Luego de la injuria las CEH se activan y se producen cambios en el espacio de Disse, principalmente se nota la acumulación de matriz fibrilar (extraído y modificado de *Liver fibrosis from bench to bedside*, Scott Friedman)

### II.3.b Caracterización

El origen embrionario de estas células no está bien establecido y aún existe controversia en este aspecto (Geerts, 2001). Las CEH se caracterizan por expresar proteínas del citoesqueleto como la actina alfa del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y filamentos intermedios de clase III (ej. vimentina, nestina y desmina). No obstante, las CEH expresan proteínas de origen neuronal como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio de clase III utilizado como marcador específico de astrocitos (Eng and Ghirnikar, 1994); la nestina, un filamento intermedio de clase IV utilizado como marcador de células madres neuronales (expresada solo en CEH activadas de ratas) (Niki *et al.*, 1999); la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM) (Knittel *et al.*, 1996); la synaptophysin (SYN), proteína involucrada en la exocitosis de neurotransmisores (Cassiman *et al.*, 1999); y sustancias neurotróficas como factores de crecimiento neuronal (NGF), neurotrofina derivada de cerebro (BDN), neurotrofina y sus receptores. La expresión de estas proteínas indicaría un posible origen neuronal, sin embargo, tanto las sustancias neurotróficas como sus receptores han sido identificados en una variedad de células mesenquimales como los fibroblastos y miofibroblastos (Cassiman *et al.*, 2001).

Se postula que podrían tener un origen mesenquimal, sin embargo, las CEH quiescentes (inactivas) solo expresan marcadores mesenquimales en muy bajo nivel, más aún, se ha observado que las CEH provenientes de hígados humanos y de rata expresan citoqueratinas, marcadores característicos de células epiteliales (Cassiman and Roskams, 2002; Suskind and Muench, 2004). En este sentido, en CEH quiescentes de rata se demostró la expresión de caderina E (caderina epitelial), una glicoproteína transmembrana involucrada en uniones célula-célula. Sin embargo, tras su activación, las CEH entran en un proceso de transición y cambio progresivos a un fenotipo de tipo mesenquimal caracterizado por un aumento de la expresión de los marcadores previamente descritos así como también de caderina N (Lim *et al.*, 2007). La secuencia temporal de eventos moleculares asociados con la activación de las CEH, central en el desarrollo de la fibrosis, puede reproducirse *in vitro* aislando CEH de hígados normales y cultivando las células sobre plástico (para más detalles ver apartado Introducción II.5 Modelos experimentales de fibrosis hepática *in vitro*).

### **II.3.c El papel de las células estrelladas hepáticas en el proceso fibrogénico hepático**

Las CEH juegan un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis hepática, al ser las principales productoras de proteínas de MEC (Nieto *et al.*, 2002; Friedman, 2004). Al pasar de un fenotipo quiescente a uno activado aumentan de forma drástica la síntesis de colágeno, principalmente de tipo I y III, los cuales predominan sobre la producción de colágenos tipo IV y otros componentes de la MEC (Friedman, 1993; Alcolado *et al.*, 1997)(Figura 6).

Aparte de los cambios cuantitativos en lo que respecta a la producción y acumulación de MEC observados durante el proceso de fibrogénesis, también existen cambios cualitativos en la composición de la MEC (Gressner and Weiskirchen, 2006). La MEC está formada principalmente por colágenos de tipo I, III, IV, V, VII, y por componentes de tipo no colágeno como glicoproteínas (fibronectina, laminina, entre otras) y proteoglicanos sulfatados. Como se explicó previamente, en el proceso de fibrogénesis la producción de MEC aumenta entre 3-5 veces, y existe un cambio en el tipo de MEC, se pasa de tener una matriz de baja densidad formada principalmente por colágeno tipo IV, V y VII a una matriz de alta densidad formada principalmente por colágenos de tipo I, III (Gressner and Weiskirchen, 2006). Este cambio cualitativo es favorecido por un cambio en la actividad de las metaloproteinasas (MMP). En este sentido, durante el proceso de fibrogénesis se ha observado una disminución de MMP-1 (colagenasa tipo I), y un aumento en la producción de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (responsables de la degradación de la matriz de baja

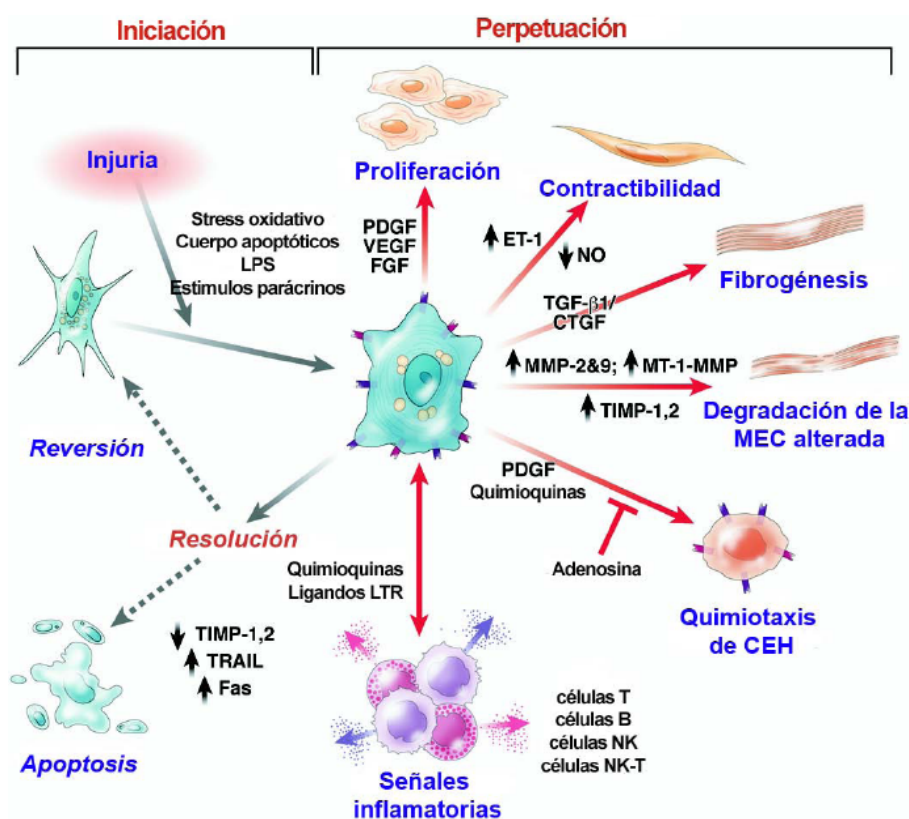
densidad). Las CEH son la fuente principal de MMP-2 y MMP-3 (Vyas *et al.*, 1995; Arthur *et al.*, 1992) y las células de Kupffer de MMP-9 (Winwood *et al.*, 1995). El depósito de MEC de alta densidad actúa como estímulo sobre las CEH para que produzcan más MMP-2, estableciendo un mecanismo de retroalimentación positiva (Theret *et al.*, 1999; Benyon *et al.*, 1999). Las CEH, a su vez, aumentan la expresión de inhibidores de metaloproteinasa, TIMP-1 y TIMP-2, que inhiben la actividad de las metaloproteinasas intersticiales (MMP-1), favoreciendo así este cambio cualitativo.

### **II.3.d Estadios en la activación de las células estrelladas hepáticas**

El fenómeno de activación de las CEH tiene lugar como una secuencia de eventos bien interrelacionados que se describen a continuación (Friedman, 2000; Friedman, 2004) (**Figura 7**). Los primeros pasos, que conforman el proceso de **iniciación**, comprenden cambios rápidos en la expresión génica asociados a eventos transcripcionales e inducción de genes tempranos inmediatos, que facilitan la respuesta celular a citoquinas, factores de crecimiento y estímulos locales de origen parácrino o autocrino (Friedman, 2000). Las CEH aumentan la expresión del receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y desarrollan un fenotipo contráctil y fibrogénico. Estos primeros pasos en la activación de las CEH ocurren dentro de un entorno con cambios progresivos de la MEC dentro del espacio de Disse. Con el paso del tiempo, la composición de la MEC deja de ser una matriz de tipo basal (colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos) para convertirse en una matriz más fibrilar (rica en colágeno fibrilar); estos cambios alteran aun más a las CEH. Además, se observan cambios en receptores de membrana (integrinas) que censan los cambios del entorno provocando activación, cambios en el citoesqueleto y migración de las CEH a los sitios de injuria (Friedman, 2004). También es importante, sobre todo en la fibrosis causada por el consumo crónico de alcohol, la estimulación parácrina por parte de los hepatocitos, células de los conductos biliares lesionados, células del epitelio biliar, las células inflamatorias, los macrófagos activados y los neutrófilos (Friedman, 2000; Bonacchi *et al.*, 2001; Purohit and Brenner, 2006) (**Figura 8**).

Los pasos posteriores incorporan los sucesos celulares que amplifican el fenotipo activado potenciando la expresión de citoquinas y la reactividad celular (Friedman, 2000). La **perpetuación** de la activación de las CEH conlleva respuestas fenotípicas fundamentales mediadas por una mayor producción de citoquinas y remodelación de la MEC (**Figura 7**). Estas respuestas fenotípicas son:

**1. Proliferación.** El aumento de la cantidad de CEH en el hígado lesionado se produce, al menos en parte, en respuesta a factores de crecimiento locales, la mayoría de los cuales señalizan a través de receptores de tipo tirosin-quinasa (Pinzani *et al.*, 1998; Pinzani and Marra, 2001). Entre estos factores, el PDGF es el más potente y mejor estudiado, con un papel menor pero destacado para TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*) (Pinzani, 2002; Gressner *et al.*, 2002).



**Figura 7: Pasos en la activación de las CEH.** Luego de la injuria hepática, las CEH se activan con la consecuente transición desde células en estado quiescente a células de tipo miofibroblasto. Los cambios incluyen a procesos de proliferación, contractilidad, fibrogenesis, degradación de MEC, quimiotaxis, pérdida de gránulos de vitamina A, entre muchos otros. Los principales mediadores de estos efectos se señalan en negro (extraído y modificado de *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*, Scott Friedman)

**2. Contractilidad.** Mecanismo importante que justifica la mayor resistencia al flujo portal en la fibrosis hepática. Aun en los primeros estadios de la fibrosis, las CEH se caracterizan por un fenotipo similar a las células de músculo liso, con expresión de diferentes proteínas filamentosas contráctiles como  $\alpha$ -SMA. A medida que la fibrosis progresa aumenta el número y densidad de CEH que dificultan el flujo portal normal. El estímulo contráctil más potente para las CEH es la

endotelina 1 (ET-1); otros agentes reguladores del tono contráctil de las CEH son el óxido nítrico (con un efecto opuesto a la ET-1), la angiotensina II y la somatostatina, entre otros (Reynaert *et al.*, 2002).

**3. Quimiotaxis.** Como se comentó anteriormente, durante el desarrollo de la fibrosis se producen cambios en el microambiente del espacio de Disse, donde uno de los eventos más destacados es el reemplazo de la matriz basal por matriz fibrilar. Además, se liberan factores de crecimiento pro-fibrogénicos, por parte de hepatocitos, células inflamatorias y las mismas CEH activadas. Diferentes autores demostraron que las CEH migran hacia los sitios de injuria inducida por estos estímulos quimiotractantes, por ejemplo PDGF (Kinnman *et al.*, 2000), la proteína quimiotáctica monocitaria 1 (MCP-1) (Marra *et al.*, 1999), ligando de CXCR3 (Bonacchi *et al.*, 2001), TGF- $\beta$ 1 o EGF (*epithelial growth factor*) (Yang *et al.*, 2003). De manera interesante, Yang y colaboradores también observaron incremento de la migración inducida por colágeno tipo I pero no por colágeno tipo IV en líneas de CEH de rata. Los mismos autores demostraron que la estimulación directa de las líneas celulares de CEH con PDGF o TGF- $\beta$ 1 induce migración. Asimismo observaron que la migración utilizando quimiotractante no es dependiente de MMPs, pero sí lo es de PDGF o TGF- $\beta$ 1. Finalmente, se observó que en el proceso de migración participan mecanismos dependientes de integrinas (Yang *et al.*, 2003; Patsenker *et al.*, 2007).

**4. Fibrogénesis.** El aumento en la síntesis de colágeno de tipo I es una de las respuestas moleculares más llamativas de las CEH frente a la lesión y está regulada a nivel transcripcional y traduccional (Nieto *et al.*, 2001) (**Figura 8**). La síntesis de colágeno está regulada principalmente por TGF- $\beta$ 1 de forma autocrina y paracrina, por lo tanto, se la considera una citoquina profibrogénica clásica. TGF- $\beta$ 1 tiene un papel fundamental en la iniciación, promoción y progresión de la transdiferenciación de las CEH. Durante la activación de las CEH, TGF- $\beta$ 1 activa las proteínas Smads 2 y 3 que incrementan aun más la fibrosis (Phanish *et al.*, 2006). El factor de crecimiento conectivo tisular (CTGF/CCN2) también es una potente señal fibrogénica para las CEH (Gao and Brigstock, 2004). Su regulación puede ser dependiente (Grotendorst, 1997) o independiente (Brigstock, 2003) de TGF- $\beta$ 1. También existen señales neurohumorales, en particular de tipo canabinoides, que contribuyen a la activación de las CEH y a la fibrosis (Mallat *et al.*, 2007).

**4. Degradación de la matriz.** Los cambios de la actividad proteolítica de la matriz conducen a la remodelación de la MEC en la lesión hepática, acelerando la activación de las CEH (Rojkind, 1999).

Las MMPs contribuyen a la degradación, bien patológica o bien restauradora/fisiológica, de la MEC (**Figura 8**). Las MMP pueden activarse mediante escisión proteolítica o inhibirse por su unión a inhibidores específicos conocidos como inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) (Iredale, 1997). Las MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MT-MMP1 intervienen en la degradación de la MEC subendotelial normal, que es sustituida por colágenos formadores de fibras capaces de estimular el crecimiento de las CEH (Xu *et al.*, 2004; Senties-Gomez *et al.*, 2005; Benyon and Arthur, 2001). Además, la expresión de TIMP-1 en las CEH activadas inhibe la MMP-1, la principal metaloproteinasa responsable de la degradación del colágeno de tipo I (Benyon and Arthur, 2001). La expresión persistente de TIMP-1 hace que la respuesta fibrogénica proliferen (Yoshiji *et al.*, 2000; Yoshiji *et al.*, 2002). Las MMP y las TIMP son sensibles a las especies reactivas del oxígeno, las especies reactivas de nitrógeno, las citoquinas y los factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1.

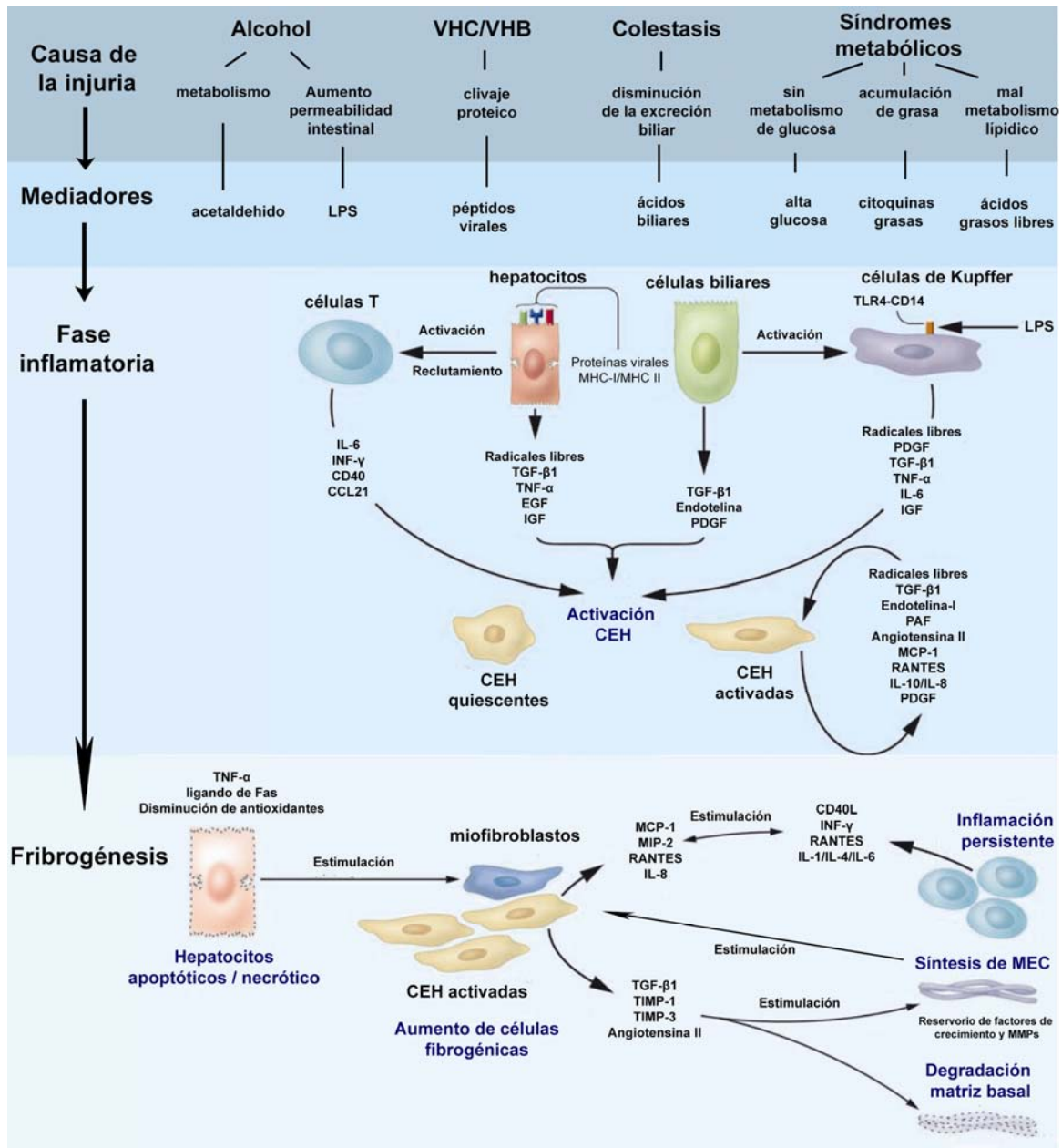
**5. Señales inflamatorias y liberación de citoquinas.** Las CEH no sólo son blanco de diversas citoquinas inflamatorias que contribuyen a su activación, sino que se ha demostrado que tienen un papel importante como moduladoras de la respuesta inflamatoria e inmunitaria hepática. Cada vez son más las citoquinas y receptores que pueden tanto aumentar la fibrogénesis como interactuar con células inflamatorias para modificar la respuesta inmunitaria en respuesta al daño (Marra, 2002). Por ejemplo, las CEH liberan quimioattractantes neutrofílicos y monocitarios capaces de amplificar la inflamación en caso de lesión hepática. Entre estos factores se destacan el factor estimulante de colonias (CSF), MCP-1, la interleucina 6 y el quimioatrayente neutrofílico inducido por citoquinas/IL-8 (CINC) (Schwabe *et al.*, 2003; Pinzani *et al.*, 1992; Marra *et al.*, 1998). La mayor producción y actividad de las citoquinas es crítica para poder perpetuar la activación de las CEH. La MEC constituye también un reservorio importante de factores de crecimiento, incluidos el TGF- $\beta$ 1, el PDGF, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y el factor activador de plaquetas (PAF) (Friedman, 1999; Marra, 2002).

Las evidencias de que la fibrosis puede ser reversible han intensificado el interés por estudiar los mecanismos que participan de la **resolución** de la fibrosis. En este contexto, la fibrosis podría revertirse induciendo la apoptosis o necrosis de las CEH activadas, o menos probablemente, transformando las CEH activadas en células con un fenotipo más quiescente.

**Apoptosis de las CEH activadas.** La resolución espontánea de la fibrosis experimental se asocia con la eliminación de los miofibroblastos  $\alpha$ -SMA positivos productores de colágeno de tipo I (CEH

activadas y fibroblastos portales transdiferenciados); este proceso sería dependiente de la inducción de la apoptosis en CEH. En este sentido, la apoptosis de los miofibroblastos se asocia a una menor expresión de TIMP1, que protege a las CEH activadas de la apoptosis, y a un aumento de la actividad de la MMP-1 en el hígado (Iredale *et al.*, 1998).

***Transdiferenciación inversa de las CEH activadas hacia un fenotipo quiescente.*** Una hipótesis postulada para revertir la fibrosis se basa en generar la transdiferenciación de las CEH activadas hacia un fenotipo más quiescente. Las CEH quiescentes contienen vitamina A y triglicéridos, que desaparecen en las CEH activadas (Friedman, 2000; Friedman, 2004). La regulación transcripcional adipogénica/lipogénica que confieren PPAR, LXR y SREBP-1c es necesaria para mantener el fenotipo quiescente y de almacenar grasa de las CEH. La expresión de estos factores de transcripción se pierde en las CEH activadas (Miyahara *et al.*, 2000). Por otra parte, el tratamiento de las CEH activadas con un cóctel de diferenciación adipocitaria, la expresión ectópica de PPAR $\gamma$  o SREBP-1c (Hazra *et al.*, 2004) o la inhibición de la vía Necdin-Wnt (Zhu *et al.*, 2010) producen el cambio hacia el fenotipo quiescente.



**Figura 8: Mecanismos celulares involucrados en la fibrosis hepática.** Diferentes agentes hepatotóxicos son capaces de producir mediadores que facilitan el desarrollo de la fibrosis hepática. Las células del epitelio biliar y los hepatocitos dañados liberan factores y citoquinas que a su vez activan a las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de linfocitos generando un microambiente que promueve la activación de las CEH. A su vez, las CEH activadas producen citoquinas que perpetúan su activación, aumentando la cantidad de células fibrogénicas. Estas degradan la matriz basal y sintetizan MEC fibrótica e impiden su degradación a través de la producción de inhibidores de MMP. El aumento de MEC induce apoptosis y necrosis de hepatocitos que estimula aun más la activación de las CEH. MCP-1, proteína quimiotractorante de monocitos; CCL21, C-C ligando 21 quimioquina; PAF, factor derivado de plaquetas; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad (Extraído y modificado de *Liver fibrosis*, Bataller *et al*, 2005).

## **II.4 Modelos experimentales in vivo de fibrosis hepática**

Los modelos animales son de gran utilidad en el estudio de la fibrogénesis hepática así como también son valiosos para ensayar distintos agentes antifibróticos. La complejidad de la fibrosis y de los procesos de comunicación entre los diferentes tipos celulares protagonistas de la fibrogénesis es muy importante. Por otro lado, es crítico el papel que ejercen otras células no parenquimatosas hepáticas como células de Kupffer, endoteliales sinusoidales y mononucleares residentes en el hígado. En la **Tabla 1** se describen los modelos disponibles, siendo los modelos de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), tioacetamida (TAA) y ligadura del conducto colédoco los más utilizados tanto en ratas como en ratones

En general, las ratas toleran y desarrollan mejor la fibrosis que los ratones, sin embargo, los modelos de fibrosis en ratón se han utilizado más ampliamente, en parte, debido al extendido uso de modelos en ratones transgénicos y *knockouts*. En esta tesis doctoral trabajamos con el modelo de toxicidad crónica inducido por TAA tanto en rata como en ratón. Y con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en los modelos mencionados también se utilizó el modelo de ligadura del conducto colédoco en ratones.

### **II.4.a Modelo de fibrosis inducido por tioacetamida**

La TAA es conocida como un potente agente hepatotóxico. Se ha demostrado que este compuesto debe ser bioactivado por citocromo P450 y/o por el sistema monooxigenasa conteniendo-flavina (FMO) que lo convierten en TAA-S-óxidos capaces de generar necrosis centrolobulillar (Hunter *et al.*, 1977; Porter *et al.*, 1979). Estos productos tóxicos generan daño mediante la inducción de cambios en la permeabilidad celular, incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibición de la actividad mitocondrial por lo que conducen, finalmente, a la muerte celular (Ambrose *et al.*, 1949; Neal and Halpert, 1982). La aplicación crónica de TAA (300 mg/l en el agua de bebida o en dosis de 200 mg/kg intraperitoneal 2 o 3 veces por semana, durante hasta 12 semanas, produce una fibrosis preferentemente pericentral con eventual formación de puentes entre venas centrales y porto-portales tanto en rata como en ratón (Muller *et al.*, 1988; Oren *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002)

### **II.4.b Modelo de fibrosis inducido por ligadura del conducto colédoco**

En este modelo se produce una obstrucción quirúrgica extra-hepática del flujo de bilis hacia el duodeno. Se ha observado que en este modelo los ácidos biliares estimulan la apoptosis

de los hepatocitos y se generan altos niveles la necrosis (Miyoshi *et al.*, 1999). A su vez, Sokol y colaboradores demostraron que los ácidos biliares estimulan el estrés oxidativo y aumentan la producción de TGF- $\beta$ 1 y colágeno (Sokol *et al.*, 1995). El daño se produce principalmente en el área periportal con la inducción de la muerte de los hepatocitos y la generación de inflamación (Palmeira and Rolo, 2004). En este modelo, la duración de esta obstrucción puede extenderse hasta 16 días en ratones y hasta 21 días en ratas; se observa una fibrosis periportal con formación de puentes fibróticos porto-portales.

## **II.5 Modelos experimentales de fibrosis hepática in vitro**

La adhesión al plástico de las CEH es capaz de generar un proceso de activación en las mismas con algunas características similares a las que ocurren *in vivo*, es por ello que este modelo es muy valioso para el estudio de las CEH. Sin embargo, el aislamiento de las CEH es muy laborioso y el rendimiento es relativamente bajo. Para compensar estas dificultades se han establecido varias líneas inmortalizadas de CEH con las que ha sido posible realizar numerosos avances a nivel celular y molecular del proceso fibrogénico en las CEH (Herrmann *et al.*, 2007).

El aislamiento de CEH y su cultivo en plástico es uno de los modelos *in vitro* de fibrosis hepáticas más aceptado. La activación espontánea que sufren las CEH quiescentes en el cultivo en placa, así como la subsiguiente transdiferenciación a miofibroblastos es considerado un fenómeno que refleja de una manera bastante ajustada lo que acontece a nivel celular y molecular durante el proceso de fibrogénesis hepática *in vivo* (Bataller and Brenner, 2005). Existen diversos protocolos para aislar las CEH, aunque todos ellos presentan las dificultades previamente mencionadas. Una vez puestas en cultivo y hasta el día 3 se consideran CEH quiescentes, luego comienzan a activarse y al día 7 ya adquieren un fenotipo activado de tipo miofibroblástico.

Se han establecido varias líneas inmortalizadas de CEH con las que se han realizado avances significativos en el estudio de las fibrosis hepática (Herrmann *et al.*, 2007). Las líneas celulares provienen de CEH de rata, ratón y humanas. Otra de las ventajas que tienen las líneas celulares en comparación con los cultivos primarios es que son relativamente fáciles de transfectar. En esta tesis doctoral se utilizaron, además de cultivos primarios, dos líneas de CEH: las LX2, de origen humano, y las CFSC-2G, provenientes de rata (ver descripción en *Materiales y Métodos*).

**Tabla 1:** Modelos *in vivo* de fibrosis hepática (extraído y adaptado de *Liver fibrosis*, Wallace *et al*, 2008)

| Agente hepatotóxico (dosis standard)                                                                               | Modelo animal | Mecanismo principal de daño                                                                  | Hallazgos histológicos asociados                                            | Características de la fibrosis           | Referencias                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CCl <sub>4</sub> : 1ml/kg i.p. dos veces por semana durante 4-12 semanas                                           | Rata, ratón   | Peroxidación lipídica                                                                        | Necrosis de hepatocitos centro-lobulillares                                 | Pericentral con puentes centro-centrales | (Constandinou <i>et al.</i> , 2005; Plaa, 2000; Cheeseman <i>et al.</i> , 1985)                                                            |
| Tioacetamida: 300mg/l en agua de bebida o 200mg/kg i.p. 3 veces por semana durante 8-12 semanas                    | Rata, ratón   | Generación de especies de tioacetamida sulfóxido que produce uniones no covalentes a células | Necrosis de hepatocitos centro-lobulillares                                 | Pericentral con puentes centro-centrales | (Li <i>et al.</i> , 2002; Chilakapati <i>et al.</i> , 2007)                                                                                |
| Dimetilnitrosamina: 10mg/kg i.p. 3 días consecutivos por semana durante 2-4 semanas; 50mg/kg i.p. durante 10 meses | Rata          | Producción de formaldehído reactivo y metilación de componentes celulares                    | Necrosis centrolobulillar hemorrágica, destrucción del endotelio sinusoidal | Pericentral con puentes centro-centrales | (Guo <i>et al.</i> , 2006; Pegg and Perry, 1981; Hirata <i>et al.</i> , 1989)                                                              |
| Suero de cerdo: 0,5 ml dos veces por semana durante 4-16 semanas                                                   | Rata          | Adelgazamiento de la vena porta, efecto hemodinámico                                         | No hay necrosis de hepatocitos                                              | Pericentral con puentes centro-centrales | (Baba <i>et al.</i> , 2004; Shiga <i>et al.</i> , 1997)                                                                                    |
| Ligadura del conducto coledoco: 2-3 semanas luego de la intervención quirúrgica                                    | Rata, ratón   | Acumulación de ácido biliar que estimula apoptosis y disrupción de la membrana celular       | Necrosis periportal                                                         | Periportal y formación de puentes        | (Boker <i>et al.</i> , 1991; Palmeira and Rolo, 2004; Miyoshi <i>et al.</i> , 1999)                                                        |
| Dieta deficiente de colina y metionina durante 12-15 semanas                                                       | Rata, ratón   | Acumulación de lípidos en hepatocitos. Estrés oxidativo, necrosis e inflamación              | Acumulación lipídica en región centrolobulillar                             | Pericentral                              | (Anstee and Goldin, 2006; Hirose <i>et al.</i> , 2007; Sahai <i>et al.</i> , 2004; McCuskey <i>et al.</i> , 2004; Koteish and Diehl, 2001) |

## II. 6 Tratamientos y perspectivas

No existe en la actualidad un tratamiento efectivo para la cirrosis hepática (Bataller and Brenner, 2005). En ocasiones, la eliminación del agente productor, por ejemplo el consumo de alcohol, puede permitir la regresión del proceso fibrogénico a un estadio menos avanzado. Por otro lado, la inhibición del estímulo pro-inflamatorio y pro-fibrogénico inducido por procesos como la hepatitis crónica asociada al VHB o VHC es capaz de hacer remitir el grado de fibrosis (Bataller and Brenner, 2005). Aunque la fibrosis hepática puede ser reversible, la cirrosis, el estadio más avanzado de la fibrosis, es generalmente irreversible. Para pacientes con cirrosis avanzadas y complicaciones clínicas el trasplante hepático es la única alternativa, sin embargo, este procedimiento es muy costoso y existe una escasez de donantes por lo que no todos los pacientes tienen acceso al mismo.

Por esta razón son muchos los trabajos científicos que centran sus esfuerzos en encontrar alternativas terapéuticas y nuevas dianas que permitan frenar la progresión de la cirrosis o contribuir a su resolución. Entre ellas se han reportado, aunque con poco éxito, el uso de drogas antiinflamatorias, como corticoesteroides en el tratamiento de fibrosis en pacientes con hepatitis aguda (Czaja and Carpenter, 2004); antioxidantes, como vitamina E o fosfatidilcolina que pueden inhibir la activación CEH y proteger a los hepatocitos de la apoptosis, con algún beneficio en pacientes con enfermedad alcohólica y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Tome and Lucey, 2004; Lieber, 1997; Harrison *et al.*, 2003); inhibición de la síntesis o señalización de TGF- $\beta$ 1 (Gressner *et al.*, 2002); factores de crecimiento, como IGF, factor de crecimiento hepatocitario o cardiotropina (Ueki *et al.*, 1999; Bustos *et al.*, 2003); sustancias que inhiban vías de señalización claves en la fibrosis, como por ejemplo inhibidores de fosfodiesterasas, antagonistas de Ras, ligandos de PPAR $\alpha$  o PPAR $\gamma$  (Bataller and Brenner, 2005). Otras estrategias se enfocan en la expresión de MMP específicas para el colágeno fibrilar (MMP1), inhibición de MMP2 y 9, y estudios sobre moléculas involucradas en la polimerización de la fibras de colágeno, como es el caso de ADAMTS2 (Kesteloot *et al.*, 2007). También se han utilizado inhibidores y antagonistas del sistema de renina-angiotensina con resultados prometedores (Yokohama *et al.*, 2004; Bataller *et al.*, 2005). Una estrategia central es, sin dudas, la inhibición específica de la activación y proliferación de las CEH (Bataller and Brenner, 2005). En este sentido, se han reportado distintos estudios que intentan: a) disminuir la activación de las CEH; b) disminuir la proliferación de CEH; c)

disminuir la respuesta proinflamatoria generada por las CEH; d) estimular la apoptosis de CEH activadas (Friedman, 2003).

En la última década se han realizado avances significativos en el empleo de herramientas de terapia génica para el tratamiento de la fibrosis hepática experimental, lo que abre un nuevo abanico de posibilidades de tratamiento. Más adelante se desarrollará este tema en el capítulo destinado a terapia génica.

### **III Complicaciones de la cirrosis hepática: el hepatocarcinoma**

---

#### **III.1 Epidemiología**

El hepatocarcinoma (HC) constituye entre el 85-90% de todos los tumores primarios de hígado (Llovet and Bruix, 2008). Es el sexto tumor más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, lo cual lo convierte en un problema sanitario de jerarquía a nivel mundial (Parkin, 2001). Esta frecuencia elevada se acompaña de una distribución mundial muy heterogénea, con las cifras más altas en África sub-sahariana y en el sudeste de Asia; con una incidencia de 13,3 a 35,2/100.000 habitantes para mujeres y hombres, respectivamente (El-Serag and Rudolph, 2007). En lo que respecta a nuestro país, y si bien no se conocen estadísticas precisas, se estima que la incidencia es baja y cercana a 5/100.000 habitantes. La explicación de esta heterogeneidad se encuentra, al menos en parte, en que también existe una distribución variable de los factores de riesgo asociados al HC. Por ejemplo, la infección crónica por el VHB es la responsable de la aparición del HC en las zonas de mayor incidencia (Fassio *et al.*, 2009; Fassio *et al.*, 2010). Lo más preocupante es que la incidencia y la mortalidad del HC se encuentran en aumento, principalmente en occidente debido a la diseminación de la infección crónica por VHC (El-Serag and Rudolph, 2007). Por el contrario, se han observado cambios positivos en la incidencia en algunos países como Taiwán, debido a campañas agresivas de vacunación para el VHB (El-Serag and Rudolph, 2007).

#### **III.2 Etiología y patogenia**

En cuanto a los factores de riesgo para la aparición del HC destacan, como se ha mencionado previamente, el VHB, el VHB asociado a aflatoxina B, el VHC y el consumo crónico de

alcohol, entre otros; estos últimos predominan en países industrializados (Llovet, 2007). Independiente del agente etiológico el riesgo se eleva en pacientes con cirrosis establecida, por lo que esta condición es considerada una enfermedad pre-neoplásica (Llovet et al., 2003). En este sentido, se observa que la incidencia anual del HC en paciente con cirrosis por VHB es del 2-6% y para el VHC del 3-5% (Bruix et al., 2001). En los últimos años se ha demostrado que otros factores como la obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico, la dislipemia y el tabaquismo se asocian a un incremento del riesgo de HC y, para alguno de ellos, también a la mortalidad asociada al mismo (El-Serag and Rudolph, 2007).

La transformación neoplásica de los hepatocitos, independientemente del factor etiológico, se produce como consecuencia de un incremento en el recambio celular hepático inducido por la lesión crónica y por la regeneración en el contexto de una inflamación, la respuesta inmunitaria, y el daño oxidativo del ADN. Esto podría resultar en alteraciones genéticas, como la activación de oncogenes virales, la inactivación de genes supresores de tumores, la inestabilidad genómica debida a déficits en la reparación del ADN, la sobreexpresión de factores de crecimiento y angiogénicos, y la activación de la telomerasa (El-Serag *et al.*, 2008).

Tanto las hepatitis virales crónicas como también el consumo crónico de alcohol, la hemocromatosis y otros factores etiológicos, actuarían mediante la lesión hepática crónica, intentos repetidos de reparación, y finalmente la generación de cirrosis. En sustento de lo dicho, el principal factor de riesgo es la cirrosis hepática, ya que el 70-90% de los HC se desarrollan en el hígado con cirrosis (Blum, 2005). Otras causas de predisposición a la enfermedad son: estatohepatitis no alcohólica (NASH), obesidad, diabetes, hepatitis crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, diferentes agentes químicos (ej. tabaquismo) (El-Serag *et al.*, 2008).

### **III.3 Diagnóstico y tratamiento**

El único sistema que permite asociar estadificación con tratamiento y pronóstico del HC brindando pautas de utilidad en el proceso de decisión terapéutica es el sistema Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) generado por el grupo de Barcelona y validado e incorporado por las asociaciones americana y europea para el estudio de las enfermedades hepáticas, AASLD y EASL, respectivamente (Bruix *et al.*, 2001; Bruix and Sherman, 2005). En los pacientes cirróticos en los que se hace el diagnóstico de HC la estrategia de tratamiento, y por ende el pronóstico, dependerá no sólo del estadio de la enfermedad tumoral sino también de la función hepática (Child-Pugh) y

del estado general del paciente (*performance status*). Es importante destacar que la supervivencia para los pacientes que se encuentran en los estadios 0 (estadio muy precoz) y A (estadio precoz), a los que se les puede realizar un tratamiento con intención curativa (transplante, resección quirúrgica o técnicas de ablación) se encuentra entre el 40-70% a los 5 años. Para los pacientes que se encuentran en los estadios B (estadio intermedio) y C (estadio avanzado) para los que está indicado la quimio-embolización transarterial (TACE) y el tratamiento médico con sorafenib, respectivamente, la supervivencia media se encuentra entre los 11 y 20 meses para el estadio B y en 9 meses para el estadio C. Para los pacientes en estadio D (estadio terminal) solo se contempla tratamiento sintomático, siendo la supervivencia media de unos 3 meses aproximadamente (Llovet *et al.*, 1999).

### **III.4 Nuevas estrategias de tratamiento para el hepatocarcinoma avanzado**

Existe un desarrollo creciente de nuevas terapias moleculares dirigidas para el HC a nivel clínico. Entre ellas se encuentran estrategias que incluyen: inhibidores de angiogénesis, inhibidores de proliferación y inhibidores de la actividad telomerasa necesaria para la proliferación de las células del HC (Djojotubroto *et al.*, 2005). Se han sumando terapias con anticuerpos monoclonales o inhibidores de quinasas que han demostrado cierta efectividad. En el 2007, se comenzó a utilizar en la práctica clínica el sorafenib (Nexavar®), un inhibidor de múltiples quinasas, que demostró tener capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales, el desarrollo de neovasos y de incrementar la apoptosis en un número muy amplio de modelos tumorales experimentales (Chang *et al.*, 2007). Chang y colaboradores demostraron que su mecanismo de acción se basa en la inhibición de distintas vías de señalización tumoral como la vía Raf-1 y B-Raf, así como también a los receptores con actividad tirosina-quinasa VEGF1, 2 y 3 y al receptor del PDGF-b. Esta molécula ha demostrado prolongar significativamente la supervivencia de los pacientes con HC avanzado en estadio C (Llovet and Bruix, 2008).

También están siendo utilizados otros tratamientos moleculares los cuales pueden agruparse en 4 grupos según sus dianas: i) anti-EGFR: aquí se encuentran erlotinib, gefitinib, lapatinib, cetuximab, ii) anti-angiogénicos: bevacizumab, el mismo sorafenib, sunitinib, bivanib, vatalanib y cediranib; iii) inhibidores de mTOR: sirolimus, everolimus, temsirolimus; iv) otros: entre los que se encuentran inhibidores de IGF-1, de Wnt, etc. Entre estos últimos, se han comunicado

resultados prometedores con erlotinib, un inhibidor del receptor para EGF (“endotelial growth factor”) (Philip *et al.*, 2005).

### **III.5 Modelos experimentales de hepatocarcinoma**

El desarrollo de modelos experimentales que reflejen de manera ajustada lo que ocurre a nivel clínico con el desarrollo del HC es un gran desafío para los investigadores. Como se comentó anteriormente, el 90% de los HC surgen en hígados cirróticos, lo cual trae aparejadas muchas dificultades a la hora de seleccionar un modelo experimental. Existen pocos modelos de HC murino espontáneos y la mayoría depende de la administración de agentes hepatotóxicos que recreen un entorno de injuria hepática crónica (Newell *et al.*, 2008).

En 1969 se demostró por primera vez que células tumorales crecidas *in vitro* tenían la capacidad de formar tumores al ser inyectadas de forma subcutánea en ratones inmunocomprometidos (Rygaard and Povlsen, 1969). Se establecieron así los modelos de xenoinjerto para el estudio de la progresión tumoral. En esta tesis doctoral trabajamos con dos líneas de HC humanas, las células HepG2 y HuH7 (ver la sección de Materiales y métodos, *III. 1 Líneas celulares*), con capacidad de formación de tumores *in vivo*. Estos modelos experimentales cuentan con la ventaja de inducir tumores de forma fácil y rápida y su localización subcutánea permite la medición directa del volumen tumoral. Sin embargo, el modelo de xenoinjerto tiene importantes limitaciones que deben tenerse en cuenta y serán discutidas a continuación.

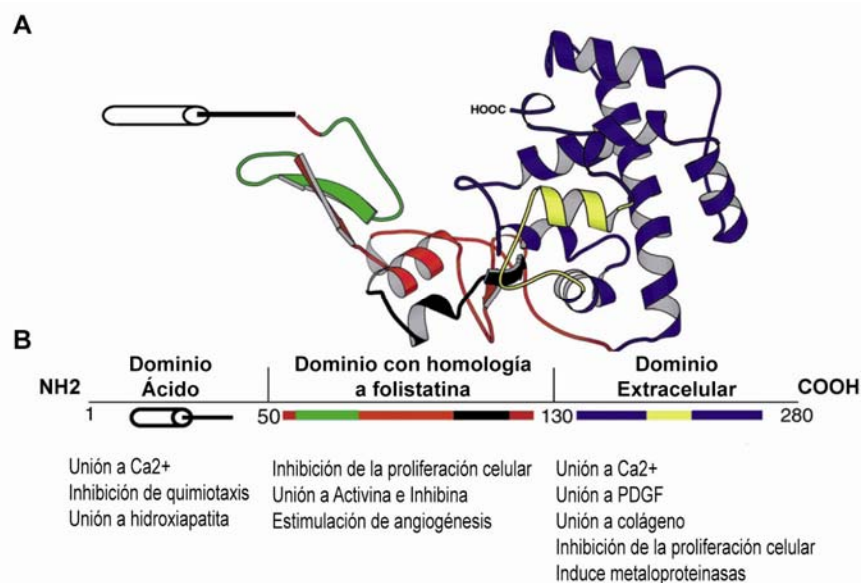
Actualmente se postula al cáncer como una enfermedad ocasionada por un desbalance patológico entre las células tumorales en sí mismas y los tejidos (Cavallo *et al.*, 2011). El desarrollo del cáncer depende tanto de la transformación a células malignas (con mutaciones oncogénicas) como también del microambiente que las rodea, formado por células normales, células estromales, células vasculares y del sistema inmunitario (especialmente macrófagos asociados al tumor) (Frese and Tuveson, 2007). Estas características tan relevantes están muy modificadas en los modelos de xenoinjerto, especialmente los componentes del sistema inmunitario, por lo que el tumor se desarrolla en un ambiente muy diferente al entorno hepático.

## IV SPARC

### IV.1 Estructura

SPARC (**S**ecreted **P**rotein, **A**cidic and **R**ich in **C**ysteine), también denominada BM40 o osteonectina, es una glicoproteína de MEC con funciones no estructurales sino de modulación de la función celular (Sage and Bornstein, 1991). Es codificada por un gen de copia única localizado en el cromosoma 11 murino y en el brazo largo del cromosoma 5 en humanos (Mason *et al.*, 1986a; Schwarzbauer and Spencer, 1993). Posee una gran homología entre especies lo cual hace suponer que su función biológica es importante para las diferentes especies.

Su promotor carece de secuencias TATA y CAAT tradicionales (Mason *et al.*, 1986b; McVey *et al.*, 1988). En humanos existen dos transcritos: un ARN mensajero con un tamaño de 2.2KB y uno menos abundante de 3kb. SPARC consiste en 10 exones separados por 9 intrones, con un tamaño aproximado de 37 kb. No tiene procesamiento alternativo del ARN mensajero, por lo cual estas diferencias se explicarían por la existencia de poliadenilación diferencial de los mensajeros. El gen murino presenta un 92% de homología con el gen humano.



**Figura 9: Estructura y función de SPARC.** A) Esquema de la estructura cristalográfica de SPARC humana donde se distinguen sus tres dominios: extremo amino terminal ácido, dominio tipo folistatina y el dominio carboxiterminal de unión a calcio. B) Propiedades funcionales de cada uno de los dominios de SPARC. El dominio folistatina posee dos péptidos relevantes, el péptido 2.1 (en verde) y el péptido angiogénico (K)GHK (en negro). El dominio carboxiterminal el péptido 4.2 (en amarillo). Adaptado de Brekken et al (Brekken and Sage, 2000).

En vertebrados, la proteína codificada posee entre 283 a 304 aminoácidos. Aunque su peso molecular estimado es de 32 KDa, y debido a modificaciones post-traduccionales, su forma secretada migra como una proteína de entre 40-44KDa en SDS-PAGE. Diferencias en su glicosilación pueden explicar la heterogeneidad funcional y estructural observadas (Kelm and Mann, 1991).

Estudios de su estructura secundaria determinaron que posee tres dominios estructurales bien diferenciados (**Figura 9**):

**Dominio ácido (aa 3-51):** este dominio se encuentra en el extremo amino terminal y es rico en aminoácidos Asp y Glu, aunque su estructura exacta no ha sido caracterizada aún. Presenta epítopes inmunodominantes (Stenner *et al.*, 1984) y se une a hidroxapatita, por lo que SPARC ha sido implicada en la mineralización de hueso y cartílago (Romberg *et al.*, 1985).

**Dominio similar a Folistatina (aa 52-132):** este dominio presenta homología con los dominios folistatin (*FS-like*). Los estudios de cristalografía de rayos X demostraron que esta región consiste en estructuras alargadas formada por un horquilla  $\beta$  N-terminal y un pequeño núcleo de estructura mixta  $\alpha/\beta$ . Tanto los estudios de secuenciación como la estructura cristalina muestran que el núcleo del dominio se asemeja a un inhibidor de resina-proteasa y que el dominio tipo horquilla  $\beta$  se parece al del EGF. A su vez, este dominio presenta un péptido 2.1 y un péptido (K)GHK con conocidos efectos proliferativos y antiangiogénicos (Funk and Sage, 1993; Lane and Sage, 1994). Los dominios folistatina se caracterizan por inhibir citoquinas semejantes a TGF- $\beta$ 1, como *activin* o *inhibin*.

**Dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (aa 133-285):** En el extremo carboxi terminal se observa un dominio de unión a calcio extracelular (EC). Estudios de cristalografía de rayos X muestran una estructura globular con dos motivos manos EF con elevada afinidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Hohenester *et al.*, 1996). Este dominio posee el péptido 4.2 que se ha demostrado que inhibe la proliferación de células endoteliales (Kupprion *et al.*, 1998; Motamed and Sage, 1998). Este dominio está involucrado en la interacción célula-célula y es capaz de unir colágeno. De hecho, los colágenos fibrilares tipo I, III y V, y el colágeno de lámina basal tipo IV, se unen a este dominio en forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto el dominio FS-like como EC se encuentran conservados en otras proteínas de la familia de SPARC, como SC1/hevin, QR1 (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*), Testican, mientras que el extremo ácido es el más divergente (Brekken and Sage, 2000).

## IV.2 Expresión y funciones generales

En 1981, Termine y colaboradores demostraron que SPARC se expresa en tejido óseo como un componente de tipo no colágeno (Termine *et al.*, 1981). Más tarde, Sage y colaboradores la describieron como una proteína secretada por células endoteliales *in vitro* (Sage *et al.*, 1981; Sage *et al.*, 1984); Otsuka y colaboradores reportaron que también es producida por fibroblastos en cultivo (Otsuka *et al.*, 1984) y en la membrana basal de hueso (Mann *et al.*, 1987).

SPARC se expresa durante el desarrollo embrionario, en ratones puede ser detectada desde el día 9 en el primordio del corazón, más tarde aparece en cartílago, hueso, epitelio del tracto digestivo, vasos sanguíneos y piel. En el humano, se han observado altos niveles de expresión en osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos adyacentes a condrocitos (Mundlos *et al.*, 1992). En adultos, la expresión se limita a tejidos que sufren cambios en su entorno y que requieren modificaciones en las interacciones célula-matriz y célula-célula, como por ejemplo tejidos en regeneración y remodelación (Bornstein, 2000).

Aunque SPARC es principalmente una proteína secretada, también se ha observado expresión intracelular con una localización perinuclear que rodea al aparato de Golgi y 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 (Gooden *et al.*, 1999).

Las funciones de SPARC son variadas y se desarrollarán a lo largo de los siguientes apartados. SPARC modula la fisiología tisular actuando a nivel de las interacciones célula-célula, en la migración y proliferación celular, con efectos antiadhesivos, modulando la interacción entre la célula y su entorno, y con efectos inhibitorios del ciclo celular. A su vez, posee la capacidad de influir sobre la actividad de citoquinas y factores de crecimiento. De manera importante, SPARC participa en los procesos de cicatrización, angiogénesis, tumorigénesis e inflamación (Brekken and Sage, 2001).

## IV.3 SPARC y fibrosis

Cada vez son más importantes las evidencias que indican que SPARC desempeña un papel central en los mecanismos de fibrogénesis. Se la encuentra sobreexpresada en múltiples enfermedades que tienen un elevado componente fibrogénico como la fibrosis pulmonar

intersticial (Strandjord *et al.*, 1999), fibrosis renal intersticial (Socha *et al.*, 2007), fibrosis cardíaca (Bradshaw *et al.*, 2009) y arterosclerosis. Es para destacar la observación de que la inhibición de SPARC atenúa los efectos pro-fibrogénicos de TGF- $\beta$ 1 en células mesangiales renales y en fibroblastos dérmicos en cultivo. Más aun, en estudios *in vivo* se observó que la ausencia de SPARC disminuye el desarrollo de fibrosis pulmonar (Strandjord *et al.*, 1999).

Muy pocos trabajos han explorado el papel de SPARC en la fibrosis hepática. Los primeros trabajos realizados en este sentido observaron la expresión de SPARC en miofibroblastos hepáticos activados en cultivos y por técnicas de hibridación *in situ* se observó marca positiva en tractos fibrosos y en los sinusoides hepáticos (Blazejewski *et al.*, 1997a). Posteriormente, estos hallazgos serían confirmados por técnicas de *Northen blot* en muestras de pacientes con fibrosis hepática inducida por alcohol y en pacientes con cirrosis biliar primaria; así como también en ratas que recibieron el tóxico CCl<sub>4</sub> (Frizell *et al.*, 1995a). Los mismos autores demostraron que SPARC se expresa en CEH aisladas de rata y no observaron expresión de SPARC en células de Kupffer ni en hepatocitos. Asimismo, otros trabajos describieron la presencia de SPARC en muestras de pacientes con fibrosis hepática ocasionada por atresia de vías biliares (Lamireau *et al.*, 1999). A su vez, en un estudio de proteómica de cultivos primarios de CEH activadas *in vitro* e *in vivo* se observó aumento de la expresión de SPARC en células activadas (Kristensen *et al.*, 2000). Finalmente, Nakatani y colaboradores describieron la presencia de SPARC en CEH humanas activadas en tejidos de pacientes con hepatitis crónica (Nakatani *et al.*, 2002b). Todos los trabajos que demostraron la presencia de SPARC en procesos de fibrosis hepática han sido puramente observacionales y no han explorado mecanismos que permitan relacionar un papel patogénico de SPARC en el proceso fibrogénico hepático.

#### **IV.3.a SPARC y su relación con la organización de la MEC y la síntesis de colágeno**

La síntesis desproporcionada de colágeno fibrilar y de otras moléculas de la MEC provoca la formación de una cicatriz fibrosa característica del proceso fibrogénico hepático. SPARC es capaz de unirse a diferentes proteínas de la MEC, y de entre estas interacciones la capacidad de unirse a colágeno ha sido ampliamente estudiada. Por la importancia del colágeno como componente fundamental de la fibrosis, la interacción entre SPARC y colágeno será desarrollada en mayor detalle a continuación.

SPARC interacciona con diferentes tipo de colágeno como los de tipo I, II, III, IV y V, con una gran afinidad (Sasaki *et al.*, 1998). La unión a colágeno involucra el dominio carboxi terminal de SPARC y es  $\text{Ca}^{++}$  dependiente. Se ha comunicado que clivajes de SPARC por MMP o su estado de glicosilación pueden aumentar aún más la afinidad de SPARC por colágeno (Sasaki *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 2004). A su vez, recientemente se ha determinado la región de las fibras de colágeno responsable de la interacción con SPARC. Sweeney y colaboradores han propuesto un “dominio de interacción a la matriz” y un “dominio de interacción con la célula” en la fibrilla de colágeno, siendo este último el sitio de interacción con SPARC, entre otras proteínas de la MEC (Sweeney *et al.*, 2008).

SPARC está involucrada en la maduración y en el ensamblado del colágeno a la MEC. De hecho, ratones SPARC *null* presentan diferencias significativas en la morfología de las fibras de colágeno y cambios en la estructura y composición de la MEC (Bradshaw and Sage, 2001). Estos investigadores demostraron que las fibrillas de colágeno de la dermis de los ratones *null* para SPARC eran más pequeñas en comparación con la dermis normal y observaron disminución en el colágeno intersticial y en depósitos grasos (Bradshaw *et al.*, 2003; Bradshaw *et al.*, 2009) por lo que se postula que la expresión de SPARC sería necesaria para la correcta maduración del colágeno en la MEC. Esta idea fue confirmada por Rentz y colaboradores quienes demostraron que SPARC regula el procesamiento de procolágeno tipo I y la fibrogénesis del colágeno en fibroblastos dérmicos (Rentz *et al.*, 2007). Las evidencias experimentales sugieren que SPARC es necesaria para que las fibras de colágeno puedan unirse entre sí para conformar un entramado fibrilar maduro. En primer lugar el colágeno es sintetizado como pro-colágeno, molécula que sufre un procesamiento en el que se remueven dos propéptidos que se encuentran en el extremo amino terminal (propéptido N) y en el extremo carboxi terminal (propéptido C), y luego varias moléculas de colágeno procesado se unen para formar las fibras de colágeno maduras. Un procesamiento prematuro de los propéptidos puede conducir a alteraciones en el ensamblado de las fibras de colágeno. La ausencia de SPARC está asociada con un aumento en el procesamiento del procolágeno que conlleva una inhibición en la fibrogénesis. SPARC actuaría uniéndose al procolágeno e impidiendo su procesamiento prematuro que causa alteraciones en la formación de fibras. Por lo que la capacidad de SPARC de influir en la fibrogénesis es crucial en las primeras etapas de la formación del colágeno fibrilar (Giudici *et al.*, 2008) y su inclusión en la MEC.

La relación entre SPARC y colágeno no solo es post-traducciona sino que varias publicaciones han demostrado la estrecha relación entre la expresión de SPARC y colágeno tipo I (Francki *et al.*, 1999; Brekken and Sage, 2001; Zhou *et al.*, 2006). Por ejemplo, en cultivo de células mesangiales donde se inhibió la expresión de SPARC, se demostró una expresión disminuida de colágeno tipo I a nivel proteico y de ARN mensajero (Francki *et al.*, 1999).

Por otro lado, la unión de SPARC a colágeno no solo influenciaría la formación de fibras de colágeno sino que podría modificar la interacción del colágeno con receptores de superficie celulares (Rentz *et al.*, 2007). Interfiriendo, de esta forma, en la interacción entre las células y la MEC. No está claro si SPARC actúa exclusivamente de forma extracelular modulando la formación de fibras y la interacción entre receptores celulares y colágeno o actúa también de forma intracelular como una chaperona en el tráfico y en las modificaciones post-transcripcionales que ocurren en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (Martinek *et al.*, 2007).

SPARC no solo interactúa con colágeno sino que también interactúa con diferentes proteínas de la MEC (como trombospondina 1, vitonectina, entactina/nidogen), por lo que tiene el potencial de contribuir a la organización de la matriz basal y del tejido conectivo. SPARC se sobreexpresa en la MEC de una gran variedad de tejidos. De hecho, los ratones SPARC *null* presentan diferentes anomalías que reflejan alteraciones en la estructura y composición de la matriz basal (Bradshaw and Sage, 2001), como por ejemplo osteopenia (Delany *et al.*, 2003), cataratas (Gilmour *et al.*, 1998), alteraciones en la dermis (Bradshaw *et al.*, 2003) y alteraciones en la cicatrización (Bradshaw *et al.*, 2002). Otro ejemplo del papel de SPARC en el ensamblado de la MEC es el aumento de la expresión de SPARC durante el desarrollo embrionario cuando la MEC se encuentra en formación (Brekken and Sage, 2000).

#### **IV.3.b SPARC y TGF- $\beta$ 1**

TGF- $\beta$ 1 es una citoquina central en el desarrollo de la fibrosis en general y en la hepática en particular (Bataller and Brenner, 2005). Es una citoquina reguladora de la activación de las CEH así como también tiene efectos mitogénicos (Friedman, 2003). SPARC y TGF- $\beta$ 1 han sido relacionadas con la rápida remodelación de tejidos conectivos durante los procesos de cicatrización de heridas (Sporn *et al.*, 1983; Wasi *et al.*, 1984). Es extensa la evidencia científica que demuestra la existencia de una relación entre estas dos proteínas, donde la expresión de TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión de SPARC y viceversa (Wrana *et al.*, 1991; Ford *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1994; Shiba *et al.*, 2001).

Estudios similares de Wrana y colaboradores demostraron en diferentes tipos celulares de hueso que TGF- $\beta$ 1 induce la síntesis de proteínas de MEC tales como colágeno, fibronectina y SPARC (Wrana *et al.*, 1988). Más tarde, los mismos investigadores demostraron que TGF- $\beta$ 1 regula la expresión de SPARC en fibroblastos humanos cultivados *in vitro* (Wrana *et al.*, 1991). Más aun, TGF- $\beta$ 1 indujo la expresión de SPARC durante la diferenciación de queratinocitos humanos (Ford *et al.*, 1993). Coincidentemente, Reed y colaboradores demostraron la expresión de colágeno tipo I y SPARC de forma dependiente de TGF- $\beta$ 1 en cultivos primarios de fibroblastos humanos (Reed *et al.*, 1994). Resultados similares fueron obtenidos en condrocitos (Chandrasekhar *et al.*, 1994) y células de la pulpa dentaria humana (Shiba *et al.*, 1998).

TGF- $\beta$ 1 no solo es capaz de regular la expresión de SPARC sino que esta relación es recíproca, es decir que SPARC induce a su vez la expresión de TGF- $\beta$ 1. Diversos trabajos han explorado esta relación, entre ellos, se destacan los estudios realizados sobre cultivos de células mesangiales y en fibroblastos dérmicos en los que se observó que la inhibición de la expresión de SPARC induce una disminución de la expresión de colágeno tipo I y TGF- $\beta$ 1, tanto a nivel de ARNm como de la proteína (Francki *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006). Bassuk y colaboradores demostraron, en un modelo de glomerulonefritis en rata, que el agregado exógeno de SPARC conducía a un aumento de la expresión de TGF- $\beta$ 1 y colágeno tipo I en células mesangiales (Bassuk *et al.*, 2000). Posteriormente, otros autores demostraron disminución de mensajeros para TGF- $\beta$ 1 y de proteína en las células mesangiales de ratones SPARC *null* en cultivo y en células epiteliales de pulmón. La adición de SPARC recombinante aumenta la producción de TGF- $\beta$ 1 tanto en cultivos provenientes de animales sanos o como SPARC *null* (Schiemann *et al.*, 2003; Francki *et al.*, 2004).

No solo existe una retroalimentación positiva entre la producción de SPARC y TGF- $\beta$ 1, sino que SPARC podría regular la vía de señalización inducida por TGF- $\beta$ 1. Aunque se desconoce si SPARC interactúa directamente con TGF- $\beta$ 1 o lo hace a través de la interacción con el receptor de TGF- $\beta$ 1 (Francki *et al.*, 2004), es una proteína importante para la vía de TGF- $\beta$ 1. Se demostró que SPARC inhibe la proliferación de células epiteliales a través de la estimulación de la señalización de la vía TGF- $\beta$ 1-Smad 2/3 (Schiemann *et al.*, 2003). Del mismo modo, se reportó que SPARC regula la fosforilación de Smad 2 mediada por TGF- $\beta$ 1 en células mesangiales indicando que SPARC no sólo regula la expresión de TGF- $\beta$ 1 sino también la cascada de señalización dependiente de esta proteína (Francki *et al.*, 2004).

### IV.3.c SPARC y los procesos de adhesión, migración y proliferación celular

Las CEH activadas poseen la habilidad de migrar y acumularse en los sitios dañados por la injuria donde van a producir matriz fibrilar e inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiotácticas (Friedman, 2003). La presencia de éstas aumenta el reclutamiento de CEH, generando un mecanismo de retroalimentación positiva. SPARC puede tener implicancia en varios aspectos del comportamiento celular incluyendo adhesión, migración y proliferación (Brekken and Sage, 2000). Los primeros hallazgos relacionados con la funcionalidad de SPARC demostraron que esta proteína podía ser un inhibidor del ciclo celular con capacidad para frenar a los fibroblastos en fase G1 (Sage *et al.*, 1995; Funk and Sage, 1991). También se demostró que SPARC es capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales, de músculo liso, mesangiales y fibroblastos estimulados con factores de crecimiento (Hasselaar and Sage, 1992; Raines *et al.*, 1992; Bradshaw *et al.*, 1999). SPARC puede atenuar la capacidad mitogénica tanto de PDGF como de VEGF, al menos en parte por la alteración de la interacción entre estos factores y sus receptores (Raines *et al.*, 1992; Kupprion *et al.*, 1998). Además, puede inhibir la capacidad de inducir proliferación sobre células de músculo liso estimuladas por FGF, aunque el mecanismo subyacente no se conoce con precisión (Yan and Sage, 1999; Brekken and Sage, 2000).

La adhesión celular es un proceso reversible y esencial para el crecimiento celular; consiste en tres etapas: pegado, estiramiento y formación de contactos focales y fibras de stress. Aunque el mecanismo no se conoce con exactitud, SPARC provoca cambios a nivel celular favoreciendo la aparición de un fenotipo redondeado por inhibición del proceso de adhesión (Murphy-Ullrich *et al.*, 1995); esto se debe, al menos en parte, a la disolución de los complejos focales y a la reorganización de las fibras de estrés. Mediante estudios *in vitro* se ha podido establecer la región peptídica de SPARC responsable de los efectos antiproliferativos (**Figura 9**). Young y colaboradores han demostrado que el efecto 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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; Barker *et al.*, 2005). Mediante estudios de inhibición de vías de señalización, se ha comprobado que la inhibición general de proteínas tirosina-quinasa protegió a células endoteliales del efecto antiadhesivo de SPARC, pero el efecto antiproliferativo no pudo ser inhibido (Motamed and Sage, 1998). Este mismo grupo de

investigadores demostró que el efecto antiadhesivo de SPARC sobre células endoteliales es mediado a través de una vía dependiente de fosforilación de tirosinas mientras que la función antiproliferativa es dependiente en forma parcial de una vía acoplada a receptor de proteína G.

Mientras que el papel de SPARC en la adhesión celular y en la proliferación ha sido ampliamente estudiado, no se conoce mucho acerca de SPARC y el proceso de migración celular. Durante la reparación tisular, que ocurre en el proceso de fibrosis, la migración celular es importante para reclutar las células a las zonas con daño (Friedman, 2003). La migración celular depende de rearrreglos en el citoesqueleto que permitan a las células desplazarse (Olson and Nordheim, 2010). Existen algunas pocas evidencias de que este proceso también es modulado por SPARC vía interacciones con citoquinas y factores de crecimiento (Phan *et al.*, 2007). A su vez, SPARC es capaz de promover migración celular vía interacciones con integrinas ( $\alpha\text{v}\beta 3$  and  $\alpha\text{v}\beta 5$ ) en células tumorales de próstata (De *et al.*, 2003). Wu y colaboradores demostraron un aumento en la expresión de SPARC en zonas de necrosis que aparecen como consecuencia de un infarto de miocardio donde se puede observar un incremento en la migración de fibroblastos a estas zonas por un mecanismo dependiente de integrinas. Los investigadores proponen que SPARC puede ayudar a las células a perder conexiones con el tejido conectivo y, así, permitir que migren hacia los sitios de injuria (Wu *et al.*, 2006). Por otro lado, se observó que la reparación tisular en ratones SPARC *null* se encuentra comprometida, en parte, debido a la inhibición de la migración de fibroblastos a las zonas lesionadas (Basu *et al.*, 2001). Los mismos autores realizaron estudios *in vitro* de reparación de heridas donde demuestran que fibroblastos dérmicos obtenidos de ratones SPARC *null* y tratados con mitomicina C (para impedir su proliferación) son incapaces de migrar. Estos resultados resaltan el papel de SPARC en la migración hacia sitios en proceso de cicatrización.

Sin embargo, el papel de SPARC en la migración parece ser célula específica. Se ha comunicado que SPARC no influye en la migración de queratinocitos (Wu *et al.*, 2006) y, al contrario de lo observado anteriormente, la inhibición de SPARC estimula la migración de leucocitos (Sangaletti *et al.*, 2005).

No solo parece ser relevante la producción de SPARC por las propias células que van a migrar o que están migrando, sino que la presencia de SPARC exógena puede influir en la migración. Se demostró que en combinación con fibronectina el agregado de SPARC en concentraciones bajas puede promover la migración, mientras que la presencia de altas

concentraciones de SPARC impiden la migración (Wu *et al.*, 2006). Del mismo modo, se reportó en líneas de glioma efectos duales de SPARC en la migración dependiendo de la concentración en la que es producida por las células (Rempel *et al.*, 2001).

#### **IV.3.d SPARC y Apoptosis**

La relación entre SPARC y apoptosis podría desempeñar un papel importante en la fibrosis, especialmente si tenemos en cuenta que existe interés en aquellas estrategias destinadas a inducir apoptosis en las CEH activadas como mecanismo de resolución de la fibrosis (ver II.3 *Las células estrelladas hepáticas: células claves en el desarrollo de la fibrosis*). En este sentido, recientemente, Tang y colaboradores demostraron que la expresión de SPARC en fibroblastos pulmonares en la fibrosis pulmonar idiopática confiere resistencia a la apoptosis inducida por plasminógeno (Tang and Tai, 2007). SPARC vía interacción con integrinas activa la vía de PI3K, consecuentemente aumentan los niveles de  $\beta$ -catenina (Shi *et al.*, 2007; Nie and Sage, 2009). Este factor de transcripción activa la expresión de genes como PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) y el aumento de PAI-1 protege de la apoptosis (Tang and Tai, 2007). Se ha reportado sobreexpresión de PAI-1 en fibrosis hepática inducida por alcohol y en la injuria hepática en el contexto de la colestasis (Arteel, 2008). De manera interesante, la relación entre SPARC y apoptosis es a la vez compleja y diferente en el contexto del cáncer, como se desarrollará a continuación (Tai and Tang, 2008).

#### **IV.4 SPARC y cáncer**

Hasta el momento hemos descripto el papel de SPARC en distintos órganos y sistemas, y en particular su participación en el proceso fibrogénico. Sin embargo, las funciones de SPARC en el contexto del cáncer son un tanto más controvertidas; más bien puede tener efectos contrapuestos, en ocasiones facilitando el crecimiento tumoral y en otras inhibiendo el crecimiento y agresividad de las células tumorales. Estos efectos contradictorios son sumamente complejos y dependen, al menos en parte, del tipo celular estudiado y del microambiente tumoral. A continuación introduciremos las evidencias de la actividad de SPARC en cáncer.

SPARC se encuentra sobreexpresada en diversos tipos tumorales, especialmente en componentes de la MEC, como células endoteliales y fibroblastos (Sage *et al.*, 1981; Otsuka *et al.*, 1984). Las evidencias indican que SPARC es una proteína multifacética involucrada en numerosos

procesos relacionados con la progresión tumoral. De hecho, se ha encontrado correlación entre la expresión de SPARC y la progresión tumoral en glioma, astrocitoma, melanoma, carcinoma renal y adenocarcinoma pancreático (**Tabla 2**). Sin embargo, varios trabajos sugieren que SPARC es antitumoral en otras situaciones como leucemia mieloide, neuroblastoma, cáncer de ovario y de colon (**Tabla 3**) (Podhajcer *et al.*, 2008b). Estos datos, aparentemente contradictorios, resaltan la compleja biología de SPARC en cáncer, lo cual requiere un estudio exhaustivo de sus funciones en cada tipo de tumor ya que no es posible emplear un criterio único en todos los tipos de cáncer.

¿Cómo se puede explicar esta controversia del papel de SPARC en unos casos antitumoral y, en otros, favoreciendo el crecimiento tumoral? La respuesta a esta pregunta no es fácil; además, el crecimiento tumoral no solo depende del linaje tumoral sino también del microambiente donde se desarrolla. La MEC es una compleja red dinámica cuya función va más allá de ser un soporte mecánico, por el contrario interviene directamente en distintas funciones celulares como adhesión, migración, proliferación y diferenciación (Liotta and Kohn, 2001). Como se describió anteriormente, SPARC es una proteína que si bien no es un componente estructural de la MEC forma parte de un grupo de proteínas matricelulares con funciones regulatorias (Bradshaw and Sage, 2001). En este sentido, las evidencias aportadas por la literatura demuestran que SPARC no solo se expresa en las células tumorales sino que se encuentra presente en células endoteliales y fibroblastos presentes en el entorno tumoral, sugiriendo la participación de SPARC en la intercomunicación estroma-tumor (Koukourakis *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2007).

#### **IV.4.a El papel protumorigénico y prometastásico de SPARC**

La capacidad de SPARC de contribuir al fenotipo tumoral se atribuye a distintos procesos entre los que se encuentran: -su capacidad de transducción de señales vía integrinas, -su influencia sobre factores de crecimiento, -su capacidad antiadhesiva que puede promover el desensamblaje de las células malignas de la MEC promoviendo la migración y diseminación de las células tumorales, o -su acción sobre proteasas de MEC permitiendo su degradación e incrementando la capacidad invasiva de las células tumorales. En general, estas rutas moleculares de transducción contribuyen a diferentes eventos que afectan la progresión tumoral como el remodelamiento de la MEC, la angiogénesis, la regulación de la migración y proliferación celular, modulación del sistema inmunitario y metástasis. Es claro que no existe un único mecanismo de acción que explique los diversos efectos de SPARC en la tumorogénesis. Se puede decir que, SPARC tendría un

papel diferencial dependiendo si es expresada por las mismas células tumorales o por las células estromales del microambiente tumoral (Podhajcer *et al.*, 2008b).

SPARC ha demostrado tener propiedades protumorales en una gran variedad de tumores tales como glioma, melanoma, cáncer de mama, próstata, riñón, esófago, pulmón, páncreas, ovario, vejiga, útero, cáncer de cabeza de cuello, leucemia, cáncer gástrico y de colon (Arnold and Brekken, 2009). En la **Tabla 2** se resume la información generada en estudios con muestras provenientes de pacientes, de modelos experimentales murinos y de estudios *in vitro*, que muestran evidencias acerca de la capacidad promotora del crecimiento y diseminación tumoral que puede ejercer SPARC.

Existen numerosas evidencias en modelos *in vivo* que muestran que la expresión de SPARC en glioblastoma, astrocitoma y meningioma es un predictor negativo de supervivencia (Huang *et al.*, 2000; Pen *et al.*, 2007; Rempel *et al.*, 1998; Rich *et al.*, 2003). A su vez, estudios *in vitro* en líneas de glioblastoma demuestran que tanto la expresión endógena como exógena de SPARC aumenta la capacidad de adhesión, supervivencia, migración y invasión de las células tumorales (Golembieski *et al.*, 1999; Kunigal *et al.*, 2006; McClung *et al.*, 2007; Rempel *et al.*, 2001; Rich *et al.*, 2003; Schultz *et al.*, 2002; Seno *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2007). Rich y colaboradores demostraron en un modelo murino de glioblastoma que al sobreexpresar SPARC en un línea no invasiva esta adquiere un fenotipo de tipo invasivo (Rich *et al.*, 2005). De la misma manera, otros estudios demostraron que si se inhibe SPARC en un línea invasiva de glioblastoma estas células pierden la capacidad de diseminación al inyectarse de forma intracerebral en ratones (Seno *et al.*, 2009).

En cáncer de mama los resultados son bastante coincidentes. SPARC se encuentra sobreexpresada en tejido tumoral y se la asocia a tumores más agresivos (Amatschek *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2005; Bellahcene and Castronovo, 1995; Bergamaschi *et al.*, 2008; Helleman *et al.*, 2008; Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004; Lien *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2003; Sarrio *et al.*, 2008; Watkins *et al.*, 2005; Woelfle *et al.*, 2003). Tanto la sobreexpresión endógena como exógena de SPARC se asocia a un aumento del potencial invasivo de las células tumorales (Briggs *et al.*, 2002; Campo McKnight *et al.*, 2006; Gilles *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 1999; Zajchowski *et al.*, 2001). Estudios más recientes enfocados en establecer el papel de SPARC en el proceso de metástasis en cáncer de mama demostraron que SPARC pertenece a un

grupo de genes cuya presencia se asoció con un mayor agresividad tumoral y capacidad de dar metástasis pulmonares (Minn *et al.*, 2005).

En lo que respecta al cáncer de pulmón, también se ha reportado un aumento en la expresión de SPARC en células tumorales pulmonares (Amatschek *et al.*, 2004; Siddiq *et al.*, 2004) así como también en el estroma tumoral (Koukourakis *et al.*, 2003), por lo que nuevamente aquí la expresión de SPARC se asocia con mal pronóstico.

En cuanto al cáncer de páncreas diversos estudios reportan la expresión de SPARC tanto en el tumor primario como en las metástasis (Guweidhi *et al.*, 2005; Prenzel *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2001). En este sentido, dos estudios realizados *in vitro* demuestran que la presencia de SPARC exógena incrementa la capacidad invasiva de células tumorales pancreáticas humanas, mientras que la inhibición de la expresión de SPARC la disminuye (Guweidhi *et al.*, 2005; Mantoni *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de SPARC ha sido asociada a los tipos más agresivos de melanoma humano y se ha sugerido que su expresión es un factor predictivo de agresividad en esta enfermedad tumoral (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 no invasivo para la detección temprana del melanoma (Ikuta *et al.*, 2005). Por otro lado, la expresión de SPARC induce un aumento en la movilidad e invasividad de células de melanoma (Robert *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007). Mediante herramientas de terapia génica se ha demostrado en células de melanoma que la inhibición de la expresión de SPARC reduce la adhesión, invasión y capacidad de formar tumores *in vivo* (Alvarez *et al.*, 2005; Ledda *et al.*, 1997b; Prada *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007; Sosa *et al.*, 2007). Por otro lado, células de melanoma sobreexpresando SPARC fueron capaces de generar tumores en ratones *nude* que presentaron aumento de la angiogénesis (Prada *et al.*, 2007), otro potencial mecanismo por el cual SPARC podría promover la progresión tumoral. También se ha relacionado a SPARC con la capacidad de inducir una transición epitelio-mesenquimal (TEM), proceso por el cual las células cambian su patrón de expresión hacia un fenotipo con mayor capacidad invasiva y agresiva (Sosa *et al.*, 2007; Smit *et al.*, 2007; Thiery, 2002). Esta transición se caracteriza por la existencia de una pérdida de las uniones intercelulares (cambio en la expresión de caderina E por la N), disminución de la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratinas), sobreexpresión de moléculas mesenquimales (vimentina) y adquisición de un fenotipo similar al del fibroblasto con un aumento en su capacidad de migración

e invasividad (Thiery, 2002). Recientemente, un estudio de expresión génica por micro arreglos en cáncer de mama observó un aumento de SPARC y de moléculas asociadas a TEM (Lien *et al.*, 2007). TGF- $\beta$ 1 es una molécula que desempeña un papel importante en el proceso de TEM (Thiery and Sleeman, 2006). Cuando TGF- $\beta$ 1 es producida por células epiteliales tumorales es capaz de inducir TEM incrementando su potencial invasivo y metastático. Teniendo en cuenta la interrelación antes descrita entre TGF- $\beta$ 1 y SPARC se piensa que el efecto de SPARC en TEM podría estar mediado por TGF- $\beta$ 1 (Thiery and Sleeman, 2006). Los componentes de la MEC, como colágeno, también pueden inducir TEM vía interacción con integrinas que producen transducción de señales específicas (Thiery and Sleeman, 2006). Considerando la relación entre SPARC y colágeno es posible que SPARC esté involucrada en la inducción de TEM dependiente de colágeno (Brekken *et al.*, 2003).

Todas estas evidencias postulan a SPARC como una proteína con un claro efecto protumoral, sin embargo en otros tipos de tumores SPARC parece ejercer un efecto contrario que será discutido en la próxima sección.

**Tabla 2: Evidencias del papel de SPARC como una proteína protumoral.** Resumen de las evidencias bibliográficas del papel de SPARC como favorecedora del crecimiento y/o desarrollo tumoral en muestras de pacientes, en modelos murinos y líneas celulares. *Correlación positiva:* se refiera a aumento de la expresión de SPARC en tumor, aumento de la expresión de SPARC correlacionado con metástasis o aumento del tamaño tumoral, inhibición de la expresión de SPARC asociado con pronóstico positivo y inhibición de la expresión asociado a aumento de supervivencia. SP, SPARC. Adaptado y modificado de Arnold *et al.*, 2009.

| ESTIRPE TUMORAL      | MUESTRAS HUMANAS                         |                                                                                                     | MODELOS MURINOS Y LINEAS CELULARES |             |
|----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|                      | Expresión                                | Referencias                                                                                         | Descripción                        | Referencias |
| Vejiga               | Aumento en estroma; correlación positiva | (Nimphius <i>et al.</i> , 2007; Yamanaka <i>et al.</i> , 2001)                                      |                                    |             |
| Sangre<br>(Leucemia) | Aumento de la expresión                  | (Hedvat <i>et al.</i> , 2003; Martinez <i>et al.</i> , 2003)                                        |                                    |             |
| Hueso                | Correlación positiva                     | (Dalla-Torre <i>et al.</i> , 2006; Fanburg-Smith <i>et al.</i> , 1999; Schulz <i>et al.</i> , 1998) |                                    |             |

|                 |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cerebro         | Aumento de la expresión en tumores benignos y malignos          | (Huang <i>et al.</i> , 2000; Pen <i>et al.</i> , 2007; Rich <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SP aumenta invasión y supervivencia; SP endógena aumenta adhesión y migración pero reduce proliferación     | (Golembieski <i>et al.</i> , 1999; Kunigal <i>et al.</i> , 2006; McClung <i>et al.</i> , 2007; Rempel <i>et al.</i> , 2001; Rich <i>et al.</i> , 2003; Rich <i>et al.</i> , 2005; Seno <i>et al.</i> , 2009; Shi <i>et al.</i> , 2004) |
| Mama            | Aumento en estroma; correlación positiva                        | (Amatschek <i>et al.</i> , 2004; Barth <i>et al.</i> , 2005; Bellahcene and Castronovo, 1995; Bergamaschi <i>et al.</i> , 2008; Helleman <i>et al.</i> , 2008; Iacobuzio-Donahue <i>et al.</i> , 2002; Jones <i>et al.</i> , 2004; Lien <i>et al.</i> , 2007; Parker <i>et al.</i> , 2004; Porter <i>et al.</i> , 2003; Sarrio <i>et al.</i> , 2008; Watkins <i>et al.</i> , 2005; Woelfle <i>et al.</i> , 2003) | SP exógena aumenta invasión; ratones SP-/- mostraron menor crecimiento tumoral; aumento de SP en metástasis | (Briggs <i>et al.</i> , 2002; Campo McKnight <i>et al.</i> , 2006; Gilles <i>et al.</i> , 1998; Jacob <i>et al.</i> , 1999; Minn <i>et al.</i> , 2005; Sangaletti <i>et al.</i> , 2008; Zajchowski <i>et al.</i> , 2001)               |
| Colon           | Aumento de la expresión en tumor, estroma y focos de metástasis | (Kaiser <i>et al.</i> , 2007; Lussier <i>et al.</i> , 2001; Madoz-Gurpide <i>et al.</i> , 2006; Porte <i>et al.</i> , 1995; Porter <i>et al.</i> , 1995; St Croix <i>et al.</i> , 2000; Wewer <i>et al.</i> , 1988; Wiese <i>et al.</i> , 2007)                                                                                                                                                                  | SP aumenta invasión; ratones SP-/- menor desarrollo tumoral                                                 | (Sansom <i>et al.</i> , 2007; Volmer <i>et al.</i> , 2004)                                                                                                                                                                             |
| Esófago         | Correlación positiva                                            | (Porte <i>et al.</i> , 1998; Yamashita <i>et al.</i> , 2003; Xue <i>et al.</i> , 2006; Luo <i>et al.</i> , 2004; Mitas <i>et al.</i> , 2005; Che <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                        |
| Cabeza y cuello | Correlación positiva                                            | (Chin <i>et al.</i> , 2005; Kato <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                        |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Riñón              | Aumento de la expresión en tumor<br>(Amatschek <i>et al.</i> , 2004; Giese <i>et al.</i> , 2002; Sakai <i>et al.</i> , 2001)                                                                                                      | SP aumenta invasión<br>(Kato <i>et al.</i> , 1998)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Hígado             | Correlación positiva<br>(Goldenberg <i>et al.</i> , 2002; Le Bail <i>et al.</i> , 1999)                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Pulmón             | Aumento en estroma<br>(Amatschek <i>et al.</i> , 2004; Koukourakis <i>et al.</i> , 2003; Siddiq <i>et al.</i> , 2004)                                                                                                             | Aumento de SP durante la transformación y aumento de la capacidad de formar colonias; aumento de SP en cocultivos de NSCLC y fibroblastos<br>(Fromigue <i>et al.</i> , 2003; Siddiq <i>et al.</i> , 2004)                                                                                                                                                                        |
| Ovario             | Aumento en estroma; correlación positiva<br>(Brown <i>et al.</i> , 1999; Paley <i>et al.</i> , 2000; Porter <i>et al.</i> , 1995)                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Páncreas           | Aumento de la expresión; correlación positiva<br>(Bloomston <i>et al.</i> , 2007; Guweidhi <i>et al.</i> , 2005; Mantoni <i>et al.</i> , 2008; Prenzel <i>et al.</i> , 2006; Ryu <i>et al.</i> , 2001; Sato <i>et al.</i> , 2003) | SP exógena aumenta invasión celular<br>(Guweidhi <i>et al.</i> , 2005; Mantoni <i>et al.</i> , 2008)                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Próstata           | Aumento de la expresión en focos de metástasis<br>(Best <i>et al.</i> , 2005; Lapointe <i>et al.</i> , 2004; Thomas <i>et al.</i> , 2000)                                                                                         | SP exógena aumenta invasión y metástasis en hueso<br>(De <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2007; Jacob <i>et al.</i> , 1999)                                                                                                                                                                                                                                            |
| Piel<br>(Melanoma) | Correlación positiva. SPARC sérica utilizada como indicador de diagnóstico<br>(Alonso <i>et al.</i> , 2007; Ikuta <i>et al.</i> , 2005; Ledda <i>et al.</i> , 1997a; Massi <i>et al.</i> , 1999)                                  | Inhibición de SP inhibe desarrollo tumoral; aumento de SP en líneas metastásicas; correlación entre SP y EMT<br>(Alvarez <i>et al.</i> , 2005; Kato <i>et al.</i> , 2000; Kuphal <i>et al.</i> , 2005; Ledda <i>et al.</i> , 1997b; Prada <i>et al.</i> , 2007; Robert <i>et al.</i> , 2006; Rumpler <i>et al.</i> , 2003; Smit <i>et al.</i> , 2007; Sosa <i>et al.</i> , 2007) |
| Estómago           | Aumento en estroma; correlación positiva<br>(Inoue <i>et al.</i> , 2002; Maeng <i>et al.</i> , 2002a; Takeno <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2004; Wewer <i>et al.</i> , 1988)                                         | SP aumenta durante la transformación celular<br>(Maeng <i>et al.</i> , 2002b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|          |                                                                                                                         |  |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Tiroides | Aumento en estroma<br>en tumores pocos<br>diferenciados (Takano <i>et al.</i> , 2002)                                   |  |
| Útero    | Aumento en estroma (Chen <i>et al.</i> , 2003;<br>Rodríguez-Jimenez <i>et al.</i> ,<br>2007; Sova <i>et al.</i> , 2006) |  |

#### IV.4.b El papel antitumoral de SPARC

SPARC también posee propiedades supresoras del crecimiento y diseminación de los tumores y su presencia se ha asociado con un buen pronóstico clínico en algunos tipos de cáncer como leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, cáncer de mama, colon, ovario y páncreas, entre otros (Arnold and Brekken, 2009). En la **Tabla 3** se encuentran listados los tipos tumorales donde SPARC actúa como una proteína anti-tumorigénica. Como se puede observar, en algunos casos SPARC puede comportarse como una proteína pro o anti-tumoral en un mismo tipo tumoral, según el modelo experimental utilizado.

En ovario, se propuso que SPARC podría actuar como un supresor del crecimiento tumoral. Estudios de inmunohistoquímica sobre tejido tumoral demostraron una disminución de la inmunoreactividad para SPARC comparado con tejido sanos (Yiu *et al.*, 2001). En líneas tumorales se observó una reducción de la expresión y secreción de SPARC comparada con células normales, además, la sobreexpresión de SPARC en estas líneas o el agregado exógeno de la misma disminuyó la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* (Mok *et al.*, 1996; Socha *et al.*, 2009; Yiu *et al.*, 2001). De hecho, recientemente, Socha y colaboradores asociaron la reducción de la expresión de SPARC con la reducción de la progresión tumoral (Socha *et al.*, 2009). Asimismo, se demostró que la inoculación peritoneal de células de carcinoma ovárico en ratones SPARC *null* redujo significativamente la supervivencia de los animales en comparación con los animales del grupo controles (Bull Phelps *et al.*, 2009). Son interesantes las observaciones realizadas en relación a la expresión de SPARC y la apoptosis; Yiu y colaboradores mostraron que la presencia de SPARC

induce la apoptosis en líneas tumorales de ovario (Yiu *et al.*, 2001). Consistentemente, SPARC induce el clivaje de caspasa 3 en células de carcinoma ovárico humano (Said and Motamed, 2005).

En neuroblastoma se ha demostrado que SPARC tiene efectos anti-angiogénicos (Chlenski *et al.*, 2002). En este sentido, se demostró que SPARC inhibe la división celular de células endoteliales así como también inhibe el efecto mitogénico inducido por VEGF (Chlenski *et al.*, 2004); estos efectos serían los mecanismos subyacentes a la actividad antiangiogénica observada para SPARC. El cáncer de colon es otro ejemplo en el cuál SPARC demuestra tener un efecto antitumoral; en este caso se observó la existencia de hipermetilación del promotor de SPARC (impidiendo la expresión de SPARC) asociada a mal pronóstico de la enfermedad tumoral (Cheetham *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007). Un análisis genómico sobre líneas celulares de cáncer de colon resistentes a agentes quimioterapéuticos mostró que los niveles de SPARC se encuentran fuertemente disminuidos (Tai *et al.*, 2005). Por otro lado, se vinculó a los cambios de la expresión de SPARC con una resistencia disminuida a la apoptosis, mediante una interacción directa de SPARC con pro-caspasa 8 (Gooden *et al.*, 1999; Taghizadeh *et al.*, 2007). Sin embargo, no todas las evidencias en cáncer de colon coinciden en otorgarle una función antitumoral para SPARC. En este sentido, Porter y colaboradores demostraron un incremento de la expresión de SPARC en muestras de cáncer de colon derivadas de pacientes (Porter *et al.*, 2003). Recientemente, Wiese y colaboradores identificaron un grupo de 65 genes que permiten diferenciar las células tumorales de las normales; entre los genes modificados significativamente SPARC se encontró sobreexpresada (Wiese *et al.*, 2007).

La hipermetilación de un gen es una forma de regulación epigenética, de manera tal que se regula la expresión génica impidiéndose la transcripción normal del gen (Mueller and von Deimling, 2009). En cáncer de pulmón humano se ha observado que el gen que codifica para SPARC se encuentra hipermetilado (Suzuki *et al.*, 2005) y resultados similares han sido descriptos en diferentes líneas tumorales pulmonares (Suzuki *et al.*, 2005). Confirmando estas evidencias, Pan y colaboradores demostraron que el tratamiento de células de cáncer de pulmón con un fármaco anti-inflamatorio indujo una reducción del potencial invasivo asociado a una restauración de la expresión de SPARC vía demetilación de sus secuencias promotoras (Pan *et al.*, 2008).

**Tabla 3: Evidencias del papel de SPARC como una proteína antitumoral.** Resumen de los trabajos en los que se estudia el papel de SPARC en cáncer. Las evidencias bibliográficas provienen de muestras humanas, modelos experimentales murinos y de líneas celulares. *Correlación inversa*: se refiere a disminución de la expresión de SPARC en tumor, disminución de la expresión de SPARC correlacionado con metástasis o aumento del tamaño tumoral, disminución de la expresión de SPARC asociado con pronóstico negativo y aumento de la expresión asociado a aumento de supervivencia. SP, SPARC. Adaptado y modificado de Arnold *et al*, 2009.

| ESTIRPE TUMORAL            | MUESTRAS HUMANAS                              |                                                                                             | MODELOS MURINOS Y LINEAS CELULARES                                                                                                |                                                                                                                                             |
|----------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            | Expresión                                     | Referencias                                                                                 | Descripción                                                                                                                       | citas                                                                                                                                       |
| Sangre (leucemia mieloide) | Disminución de la expresión                   | (Bullinger <i>et al.</i> , 2004; DiMartino <i>et al.</i> , 2006; Ross <i>et al.</i> , 2004) | SP exógena inhibe proliferación                                                                                                   | (DiMartino <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                            |
| Neuroblastoma              | Correlación inversa                           | (Chlenski <i>et al.</i> , 2002)                                                             | SP inhibe migración, angiogénesis y estimula apoptosis                                                                            | (Chlenski <i>et al.</i> , 2004; Chlenski <i>et al.</i> , 2002)                                                                              |
| Mama                       | Correlación inversa, aumento de SP en estroma | (Beck <i>et al.</i> , 2008; Bergamaschi <i>et al.</i> , 2008)                               | Sobre-expresión de SP inhibe proliferación; SP endógena reduce metástasis                                                         | (Koblinski <i>et al.</i> , 2005; Dhanesuan <i>et al.</i> , 2002)                                                                            |
| Colon                      | Correlación inversa                           | (Cheetham <i>et al.</i> , 2008; Tai <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2007)        | Expresión de SP aumenta sensibilidad a quimioterapia                                                                              | (Tai <i>et al.</i> , 2005; Cheetham <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2007; Taghizadeh <i>et al.</i> , 2007)                       |
| Riñón                      |                                               |                                                                                             | SP endógena inhibe crecimiento tumoral                                                                                            | (Chlenski <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                             |
| Hígado                     |                                               |                                                                                             | Expresión de SP reduce crecimiento tumoral y angiogénesis                                                                         | (Lau <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                                  |
| Pulmón                     | Correlación inversa                           | (Suzuki <i>et al.</i> , 2005)                                                               | Aumento del crecimiento tumoral en ratones SP <i>null</i>                                                                         | (Brekken <i>et al.</i> , 2003; Suzuki <i>et al.</i> , 2005; Pan <i>et al.</i> , 2008)                                                       |
| Ovario                     | Correlación inversa                           | (Socha <i>et al.</i> , 2009; Yiu <i>et al.</i> , 2001)                                      | Menor expresión de SP en células tumorales; SP inhibe crecimiento tumoral; SP exógena inhibe proliferación, adhesión e invasión y | (Bull Phelps <i>et al.</i> , 2009; Mok <i>et al.</i> , 1996; Said and Motamed, 2005; Socha <i>et al.</i> , 2007; Said <i>et al.</i> , 2007; |

|          |                                                                                                                 |                                                                                                     |                                                                                                                                  |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                                                                                                                 | aumenta apoptosis;<br>aumento del<br>crecimiento tumoral en<br>ratones <i>SP null</i>               | Socha <i>et al.</i> , 2009;<br>Yiu <i>et al.</i> , 2001)                                                                         |
| Páncreas | Correlación inversa<br>(Brune <i>et al.</i> , 2008; Hong<br><i>et al.</i> , 2008; Sato <i>et al.</i> ,<br>2003) | SP inhibe proliferación<br>celular; aumento del<br>crecimiento tumoral en<br>ratones <i>SP null</i> | (Arnold <i>et al.</i> , 2008;<br>Puolakkainen <i>et al.</i> ,<br>2004; Guweidhi <i>et al.</i> , 2005; Sato <i>et al.</i> , 2003) |
| Próstata | (Kahn <i>et al.</i> , 2008;<br>Rodríguez-Jimenez <i>et al.</i> ,<br>2007; Sova <i>et al.</i> , 2006)            | SPARC hipermetilada                                                                                 |                                                                                                                                  |

#### IV.4.c SPARC y hepatocarcinoma

Como se comentó en apartados anteriores, en los últimos años se está prestando un interés especial a la relación entre las células tumorales y los componentes del microambiente tumoral como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos asociado al tumor y proteínas matricelulares. Esta interrelación es capaz de modular la capacidad del tumor de invadir y diseminarse (Liotta and Kohn, 2001). Sabiendo los cambios que se producen en la MEC durante el desarrollo de la cirrosis y considerando que la cirrosis hepática es la enfermedad subyacente o el entorno más apropiado para el desarrollo del hepatocarcinoma (Llovet *et al.*, 2003) es fundamental estudiar de qué forma proteínas de la matriz, como SPARC, influyen en los eventos celulares que participan de la biología del HC. Por lo tanto, en general, y en el HC en particular, es muy importante estudiar los eventos celulares que surgen como consecuencia de las relaciones célula-MEC.

Como describimos anteriormente existen evidencias que sugieren que SPARC se sobreexpresa en hígados fibróticos. El papel de SPARC en el HC no ha sido explorado en detalle. El primer trabajo en relación con SPARC y HC fue publicado por Le Bail y colaboradores; estos investigadores analizaron muestras de HC humanos mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* demostrando expresión de SPARC en fibroblastos del estroma, de la cápsula tumoral y en fibroblastos del entorno capilar dentro del HC (Le Bail *et al.*, 1999). Mediante un estudio de expresión de genes por tecnología de microarreglos en tres HC humanos con diferentes factores de riesgo, Goldenberg y colaboradores reportaron a SPARC como uno de los tres genes sobreexpresados en forma diferencial en todas las muestras analizadas (Goldenberg *et al.*, 2002).

Finalmente, Lau y colaboradores observaron un aumento del ARN mensajero para SPARC en hígados tumorales y localizaron SPARC en áreas sinusoidales tumorales aunque no detectaron presencia de SPARC en células tumorales en si (Lau *et al.*, 2006). Interesantemente, el mismo grupo de investigadores describió la presencia de formas truncadas de SPARC en muestras de pacientes asociadas con angiogénesis, mientras que estudios en ratones *nude* inoculados con una línea humana de HC que sobreexpresa SPARC muestran un retraso significativo del crecimiento tumoral relacionado a un efecto anti-angiogénico (Lau *et al.*, 2006). Nuevamente queda en evidencia que la complejidad de la biología de SPARC requiere profundizar en el estudio de esta proteína en otros modelos de HC y definir su función que parece ser diferencial según se exprese en las mismas células tumorales o en células del entorno tumoral.

## V. Terapia Génica

---

### V.1 Definición

La terapia génica podría definirse como la transferencia de material génico exógeno a células, tejidos u órganos para corregir un defecto genético o conferir una nueva función biológica con el propósito de prevenir o tratar una enfermedad (Anderson, 2000). El material génico que puede ser transferido es muy diverso: genes completos (Schiedner *et al.*, 1998), moléculas antisentido (Dias and Stein, 2002), ribozimas (Mulhbachter *et al.*, 2010) o ARN de interferencia (Shim and Kwon, 2010). La transferencia de material genético a los tejidos o a las células puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*. El procedimiento *ex vivo* requiere el aislamiento de las células diana, su cultivo *in vitro*, la transferencia del material genético y, posteriormente, la reintroducción de las células en el huésped. Por el contrario, en el procedimiento *in vivo*, el material genético se introduce directamente en el organismo sin aislar previamente a las células diana. Como se describe a continuación para la transferencia del material génico es necesaria la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de dicho material génico.

## **V.2 Vectores**

Un vector ideal es aquel capaz de transferir el material genético a las células deseadas de una manera segura y específica, sin que resulte tóxico para el huésped ni inmunogénico, y que pueda producirse en cantidades adecuadas. Lógicamente es difícil conseguir un vector que reúna todas las cualidades necesarias pero han ocurrido importantes avances en los últimos años. Los vectores pueden ser de dos tipos: virales y no virales o físicos.

### **V.2.a Vectores no virales**

Existen numerosos métodos de transferencia génica basados en vectores no virales. En general son simples y fáciles de preparar, permiten transferir moléculas de gran tamaño, son poco inmunogénicos, su toxicidad suele ser baja y son seguros. Sin embargo, la eficacia de transferencia génica alcanzada suele ser baja y son poco específicos (Ledley, 1995). Los vectores no virales más empleados son el DNA desnudo, los liposomas, la pistola génica, los polímeros catiónicos (poliplejos), los complejos DNA-proteína y los ARN de interferencia. En los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias para mejorar la eficiencia de estos vectores. De particular interés para esta tesis es el uso de ARN de interferencia, el cual constituye una excelente herramienta para el silenciamiento de genes *in vitro* (Iorns *et al.*, 2007). Su utilización *in vivo* presenta mayores dificultades ya que son muy susceptibles de degradación y su incorporación en las células es baja (Kirchhoff, 2008). Sin embargo, recientemente, se han realizado modificaciones químicas en los ARN de interferencia que permiten mejorar la resistencia a degradación enzimática con el objetivo de que permanezcan en circulación por tiempos más prolongados e incrementar la eficiencia y especificidad de transferencia (Shim and Kwon, 2010).

### **V.2.b Vectores virales**

Los más eficaces, y a su vez los más empleados actualmente, son los vectores de tipo viral. Su diseño se realiza mediante la supresión de regiones implicadas en el proceso de replicación viral y la incorporación, en su lugar, del material genético de interés (Prieto *et al.*, 2004). De esta forma el nuevo virus es defectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar las células pero es incapaz de replicarse en ellas. Se utilizan diferentes virus para construir vectores, entre ellos los más utilizados son los adenovirus, los retrovirus (incluyendo lentivirus), virus adenoasociados (AAV), herpesvirus, baciniavirus, entre otros (Waehler *et al.*, 2007).

De particular interés en esta tesis doctoral es el uso de vectores adenovirales. Los adenovirus recombinantes son uno de los vectores virales más empleados (Hall *et al.*, 2010). Son virus pertenecientes a la familia adenoviridae, de estructura icosaédrica, y carentes de envoltura. Están constituidos por ADN y proteína, con una partícula viral de aproximadamente 75 nanómetros de diámetro y un genoma de 36 Kb. Existen 6 subgéneros (A-F) y alrededor de 47 serotipos diferentes de los cuales los tipo 2 y 5 son los más empleados (Hall *et al.*, 2010). El virus posee un ciclo de replicación dividido en dos fases: una fase temprana que implica a los sucesos que ocurren antes de la replicación del ADN, y otra tardía que se corresponde con los sucesos posteriores. Las proteínas necesarias para la transcripción y replicación viral (regiones E1a y E1b, E2a y E2b, E3 y E4) se expresan en la fase temprana. En la fase tardía (L1-L5) se expresan las proteínas que conformarán la envoltura del adenovirus (Zhang, 1999).

Los vectores adenovirales se construyen mediante la delección de los genes de la región E1, maniobra que los convierte en virus defectivos, ya que E1 es un trans-activador del resto de los genes del adenovirus. Los adenovirus recombinantes se propagan en células empaquetadoras que expresan en forma constitutiva la proteína E1 (células 293)(Graham *et al.*, 1977). Los adenovirus no integran su material genético en el genoma del huésped, por lo que su expresión es transitoria (Kovesdi *et al.*, 1997).

Los adenovirus penetran las células que infectan a través de un proceso de endocitosis dependiente de receptores, mecanismo que se inicia cuando la fibra proteica se une al receptor de superficie. Dos proteínas han sido propuestas para cumplir la función de unir el virus a la célula: el receptor de coxsakie y el receptor de adenovirus denominados CAR, que es una glucoproteína de transmembrana, y la cadena pesada del CMH de tipo I (Bergelson *et al.*, 1997). La interacción fibra-receptor se acompaña de otro evento en el que la base pentona interactúa con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  que están localizadas en la superficie celular (Wickham *et al.*, 1993). Recientemente, Waddington y colaboradores demostraron que la internalización de los adenovirus no solo ocurre mediante estas vías sino que el factor de coagulación X (FX) puede unirse a una proteína de la capsida viral, llamada hexon, y el complejo FX-adenovirus puede penetrar las células por medio de la interacción con heparina (Waddington *et al.*, 2008).

Los adenovirus tienen un especial interés en hepatología por su tropismo natural por los hepatocitos y por su capacidad para infectarlos a pesar de tratarse de células en estado de reposo (Sullivan *et al.*, 1997). Sin embargo deben tenerse los recaudos necesarios ya que desde que

comenzaron a usarse los adenovirus se observó que la expresión de estos vectores es transitoria, y que desencadena en el huésped una importante respuesta inmunitaria de tipo humoral y celular, tanto contra las proteínas virales como contra el transgen (Yang *et al.*, 1994), lo que conduce finalmente a la eliminación de las células transducidas. Se han ideado distintas estrategias para resolver estos problemas de respuesta inmunitaria anti-adenovirus, como por ejemplo el uso de inmunosupresores (Ilan *et al.*, 1997) o modificaciones en los adenovirus para que sean menos inmunogénicos (como los adenovirus “gutless” que solo poseen secuencias de empaquetamiento y han demostrado expresión elevada y sostenida)(Schiedner *et al.*, 1998).

### **V.3 Terapia génica en fibrosis hepática**

En cirrosis hepática experimental, recientemente se ha avanzado con el empleo de la terapia génica, con el fin de aumentar la actividad de las MMPs que degradan el excesivo acúmulo de proteínas fibrilares (principalmente colágenas). Al respecto se ha reportado el empleo de un vector adenoviral con el activador de plasminógeno tipo uroquinasa humano (Ad-huPA), el cual es un iniciador de la cascada proteolítica, con la finalidad de revertir la fibrosis hepática experimental inducida en ratas, con resultados alentadores (Miranda-Díaz *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2000). Otras estrategias de terapia génica que se encuentran en fase experimental en animales, incluyen el empleo de MMP-8 (Ad-MMP8) y MMP-157, tanto en el modelo de ligadura del conducto biliar como en el de CCl<sub>4</sub> (Siller-Lopez *et al.*, 2004; Garcia-Banuelos *et al.*, 2002a; Prosser *et al.*, 2006). Otra estrategia adicional es el bloqueo de TGF- $\beta$ 1, a través de un receptor dominante negativo ( $\Delta$ CitT $\beta$ RII) que ha sido modificado de tal manera que no posea la región citoplásmica, bloqueando así la cascada de señalización intracelular e impidiendo que lleve a cabo sus efectos fibrogénicos (Hernandez-Canaveral *et al.*, 2004; Marquez-Aguirre *et al.*, 2009) o mediante la utilización de un antisentido para TGF- $\beta$ 1(Arias *et al.*, 2003). Borkham-Kamphorst y colaboradores generaron un adenovirus que codifica para la secuencia anti-sentido de PDGF y demostraron atenuación de la fibrosis experimental (Borkham-Kamphorst *et al.*, 2004). Más tarde Kinoshita y colaboradores utilizando un adenovirus que codifica para BMP-7, un antagonista de TGF- $\beta$ 1, lograron buenos resultados en un modelo en fibrosis por TAA en rata (Kinoshita *et al.*, 2007). También, varios trabajos estudian expresar o inhibir genes mediante el uso de terapias génicas de forma de disminuir la proliferación y activación o inducir apoptosis de las CEH (Son *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009). Por otro lado, algunas estrategias han intentado dirigir a los adenovirus específicamente a

las CEH activadas y disminuir el tropismo a hepatocitos de manera de poder desarrollar nuevas posibilidades en la terapia de la fibrosis hepática (Schoemaker *et al.*, 2008).

Hasta el momento hemos mencionado estrategias que implican el uso de vectores virales; sin embargo otras tantas utilizan vectores no virales, como ARN de interferencia sintéticos o sintetizados por plásmidos. Por ejemplo la inhibición de TIMP-2 (Hu *et al.*, 2007), del factor de crecimiento de tejido conectivo (Li *et al.*, 2008), de PDGF (Chen *et al.*, 2008), entre otros. Recientemente, Sato y colaboradores desarrollaron un complejo liposomal acoplado a retinol que porta el ARN de interferencia y puede administrarse de forma sistémica. El retinol es reconocido por el receptor de retinol de las CEH asegurando de esta forma el envío del ARN de interferencia antifibroticos a las CEH (Sato *et al.*, 2008).

#### **V.4 Terapia génica en el hepatocarcinoma**

Como se ha comentado previamente no existen tratamientos con intención curativa para pacientes con HC que no son susceptibles de resección quirúrgica, transplante o terapias ablativas como la radiofrecuencia (Llovet and Bruix, 2008); por esta razón, la terapia génica es una alternativa interesante para el tratamiento de aquellos tumores en los cuales las terapias convencionales no son aplicables. Actualmente existen varios enfoques en la terapia génica experimental frente al HC. Entre ellas podemos destacar las siguientes:

- a) Utilización de vectores virales para la administración de “genes suicidas”: estos genes codifican una enzima (por ejemplo la timidina quinasa o citocina deaminasa) que tiene la propiedad de convertir un pro-fármaco inocuo (por ejemplo el ganciclovir) en un producto tóxico para la célula en división (Kanai, 2001)
- b) Inhibición de oncogenes y restauración de la expresión de genes supresores de tumores mediante estrategias con genes antisentido, ribozimas, anticuerpos intracelulares, proteínas con efecto dominante negativo o con ARN de interferencia (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 2006).
- c) Inmunoterapia: transferencia de génica de citoquinas inmunoestimuladoras (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7; IL-12, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF) para potenciar la respuesta antitumoral (Matar *et al.*, 2009).
- d) Transferencia de genes con efecto antiangiogénico, ya que la generación de nuevos vasos es un elemento fundamental para el crecimiento y diseminación de los tumores. Entre estas estrategia se encuentran el uso de endostatina, bloqueo del receptor de VEGF (*Vascular Endothelial Growth*

*Factor*), antagonistas de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) (Hong *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2005).

e) Viroterapia: consiste en utilizar virus que puedan replicarse y así eliminar las células tumorales, específicamente, sin dañar células normales. Estos virus, llamados oncolíticos, pueden tener esta capacidad o estar modificados genéticamente para tal fin (Chang *et al.*, 2009).

## ***OBJETIVOS***

## Hipótesis de trabajo

---

SPARC es una proteína con un gran espectro de funciones biológicas que se expresa en tejidos que se encuentran en proceso de renovación, remodelación y/o cicatrización, como es el caso de la fibrosis hepática y algunos tipos de cáncer. SPARC también tiene una relevancia especial en el desarrollo tumoral si bien en esta entidad sus funciones pueden llegar a ser contradictorias o al menos dependientes del tipo de tumor o del microambiente tumoral. La hipótesis principal del presente trabajo es que SPARC participa activamente en la etiopatogenia de la cirrosis hepática, y que inhibiendo su expresión mediante estrategias de transferencia génica se puede contribuir a atenuar la intensidad del proceso fibrogénico hepático. Considerando que la cirrosis hepática es un entorno favorable para la aparición del hepatocarcinoma postulamos que SPARC también puede tener un papel importante en el desarrollo del hepatocarcinoma.

## Objetivos

---

En el presente trabajo se incluyen tres apartados relacionados entre sí y expuestos de forma consecutiva. En función de los antecedentes expuestos el objetivo general del presente trabajo es:

Estudiar el papel de la proteína de matriz extracelular SPARC en hígado. En particular se busca comprender su importancia en el desarrollo de la fibrosis hepática y el hepatocarcinoma.

### ***Objetivos particulares***

**Primera parte:** en la primera parte del trabajo se plantearon los siguientes objetivos en relación a la fibrosis hepática:

**Objetivo 1.** Estudiar la expresión de SPARC en un modelo de fibrosis experimental inducida mediante la administración crónica de tioacetamida, tanto en rata como en ratón.

**Objetivo 2.** Evaluar los efectos de la transferencia génica mediada por adenovirus de una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC (AdasSPARC) sobre un modelo de prevención de la fibrosis hepática en ratas.

**Objetivo 2a** Demostrar la inhibición de la expresión de SPARC en hígados de ratas transducidas con el vector AdasSPARC.

**Objetivo 2b** Estudiar los efectos de la inhibición de SPARC en el desarrollo de la fibrosis hepática.

**Objetivo 3.** Estudiar el desarrollo de la fibrosis hepática en ratones sin expresión de SPARC (ratones SPARC *null*).

**Objetivo 3a** Desarrollo de fibrosis avanzada en ratones tipo salvaje y en ratones SPARC *null*.

**Objetivo 3b** Estudiar los mecanismos subyacentes a los efectos observados.

**Segunda parte:** Con la finalidad de profundizar en el papel de SPARC en el proceso fibrogénico hepático y dado que las células estrelladas hepáticas son claves en el desarrollo de la fibrosis se plantearon los siguientes objetivos:

**Objetivo 1.** Evaluar la mejor herramienta de transferencia génica para inhibir la expresión de SPARC *in vitro* en diferentes líneas de células estrelladas hepáticas y en cultivos primarios.

**Objetivo 2.** Estudiar los efectos biológicos de la inhibición de SPARC en las células estrelladas hepáticas en diferentes líneas de células estrelladas hepáticas y en cultivos primarios.

**Tercera parte:** En la tercera parte se pretende estudiar la relación entre SPARC y hepatocarcinoma. Para ello nos proponemos:

**Objetivo 1.** Estudiar la expresión de SPARC en una línea de HC (HepG2).

**Objetivo 2.** Modular la expresión de SPARC en las líneas de hepatocarcinoma empleando vectores adenovirales que expresen secuencias antisentido y sentido para SPARC.

**Objetivo 3.** Estudiar los efectos biológicos inducidos por los cambios de la expresión de SPARC en células de hepatocarcinoma.

**Objetivo 4.** Estudiar *in vivo* de los efectos de la modulación de SPARC sobre el crecimiento de los tumores experimentales.

Los objetivos propuestos permitirán ahondar en el estudio del papel de SPARC en dos entidades clínicas desprovistas de tratamiento eficaz como la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma avanzado, así como también brindar las bases para un posible desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para estas enfermedades.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## I PARTE

---

### I.1 Líneas celulares

En la primera parte del trabajo se utilizó la línea celular HEK-293 para la amplificación de los vectores adenovirales utilizados. La línea celular HEK-293 deriva de células de riñón embrionario humano. Está transfectada de manera estable con la región E1 perteneciente al adenovirus humano tipo 5 (Ad5), transformación que permite que los adenovirus empleados puedan replicarse y amplificarse en el interior de las células 293, ya que esta región se encuentra deletada en los adenovirus que se utilizan en estos experimentos. El medio de cultivo empleado fue DMEM (Dulbecco Modified minimal Essential Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (%v/v) inactivado a 56°C, 2 mM glutamina, 100 µg/ml estreptomicina, 100 UI/ml penicilina. Estas células fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### I.2 Producción de los vectores adenovirales recombinantes

#### I.2.a Generación del vector Adenoviral AdasSPARC y del vector Ad $\beta$ -gal

Para este trabajo se utilizaron adenovirus de primera generación no replicativos. El adenovirus que contiene la secuencia antisentido para SPARC humana (AdasSPARC) (clonado en el laboratorio del Dr. O. Podhajcer) fue preparado cortando un fragmento de 1.7 kb con Sal I del plásmido pBSSK+. Este fragmento fue clonado en el vector shuttle pADPSY (proveído por el Dr. Jacques Mallet) con Sal I (**Figura 10A**). El nuevo plásmido, pADPSY, que contiene la secuencia antisentido del ARN mensajero para SPARC fue co-transfectado posteriormente con el DNA del adenovirus tipo 5 (desprovisto de regiones E1 y E3) empleando Cla I mediante precipitación con fosfato de calcio. La recombinación homóloga resultante entre ambos ADNs se realizó en células HEK-293. La incorporación de la secuencia antisentido para SPARC en el esqueleto adenoviral se confirmó por efecto citopático en células HEK-293. Dado que las células HEK-293 expresan SPARC se estableció el descenso en el nivel de SPARC mediante análisis con *Northern blot* y *Western blot* de los clones y del adenovirus stock. El adenovirus que expresa  $\beta$ -galactosidasa (Ad- $\beta$ gal) fue clonado con Sal I en el vector *shuttle* pADPSY-LTRSVpolyA.

### **1.2.b Preparación del stock adenoviral y purificación de los vectores adenovirales**

El primer paso en la generación del stock adenoviral consistió en infectar células HEK-293 cultivadas en una placa de 150 mm con una confluencia aproximada del 80%. Se retiró el medio sobrenadante de la placa y se colocaron 8 ml de DMEM 2% SFB, luego las células fueron infectadas con 1-2  $\mu$ l de un stock viral previamente generado en el laboratorio del Dr. Podhajcer, como se comentó anteriormente. Tras una incubación de 3 hs con agitación esporádica se agregó medio y las células se incubaron por 18-20 hs. Se colectaron las células y se lisaron por ciclos de congelado/descongelado. Luego de centrifugar por 10 min a 4000 rpm, se utilizó el sobrenadante para infectar 15 placas de 150 mm. Se incubó 2 hs a 37°C con agitación cada 20 min y se esperó 24 hs para colectar las células infectadas. Luego de este tiempo las células se centrifugaron y se lisaron por congelado/descongelado. Para obtener el virus, el extracto se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue utilizado para purificar el virus amplificado. Se utilizó un gradiente de CICs (1ml CICs densidad 1,6 + 1ml CICs densidad 1,3) para separar el virus del ADN remanente y de las cápsides vacías. El sobrenadante se sembró sobre el gradiente y se centrifugó a 35000 rpm durante 1,5 hs. Se obtuvieron tres bandas, la banda inferior que corresponde al virus, se extrajo con una aguja y se sometió a una nueva centrifugación. Para ello se colocó la muestra obtenida del primer gradiente sobre 2ml de CICs densidad 1,34 y se centrifugó a 35000 rpm durante 18 hs. De esta forma se obtuvo una nueva banda con virus puro el cual fue dializado en solución de diálisis (1l de PBS / Cl<sub>2</sub>Mg 1mM). El virus se resuspendió en glicerol 10% y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### **1.2.c Titulación del adenovirus**

El título de adenovirus fue determinado mediante análisis de formación de calvas en cultivo por ensayo de dilución límite. Para ello se infectaron células HEK-293 (1x10<sup>4</sup> células por pocillo) previamente sembradas en placas de 96 pocillos. El adenovirus fue diluido en series de 10 y por duplicado. Se removió el sobrenadante de la placa de 96 y se agregó el adenovirus diluido en un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo. Se incubaron a 37°C durante un período de 10 días, fecha en la cual fue evaluada la presencia del efecto citopático del virus sobre las células mediante tinción con cristal violeta. El título de los vectores fue expresado como 50% de dosis infectiva por mililitro sobre células HEK-293 (TCID<sub>50</sub>/ml), aplicando el siguiente calculo:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = -\log (X_0 + \frac{1}{2} + 1 * \sum X/n)$$

$X_0$  exponente de la dilución con 100% de efecto citopático

$X$  número de pocillos con 100% de efecto citopático

$n$  número de réplicas

### 1.3 Animales empleados

En el estudio de inducción de fibrosis en ratas se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos de 250-300 gramos (Fucal, Argentina). Durante el período de experimentación los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad Austral. Los animales fueron alojados en jaulas individuales sometiénolos a ciclos de luz-oscuridad de 12 hs de duración a una temperatura y humedad constantes. Recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales que involucren animales vivos se realizaron ajustándose a las normas indicadas en "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D.C. 1996).

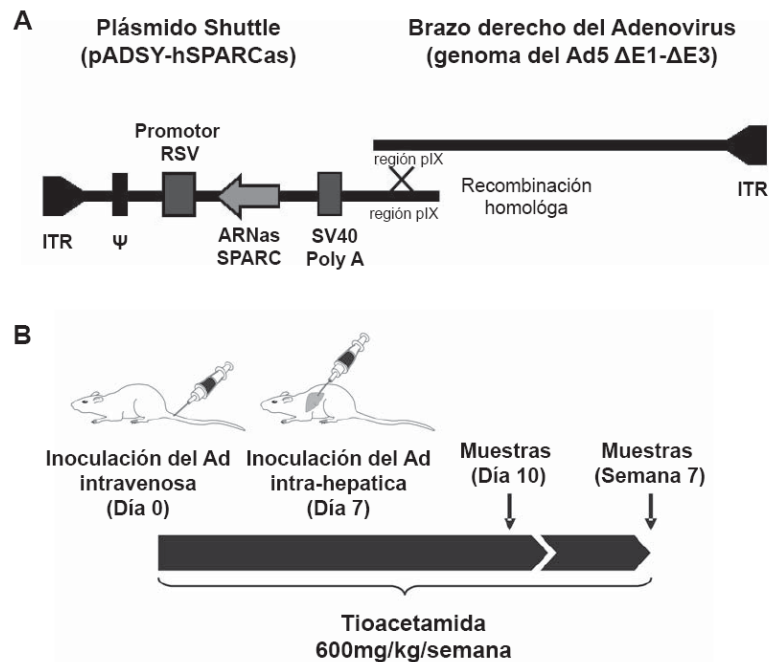
Para los estudios en ratones se utilizaron ratones machos SPARC null (Sparc<sup>tm1Hwe</sup>/Sparc<sup>tm1Hwe</sup>) de entre 5 y 8 semanas (Jackson Laboratory). Estos animales poseen una inserción en el exón 4 del gen de *sparc* de dos cassette en tandem de resistencia a neomicina, por lo que, no se detecta ARNm ni expresión proteica en los animales homocigotas para la inserción. Como grupo control se utilizaron ratones machos híbridos C57BL/6J y 129S/SvEv (serán llamados ratones WT) que se obtienen de cruzamiento entre ratones heterocigotas para el *knock out* de SPARC. Los animales fueron apareados en el bioterio del Instituto Leloir y luego trasladados al bioterio de la Universidad Austral para realizar los experimentos.

Los animales homocigotas SPARC *null* son viables y fértiles. Fenotípicamente son normales aunque presentan una disminución en la actividad física, pueden desarrollar cataratas u osteopenias. La opacidad lenticular comienza a manifestarse a las 4 o 8 semanas, llegando a cataratas maduras a los 5-8 meses. En animales de 17 semanas se observó una reducción del 50% en el hueso trabecular y a las 36 semanas es del 70%. Una descripción más detallada de estas patologías se encuentra en [www.jaxmice.jax.org/strain/003728.html](http://www.jaxmice.jax.org/strain/003728.html).

### 1.4 Terapia Génica in vivo y desarrollo de fibrosis en ratas

Con el objetivo de desarrollar un modelo preventivo para el desarrollo de la fibrosis, las ratas fueron inyectadas en la vena de la cola con 500  $\mu$ l ( $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>) AdasSPARC, Ad- $\beta$ gal o solución salina (Día 0). Simultáneamente se comenzó la administración de tiocetamida (TAA) para desarrollar la fibrosis. La TAA (Sigma) se administró de forma intraperitoneal (i.p.) diluida en

solución salina (200 mg/kg peso corporal) tres veces por semana durante 7 semanas (Muller *et al.*, 1988; Oren *et al.*, 1996). Al día 7 se administró una segunda dosis de vectores virales (AdasSPARC o Ad-βgal) por laparotomía directamente en el parénquima hepático. Los animales se sacrificaron al día 10 o a semana 7 (**Figura 10B**). Se utilizaron 6 animales en cada uno de los grupos de tratamiento y los experimentos se realizaron por triplicado.



**Figura 10.** Construcción del adenovirus recombinante AdasSPARC y diseño experimental de la inducción de fibrosis en ratas. A) Representación esquemática de la construcción del adenovirus AdasSPARC. Este vector codifica para la secuencia antisentido de SPARC humana bajo el control del promotor constitutivo RSV. B) Esquema de la administración de TAA y de la transferencia génica. El adenovirus fue administrado conjuntamente con la primera dosis de TAA y 7 días más tarde se inoculó el adenovirus directamente en el hígado (2da dosis). Se recogieron muestras a día 10 y semana 7.

## 1.5 Desarrollo de fibrosis en ratones SPARC null

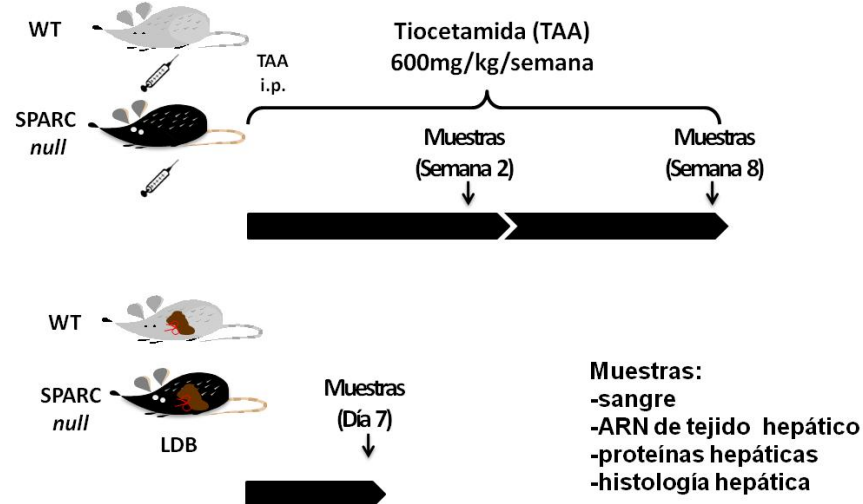
### 1.5.a Modelo de inducción de fibrosis con tioacetamida (TAA)

Se administró TAA de forma intraperitoneal (i.p.) a animales SPARC *null* o WT 3 veces por semana durante distintos tiempos: 2, 4, 6, 8 y 10 semanas. Se utilizó una dosis de 200 mg/kg de peso corporal. A los distintos tiempos mencionados los animales fueron sacrificados para evaluar la magnitud de la fibrosis (**Figura 11**). Se obtuvieron muestras de suero, para determinación de citoquinas y transaminasas hepáticas, muestras de tejido hepático para realizar estudios

histológicos y extracción de ARN y proteínas. Se utilizaron 6 animales en cada uno de los grupos de tratamiento.

### 1.5.b Modelo de inducción de fibrosis por ligadura del conducto colédoco

Como un modelo alternativo al desarrollo de fibrosis por TAA se llevó a cabo el modelo de ligadura del conducto colédoco. Ratones SPARC *null* y WT de 8 semanas de edad, recibieron una mezcla de fármacos para sedo-analgesia (compuesta por midazolán 10%, ketamina 12%, fentanilo 5% en agua estéril) antes del procedimiento quirúrgico. Se practicó una laparotomía medial y tras exponer la vía biliar extra-hepática se ligó el conducto colédoco con seda 5-0, realizando una doble sutura. Los animales fueron sacrificados luego de 7 días siguiendo la misma metodología de toma de muestras realizada en el modelo de administración de TAA (**Figura 11**).



**Figura 11.** Esquema de trabajo con ratones SPARC *null* y WT. Se administró TAA a un grupo de ratones SPARC *null* y WT. Los mismos fueron inoculados durante 8 semanas con TAA, tres dosis semanales de 200mg/kg. A otro grupo de animales se les ligó el conducto colédoco y al cabo de 7 días se sacrificaron para obtención de muestras. LDB, ligadura del conducto biliar.

### 1.6 Determinación de la eficiencia de infección hepática de los vectores adenovirales

Se realizó una tinción inmunohistoquímica para evaluar la expresión del gen reportero  $\beta$ -galactosidasa en tejido hepático. El tejido hepático obtenido 48 hs después de la inyección intravenosa del Ad- $\beta$ gal o 48 hs después de la 2<sup>da</sup> administración intrahepática del adenovirus (día

10) se criopreservó en OCT (Biopack). Las muestras fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C. Posteriormente, el tejido se cortó con un grosor de entre 8 a 10 µm. Se fijó con formalina y se mantuvieron en buffer fosfato (PBS) hasta realizar la técnica de inmunohistoquímica. Tras lavados en PBS se procedió a neutralizar la actividad de la peroxidasa endógena utilizando peróxido de hidrógeno 0,03% en alcohol durante 20 min. Luego se incubó con un anticuerpo de conejo anti β-galactosidasa de rata (Vector) durante 24 hs a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Las muestras fueron reveladas incubando con un anticuerpo anti conejo conjugado con biotina (dilución 1:40, Vector) durante 1 h y posteriormente tratando durante 1 h con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Elite). La actividad de la peroxidasa se detectó usando diaminobenzidina (DAB) y níquel (Shu *et al.*, 1988). Los cortes se montaron en xilol (Biopack) luego de deshidratarlos con pases sucesivos en alcohol 70%, 95% y 100%.

## **1.7 Análisis de la expresión del ARNm hepático de SPARC por PCR en tiempo real (qPCR)**

### **1.7.a Extracción de ARN total de tejido hepático**

Se recolectaron entre 150-200 mg de tejido hepático tanto de ratas como de ratones. En el caso del ensayo en ratas se obtuvieron muestras de ratas inyectadas con solución salina o con  $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub> AdasSPARC o de Ad-βgal a día 2 o 10 post- tratamiento. En el caso de los ratones se recolectaron muestras a semana 2, 4, 6, 8 y 10 posteriores al inicio del tratamiento con TAA tanto en ratones WT como SPARC *null*. Los tejidos se homogenizaron con Polytron (Janke & Kunkel IKA-WERK) y el ARN total se extrajo usando TRIzol (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **1.7.b RT-qPCR**

Se trataron 30 µg de ARN con ADNasa (Invitrogen) para degradar el ADN genómico remanente. Luego se re-purificó el ARN y se cuantificó. Se realizó transcripción reversa de 2 µg de ARN utilizando 200U de la enzima SuperScript II (Invitrogen), 500 ng de primers oligo dT, dNTPs, inhibidor de ARNasa, 2,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg durante 45 min a 42°C. Posteriormente se realizó una qPCR para cuantificar el ARNm deseado utilizando el método de Sybergreen. La qPCR permite la detección y cuantificación del producto de la PCR a medida que se sintetiza. Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl que contiene: 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen),

buffer de reacción 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 y 50 mM KCl), 1,5 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 0,4 mM de cada primer gen específico (para amplificar SPARC, GAPDH, colágeno o TGF- $\beta$ 1) (**Tabla 4**), 200 mM dNTPs. Se realizaron 30 ciclos de PCR: 30 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura de pegado del primer (T<sub>m</sub>) y 60 seg a 72°C, seguido de la extensión final de 10 min a 72°C. Las reacciones fueron realizadas por triplicado. En las muestras de rata el promedio de los datos por triplicado de cada muestra se utilizó para calcular el cambio relativo en la expresión génica luego de normalizar por la concentración de ADN copia. La concentración del ADN copia se cuantificó por el kit de “OligoGreen Single Stranded Quantification kit” (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Al trabajar con hígados de ratón se utilizó el gen GAPDH como normalizador de la reacción.

**Tabla 4.** Primers utilizados en esta sección.

| GEN                            | ORGANISMO       | SECUENCIA SENTIDO (5' - 3') | SECUENCIA ANTISENTIDO (5' - 3') | T <sub>m</sub> (°C) |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>sparc</i>                   | Rata            | CCACTCGCTTCTTTGAGACC        | TAGTGGAAGTGGGTGGGGAC            | 56                  |
| <i>sparc</i>                   | Ratón           | CCACACGTTTCTTTGAGACC        | GATGTCCTGCTCCTTGATGC            | 56                  |
| <i>colágeno</i>                | Ratón           | CCACACGTTTCTTTGAGACC        | GATGTCCTGCTCCTTGATGC            | 56                  |
| <i>tgf-<math>\beta</math>1</i> | Ratón           | CCACTCGCTTCTTTGAGACC        | TAGTGGAAGTGGGTGGGGAC            | 54                  |
| <i>gapdh</i>                   | Rata<br>/humano | CATCTCTGCCCCCTCTGCTG        | GCCTGCTTCACCACCTTCTTG           | 54-56               |

## I.8 Tinciones Histológicas

Los hígados fueron fijados en formol 10%. Luego, fueron embebidos en parafina, cortados (5  $\mu$ m) y posteriormente sometidos a las siguientes tinciones:

**H&E:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes de 10 min cada uno en xilol (Biopack) y se hidrató en agua. Se incubó con una solución de hematoxilina por 15 min. Se lavó con agua corriente durante 5 min. Para rehidratar el tejido se incubó 1 min en etanol 100%, 1 min en etanol 96%, 1 min en etanol 70% y 1 min en agua. Se realizó una contratinción con solución de eosina alcohólica durante 2 min. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se incubó 2 veces en etanol 100% por 2 min. Se aclaró en xilol y montó con bálsamo de Canadá (Biopack).

**Tricrómico de Masson:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes de 10 min en xilol y se lavó con agua destilada por 5 min. Se incubó con una solución de hematoxilina férrica de Weigert

por 10 min. Se lavó en flujo de agua corriente por 5 min. Se incubó con rojo Masson (Fucsina ácida 0,4% m/v, Rojo Biedbric 1,6% m/v (Sigma-Aldrich, B6008). Se lavó con agua destilada. Se trató con solución acuosa de ácido fosfotúngstico (ácido fosfotúngstico 1% m/v en agua destilada) durante 15 min. Se lavó con agua destilada. Se tiñó con solución verde luz (Verde Luz 0,3% m/v, Acético Glacial 0,3 % v/v en agua destilada) durante 5 min. Se lavó en solución de ácido acético al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Se deshidrató mediante un pasaje de 30 seg en etanol 70%, 30 seg en etanol 96% y 30 seg en etanol 100%, se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

**Rojo Sirio:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes en xilol durante 10 min. Se incubó durante 1 h con rojo sirio (Rojo sirio 0,1 % m/v; Sigma-Aldrich 365548) en ácido pícrico saturado. Se lavó dos veces en ácido acético glacial al 0,005% en agua destilada. Se deshidrató mediante dos pasajes de 30 seg en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

### ***1.9 Ensayo de inmunofluorescencia para detectar SPARC y $\alpha$ -SMA en tejidos***

Para estudiar la expresión de SPARC y -actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en el tejido hepático de ratas, se extrajeron muestras de hígados luego de 7 semanas de tratamiento. El tejido se fijó en formol 10% y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones de tejidos de 5  $\mu$ m, se desparafinizó y se rehidrató. La recuperación antigénica se realizó calentando en microondas los tejidos en buffer citrato. Se bloqueó con suero de cabra al 10% en PBS-0,2% Tween durante 60 min a TA. Luego se incubó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC (diluído 1:200, cedido por la Dra. Helen Sage, Universidad de Washington) y con un anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -SMA (diluído 1:1000, Dako). Se realizaron 3 lavados en PBS y los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a FITC (Jackson Immuno Research) y con un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a rodamina (Jackson Immuno Research). Ambos anticuerpos secundarios se diluyeron 1:40 en PBS-0,2% Tween-20 y se incubaron 2h a 37°C. Como control de inespecificidad se realizó el mismo ensayo sin agregar anticuerpo primario. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Nikon E800 acoplado a una cámara CCD.

Con el objeto de estudiar la expresión de SPARC en ratones se realizaron cortes de 8  $\mu$ m en criostato a partir de tejido hepático congelado en OCT. El tejido fue fijado en formalina alcohólica por 15 min. Se permeabilizó mediante pasajes en etanol 70%, etanol 96%, etanol 100%,

xilol, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% durante 30 seg cada uno. Se lavó en PBS por 5 min. Se bloquearon las proteínas con 1% de BSA en PBS durante 30 min en cámara húmeda a TA. Se incubó ON a 4°C con un anticuerpo monoclonal de rata anti-SPARC murino (R&D) en una dilución 1:150 en 0,2% BSA 0,1% tritón en PBS. Luego se realizaron 4 lavados con PBS durante 5 min cada uno. Se incubó con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-rata conjugado a FITC (Vector Laboratories) en una dilución 1:40 en 0,25% BSA en PBS durante 2 horas a TA cubierto de la luz. Se lavó 4 veces con PBS durante 5 min cada uno. Se montó con 2,5% DABCO en glicerol.

### **I.10 Ensayos de inmunohistoquímica**

Para estudiar la expresión de  $\alpha$ -SMA en el tejido hepático de rata se realizó un ensayo de inmunohistoquímica. El tejido se fijó en formol al 10% y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones de 5  $\mu$ m, se desparafinizó y se rehidrataron los tejidos. La peroxidasa endógena se bloqueó utilizando *Vectastain peroxidase blocking complex* (Vectastain ABC Elite). Para detectar las CEH activadas los tejidos se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -SMA (diluído 1:50; Dako) preparado en PBS 1% Tween-20 y 1% BSA. Luego se realizaron lavados con PBS y se incubó durante 60 min con un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a biotina. Luego se agregó el complejo biotina-avidina acoplado a peroxidasa. La activación peroxidasa se detectó usando DAB y níquel (Shu *et al.*, 1988). Los cortes se montaron en xilol luego de deshidratarlos con pases sucesivos en alcohol 70%, 95%, 100%. Se realizó un control de especificidad donde no se colocó el anticuerpo primario anti- $\alpha$ -SMA, el mismo no dio señal positiva. Con el objetivo de realizar un análisis cuantitativo se hizo un estudio morfométrico de 200 imágenes de microscopía (400X) por espécimen. Se utilizó un programa de detección de color desarrollado en el Matlab 6.0. Los resultados se expresaron como porcentaje del área positiva.

Para estudiar la expresión de  $\alpha$ -SMA en tejido hepático de ratón se siguió un protocolo similar. Las secciones de tejido hepático embebidas en parafina y montadas sobre vidrio fueron desparafinizadas mediante incubación a 60°C durante 20 min. Luego, se incubó en xilol dos veces durante 15 y 10 min respectivamente. Se rehidrataron mediante 2 pasajes de 2 min en etanol 100%, un pasaje de 2 min en etanol 96% y un pasaje de 2 min en etanol 70%. A continuación se incubó en agua destilada por 2 min. Se realizó una recuperación antigénica en microondas, para

esto se colocaron las muestras en un recipiente de vidrio con buffer citrato pH 6,0, dicho recipiente se colocó en otro recipiente más grande conteniendo agua en un nivel de unos 5 centímetros. Se cubrió con papel film y se colocó en el microondas siguiendo la siguiente secuencia de incubaciones: se incubó a máxima potencia durante 4 min, 10 min apagado sin abrir la puerta del microondas, 2 min a máxima potencia, 10 min apagado sin abrir la puerta del microondas, 1 minuto a máxima potencia, 10 min apagado sin abrir la puerta del microondas y 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min cada uno. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 20 min. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada uno. Se bloqueó la biotina endógena con una solución de avidina (Blocking Kit-Vector Laboratories) en cámara húmeda durante 20 min. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada uno. Se bloqueó la avidina endógena con una solución de biotina (Blocking Kit-Vector Laboratories) en cámara húmeda durante 20 min. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada uno. Se bloquearon las proteínas con 10% suero normal de cabra + BSA 1% en PBS durante 30 min en cámara húmeda a TA. Luego se incubó ON a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo para  $\alpha$ -actina de músculo liso (Abcam) en una dilución 1:100 en BSA 0,2%, tritón 0,1% en PBS. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada uno. Luego se incubó durante 2 hs a TA con un anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo (Vector Laboratories) en una dilución 1/100 en BSA 0,2% en PBS. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada uno. Se reveló con un conjugado enzimático avidina-peroxidasa (Extravidin-peroxidase, Sigma-Aldrich) diluido 1:100 en PBS, incubando 30 min a TA. Se lavó nuevamente 3 veces en PBS y posteriormente 2 veces en acetato 0,1 M durante 5 min. El revelado final se realizó en una mezcla de una solución con diaminobenzidina 0,1% en agua destilada y una solución con sulfato de amonio-níquel 5%,  $\text{CINH}_4$  0,08% y glucosa 0,4% en acetato de amonio 0,2 M, incubando de 5 a 15 min en oscuridad. Finalmente, los vidrios se lavaron en acetato 0,1 M (2 lavados de 5 min) y PBS (2 lavados de 5 min), se deshidrataron con pasajes de 30 seg por alcohol 70%, 96%, 100% y xilol, y se montaron con bálsamo de Canadá.

Con el objeto de cuantificar el área marcada, se obtuvieron alrededor de 80 fotografías por muestra a una magnificación de 200X, utilizando un microscopio Nikon E800 asociado a una cámara digital y se obtuvo el valor promedio de área marcada a partir de cada sección utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health).

## **I.11 Ensayo de Western blot**

### **I.11.a Preparación de los extractos de tejido hepático**

Con el objetivo de evaluar la expresión de SPARC en el tejido hepático se sacrificaron animales inyectados con solución salina, AdasSPARC o Ad- $\beta$ gal ( $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>) luego de 10 días del inicio del tratamiento. Se homogeneizaron los hígados con un Polytron (Janke & Kunkel IKA-WERK) en buffer de lisis con inhibidores de proteasas (50 mM Tris-HCl pH7,4, 0,1% Tween-20, 150 mM NaCl, 10  $\mu$ g/ml aprotinina, 5  $\mu$ g/ml peptastina, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 1 mM DMSO y 25  $\mu$ g/ml E64) y se centrifugó dos veces a 10000 x g a 4°C por 20 min. El lisado clarificado se alicuotó y se guardó a -80°C. La cantidad de proteína total se midió por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **I.11.b Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot**

Los extractos se mezclaron con buffer de siembra con  $\beta$ -mercaptoetanol 2% y se sembraron 20  $\mu$ g de proteína total en geles de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que luego se bloqueó con BSA 3% en PBS durante toda la noche. La carga y la transferencia de las proteínas fueron monitoreadas utilizando el colorante Rojo Ponceau. Se lavó 2 veces con PBS-Tween (0,1% Tween-20 en PBS) durante 5 min y se incubó con anticuerpo de conejo policlonal anti-SPARC (diluído 1:500 en PBS-Tween, cedido por el Dr Osvaldo Podhajcer) durante 2 hs. Luego de 3 lavados de 10 min con PBS-0,1% Tween-20 se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (diluído 1:3000 en PBS-Tween; Jackson ImmunoResearch Labs). Las membranas se lavaron 2 veces durante 10 min con PBS-Tween y 2 veces por 5 min con PBS. Las proteínas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) por exposición a las placas de autoradiografía. La intensidad de las bandas se analizó por densitometría utilizando el software Scion Image 1.54 (Scion Corporation).

## **I.12 Determinación de la actividad inflamatoria hepática y de la fibrosis**

Para evaluar el grado de severidad del proceso necroinflamatorio y de la fibrosis se utilizó el índice Knodell (Knodell *et al.*, 1981). Además, la fibrosis hepática se estudió de forma semicuantitativa aplicando el índice de METAVIR (Beaussier *et al.*, 2005). Para ello se utilizaron secciones hepáticas de 5  $\mu$ m teñidas con H&E y tricrómico. La fibrosis también fue evaluada

cuantificando la tinción de rojo Sirio específica para colágeno fibrilar, como se detalló anteriormente. Cada sección fue analizada excluyendo las venas centrolobulillares grandes y los tractos portales mayores a 150  $\mu\text{m}$ . De cada preparado se registraron entre 80 campos con un aumento de 400X. La cuantificación del área positiva para la tinción de rojo sirio se realizó utilizando el software ImageJ 1.33u software (National Institutes of Health). Los resultados se expresan como % de área positiva.

Con el objetivo de estudiar el grado de maduración de las fibras de colágeno los preparados teñidos con rojo sirio se observaron bajo luz de Normarski en un microscopio Olympus BX60 configurado para la observación de luz polarizada, esta técnica permite evaluar la maduración y el grado de empaquetamiento de las fibras de colágeno.

La cantidad de colágeno también se midió en el ensayo de hidroxiprolina (Woessner, 1961). El contenido de hidroxiprolina se cuantificó colorimétricamente a 557 nm a partir de 0,2 gr de hígado y en duplicado. Se realizó una curva estándar para cuantificar. Los resultados se expresan en mg/g de tejido hepático.

### ***I.13 Tinción histoquímica para ácido hialurónico***

Se analizó el nivel de expresión de ácido hialurónico (AH) en tejido hepático por tinción histoquímica utilizando una proteína de unión a AH biotinilada (bHABP, Calbiochem). Los hígados de ratones WT y SPARC *null* tratados fueron embebidos en parafina, seccionados y montados sobre vidrio. En el momento de ser utilizados fueron desparafinados en xilol durante 1 min. Luego, los vidrios se rehidrataron mediante 2 pasajes de 1 min por alcohol 100%, 96% y 70% respectivamente. A continuación se lavaron 2 veces en PBS, y se deshidrataron mediante 2 pasajes de 30 seg por alcohol 70%, 96%, 100%, xilol y luego se rehidrataron con alcohol 100% y 96%. Se bloqueó la peroxidasa endógena mediante incubación con 3% de peróxido de hidrógeno en etanol durante 30 min a TA, y se finalizó la rehidratación con un pasaje de 30 seg en alcohol 96% y 70%. Se lavó 2 veces en PBS durante 5 min, y se trató uno de los cortes con 100 U/ml de Hyaluronidasa (Calbiochem) en PBS a 37°C durante 30 min a modo de control de muestra sin ácido hialurónico. A continuación se bloqueó la avidina endógena utilizando una solución de biotina (Blocking Kit-Vector Laboratories) incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces, y luego se bloqueó la biotina (Blocking Kit-Vector Laboratories) con una solución de avidina. Se lavó 3 veces, y se bloquearon las proteínas con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA en PBS durante 30 min a temperatura

ambiente. Luego se trataron las muestras con 5 µg/ml bHABP en PBS-BSA 1% ON a 4°C. Las muestras se lavaron 3 veces, y se reveló con un conjugado enzimático avidina-peroxidasa (Extravidin-peroxidase, Sigma-Aldrich) diluida 1:100 en PBS, incubando 30 min a TA. Se lavó nuevamente 3 veces en PBS y 2 veces en 0,1 M acetato. El revelado final se realizó en una mezcla de una solución con 0,1% Diaminobenzidina en agua destilada y una solución con sulfato de 5% Amonio-Níquel, 0,08%  $\text{ClNH}_4$  y 0,4% glucosa en 0,2 M acetato de amonio, incubando de 5 a 15 min en oscuridad. Finalmente, los vidrios se lavaron en acetato y PBS, se deshidrataron con pasajes por alcohol 70%, 96%, 100% y xilol, y se montaron con bálsamo de Canadá.

#### ***I.14 Determinación de la producción de TGF- $\beta$ 1 en suero de ratón***

Se realizó el ensayo de ELISA (R&D) sobre muestras de suero de animales tratados durante 10 semanas con TAA, tanto SPARC WT (n=4) como SPARC *null* (n=4). Los procedimientos de medición se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Quantikine ELISA Kit, R&D).

## II PARTE

### II.1 Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas de CEH, CFSC-2G y LX2. En la **Tabla 5** figura el nombre de cada una de ellas, su origen y el medio utilizado para su cultivo. Las células se cultivaron a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo indicado suplementado con 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los reactivos para los cultivos celulares son de GIBCO (Invitrogen), y las placas de cultivo son de Greiner Bio-one y Falcon.

**Tabla 5.** Líneas celulares utilizadas en la II parte

| <i>Línea celular</i> | <i>Origen</i>                   | <i>Medio de crecimiento</i>           |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| CFSC-2G              | CEH de hígado cirrótico de rata | MEM+ aminoácidos esenciales + 10% SFB |
| LX2                  | CEH humanas                     | DMEM + 2-5% SFB                       |

**CFSC-2G:** esta línea celular fue generada por inmortalización espontánea a partir de hígados de ratas Wistar cirróticas (Greenwel *et al.*, 1991). La cirrosis fue inducida por tratamiento con CCl<sub>4</sub> durante 5 semanas. Las células fueron obtenidas por perfusión con colagenasa seguida de un gradiente de Percoll. Luego del clonado por dilución límite se seleccionaron 4 clones diferentes, uno de los cuales fue denominado CFSC-2G. Las células CFSC-2G expresan colágeno tipo I y III, así como también desmina, vimentina, fibronectina, laminina y TGF-β1.

**LX2:** esta línea celular deriva de CEH humanas inmortalizadas de forma espontánea (Xu *et al.*, 2005). Estas células poseen la capacidad de crecer en condiciones de bajo suero. Expresan α-SMA, vimentina, y GFAP, procolágeno alpha I, MMP2, MT1-MMP, TIMP-2, así como el receptor para PDGF y el receptor de leptinas OB-RL. Es decir que poseen un fenotipo que se aproxima al de las CEH activadas.

### II.2 Cultivo primario de células estrelladas hepáticas de rata

Para establecer el cultivo primario de CEH se utilizó una rata macho Sprague-Dawley (400-500 gr). Se siguió el protocolo establecido por el Dr. Friedman (Friedman and Roll, 1987) con algunas modificaciones. Brevemente, luego de anestesiar al animal el hígado fue perfundido con buffer de lavado (*Hanks' Balanced Salt Solution*) por medio de una cánula colocada en la vena

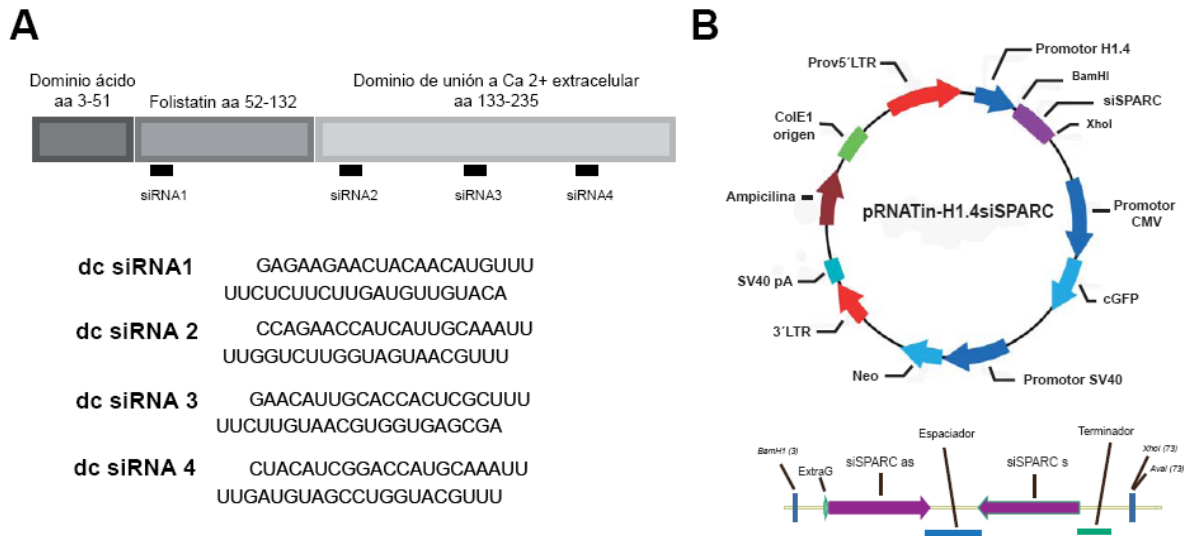
porta, posteriormente se seccionó la vena cava inferior. Cuando se removió toda la sangre del hígado se colocó una cánula por la vena cava superior accediendo a la aurícula derecha del corazón, y se cerró la vena cava inferior de manera de generar un circuito cerrado. Se digirió el hígado *in situ* con pronasa I (Roche) y colagenasa tipo IV (Sigma). La cánula colocada en el corazón permite recuperar la solución colagenasa de forma de poder re-administrarla. Este procedimiento se mantuvo durante 30 min hasta que el hígado cobró la apariencia de haber sido bien digerido. Posteriormente se extrajo el hígado, se filtró la pasta hepática obtenida y se incubó 30min a 37°C en presencia de pronasa y ADNasa tipo I (Roche). Las células hepáticas se colocaron en un gradiente de Nicodenz (Axis-Shield) para lograr separar las diferentes poblaciones celulares. Luego de 25 min de centrifugación a 20.000 rpm se observaron tres bandas claramente diferenciadas: en la parte inferior se depositan los hepatocitos y restos celulares, una banda intermedia rica en células endoteliales y células de Kupffer y una banda superior donde se concentran las CEH. Con una pipeta Pasteur se extrajeron las CEH y se lavaron para eliminar restos celulares. Las células se cultivaron en DMEM/F12 SFB 20%, luego de 24 hs el medio se reemplazó por MEM SFB 10%. Hasta el tercer día las células mantienen un fenotipo quiescente, luego de 7 días en cultivo se activan y adquieren un fenotipo activado. En todos los ensayos se utilizaron CEH luego de 7 días de cultivo.

### **II.3 Transfección con ARN de interferencia**

Con el objetivo de inhibir la expresión de SPARC en la línea celular CFSC-2G y en el cultivo primario de CEH se diseñaron ARN de interferencia (ARNi) específicos adquiridos a la empresa Dharmacon (Chicago, IL, USA). El ARN de interferencia específico para SPARC (siSPARC) está constituido por una mezcla de 4 secuencias diferentes de 20 nucleótidos cada una específicas para SPARC (**Figura 12A**). Como control se utilizó un ARN de interferencia no específico (D-001210-05-05; Dharmacon). Para establecer la eficiencia de transfección se utilizó un ARN de interferencia no específico marcado con FITC (siRNA-FITC) (D-001630-01-05; Dharmacon).

Doce horas previas a la transfección, las células CFSC-2G se cultivaron en medio sin antibióticos. La transfección se realizó con Lipoafectamina 2000 (Invitrogen) en medio sin suero Opti-MEM (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para 200.000 células se utilizó 7,5 µl de lipoafectamina y 375 pmoles de ARN de interferencia. La lipoafectamina se incubó

junto con el ARN durante 20 min a TA en 500 µl de Opti-MEM. Luego se agregó la mezcla de ARN-lipoafectamina a las células cultivadas en un pocillo de p6 con 1 ml de Opti-MEM.



**Figura 12. Diseño de los ARN de interferencia específicos para SPARC.** A) Para inhibir SPARC en la línea CFSC-2G se diseñaron 4 ARN doble cadena (dc) utilizando un software de la empresa Dharmacon, en negro se indica su localización sobre la secuencia de SPARC de rata. La mezcla con los 4 ARN de interferencia (siRNA) fue sintetizada por Dharmacon. B) Esquema del plásmido pRNATinH1.4 (Genscript) modificado que contiene un ARN de interferencia específico para SPARC humano (violeta) clonado entre los sitios BamHI y XhoI.

Después de 4-5 hs se agregó 1 ml por pocillo de medio con SFB 10%. A las 24 hs el medio se reemplazó con medio MEM SFB 2%. La transfección se evaluó luego de 72 hs. Un procedimiento similar se utilizó con el cultivo primario de CEH. Luego de 8 días del aislamiento las células fueron transfectadas, a diferencia del protocolo empleado con la línea celular, las células fueron tratadas sólo por unos segundos con tripsina para eliminar los residuos generados luego de 7 días de cultivo.

Para calcular la eficiencia de transfección, las células transfectadas con siRNA-FITC se observaron en un microscopio de fluorescencia.

En la **Figura 13** se indica el diseño experimental que se llevó a cabo luego de la transfección.

## II.4 Transfección de la línea celular LX2 con plásmidos

Con el objetivo de inhibir la expresión de SPARC en la línea LX2 se utilizó un plásmido, diseñado en el laboratorio del Dr. Podhajcer, que codifica para un ARN de interferencia específico para SPARC humano. Brevemente, se sintetizaron tres oligos específicos para inhibir SPARC con extremos cohesivos con sitios para las enzimas de restricción BamHI y XhoI. Estos oligos fueron clonados en el plásmido pRNATinH1.4 (Genscript), para ello el plásmido se digirió con BamHI y XhoI. Se realizó una ligación con T4 ligasa (Invitrogen) en una relación inserto-vector 3:1. Una vez construido el plásmido se transformaron células competentes (one shot Stbl3, Invitrogen) y se seleccionaron al menos 20 clones. Los mismos se secuenciaron para detectar la presencia del inserto. Los mejores resultados en cuanto a la inhibición de la expresión de SPARC se obtuvieron al utilizar el ARN de interferencia contra la región del mensajero de SPARC constituida entre las bases 52 y 72 (pRNATin-H1.4siSPARC).

Las células LX2 se cultivaron en medio sin antibióticos en placas de 6 pocillos ( $3 \times 10^5$  células/pocillo) de forma tal de obtener una confluencia del 90%. Para la transfección se utilizó Lipoafectamina 2000 (Invitrogen). Se diluyeron 4  $\mu$ l de lipoafectamina en 250  $\mu$ l de Opti-MEM (Invitrogen) y se incubó durante 5 min a TA. Luego se adicionó 4  $\mu$ g de plásmido control, pRNATin-H1.4, o de plásmido que contiene un ARN de interferencia para SPARC, pRNATin-H1.4siSPARC (**Figura 12B**), diluido en 250  $\mu$ l de Opti-MEM. La mezcla se incubó 20 min a TA para permitir la formación de los complejos ADN-lipoafectamina. Finalmente, se agregó la mezcla (500  $\mu$ l) al cultivo de células, luego de mezclar suavemente se incubó a 37°C por 48 o 72 hs según se indique.

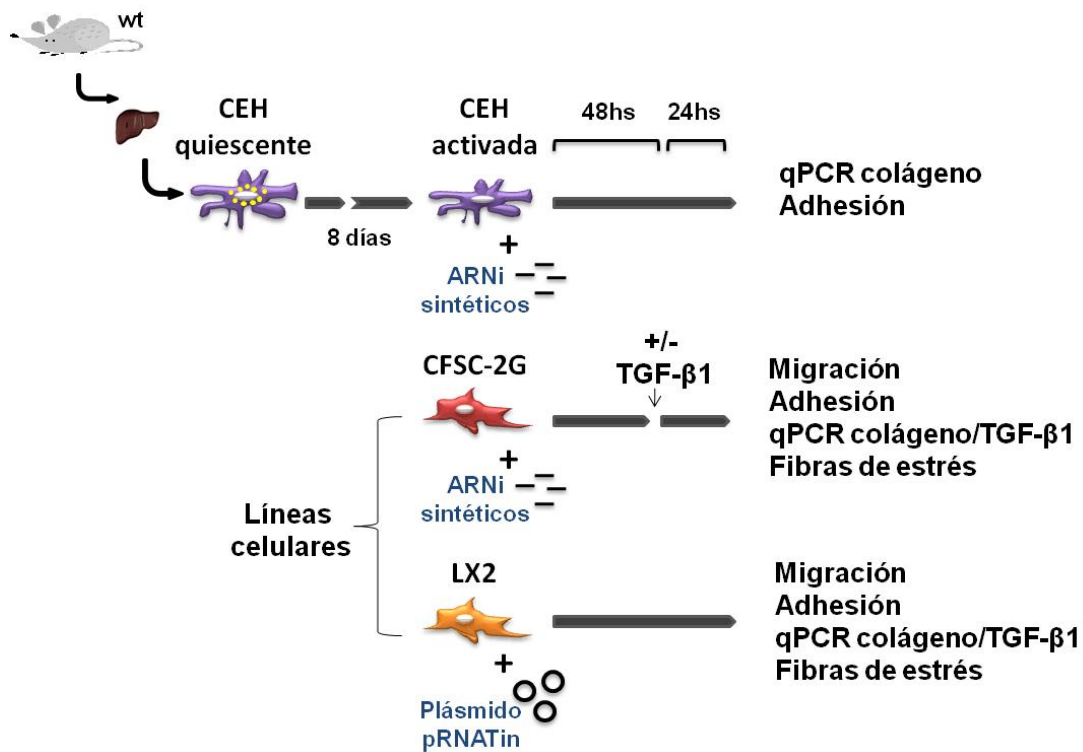
En la **Figura 13** se indica el diseño experimental que se llevó a cabo luego de la transfección.

## II.5 Análisis de la expresión del ARNm por PCR en tiempo real

### II.5.a Extracción del ARN total

Para el análisis de los diferentes genes se extrajo ARN total de las células ( $1 \times 10^6$ ) utilizando TRIzol Reagent® (Invitrogen). La extracción se realizó 48 hs o 72 hs post transfección con siRNA o ADN plasmídico siguiendo las recomendaciones del proveedor. En todos los casos el ARN fue tratado con DNasa I (Invitrogen) previo a la retrotranscripción. En un volumen final de 10  $\mu$ l se

incubaron 2 µg de ARN, buffer y DNasa I (2U). Luego de agregar 0,5 µl de 25 mM EDTA se incubó 15 min a TA. Para inactivar se incubó 15 min a 65°C.



**Figura 13.** Diseño experimental utilizado con cultivos de CEH. Se esquematiza el diseño experimental utilizado con el cultivo primario de CEH, la línea de CEH de rata CFSC-2G y la línea de CEH humana LX2.

### II.5.b Retro transcripción de ARN

Se realizó la transcripción reversa utilizando el kit de SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se realizó una mezcla de 2 µg de ARN, oligo (dT) primers, 1mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP y se calentó 5 min a 65°C. Luego las muestras se enfriaron en hielo y se agregó a la mezcla 2,5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , y 200U de la retrotranscriptasa. Se incubó 1 h a 42°C, luego se trató con ARNasa para eliminar el ARN remanente.

### II.5.c PCR en tiempo real

Se estudió la expresión de diversos genes por qPCR utilizando primers específicos para SPARC, CdhE, CdhN, Mmp13, Adamts8, colágeno tipo I y TGF-β1. Estos genes se amplificaron a

partir del ADN copia de células sin transfectar o transfectadas con los RNAi o plásmidos, según el tipo celular como se explicó anteriormente. En todos los casos se utilizó Taq platinum (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPS, 0,4  $\mu$ M de primers y Sybergreen para realizar la qPCR en un termociclador Stratagene Mx3005p (Stratagene, La Jolla, CA). Se realizó una incubación de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg al T<sub>m</sub> que depende de la composición de bases de los primers (**Tabla 6**) y 60 seg a 72°C; finalmente una extensión de 10 min a 72°C. Al terminar la reacción de PCR se aumentó la temperatura de forma gradual (2°C) desde 60°C hasta 95°C y se midió fluorescencia cada 15 seg de forma de construir una curva de disociación para cada inserto amplificado. El gen para gapdh fue utilizado como control de la carga y amplificación, por lo que todos los valores fueron normalizados según su nivel de expresión. Se aplicó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para el análisis de los datos obtenidos; para cada gen se determinó un índice de cambio respecto de la expresión del gen en las células sin tratar. Todos los ensayos se repitieron dos o tres veces en triplicado.

**Tabla 6:** Secuencia de los primers utilizados

| GEN                            | ORGANISM        | SECUENCIA SENTIDO (5' - 3') | SECUENCIA ANTISENTIDO (5' - 3') | T <sub>m</sub> (°C) |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>sparc</i>                   | Rata            | CCACTCGCTTCTTTGAGACC        | TAGTGGAAGTGGGTGGGGAC            | 56                  |
| <i>sparc</i>                   | Humano          | AAACCGAAGAGGAGGTGGTG        | GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA            | 56                  |
| <i>cdhE</i>                    | Rata            | AGCCAATCCTGATGAAATCG        | CCATACATATCGGCCAGCTT            | 54                  |
| <i>cdhN</i>                    | Rata            | ACCTGGACAAGCAGCTCCAA        | GTTGATGATGAAGATGCCCGTTGGA       | 56                  |
| <i>mmp13</i>                   | Rata            | ACCTGGACAAGCAGCTCCAA        | GAGTGGTCCAGACCGAGGG             | 56                  |
| <i>adamts8</i>                 | Rata            | TCCTGACTGTGTCTGGTGAGGT      | GATGTTGGTGCTTGCTTTTCTT          | 55                  |
| <i>gapdh</i>                   | Rata<br>/humano | CATCTCTGCCCCCTCTGCTG        | GCCTGCTTCACCACCTTCTTG           | 54-56               |
| <i>colágeno tipo I</i>         | Rata            | CCTACATGGACCAACAGACTG       | GGAGGTCTTGGTGGTTTGTGTA          | 56                  |
| <i>colágeno tipo I</i>         | Humano          | CCTACATGGACCAGCAGACTG       | GGAGGTCTTGGTGGTTTGTGTA          | 56                  |
| <i>TGF-<math>\beta</math>1</i> | Rata            | ACCAACTACTGCTTCAGCTC        | TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG            | 54                  |

## II.6 Arreglo para PCR en tiempo real

Con el objetivo de analizar la expresión de un panel de genes en células CFSC-2G transfectadas con siSPARC o con el ARNi control, se utilizó un arreglo para PCR en tiempo real, “RT<sup>2</sup>ProfilerTMPCR array system” (PARN-013, SuperArray Bioscience Corporation, Qiagen) que permite analizar de forma simultánea 84 genes relacionados con interacciones célula-célula y célula-MEC. El arreglo consiste en una placa de 96 pocillos, cada uno de los cuales posee primers

para un determinado gen. Para realizar el arreglo de qPCR se extrajo ARN de células transfectadas con siSPARC o siCtr, se utilizó un pool de ARN de células CFSC-2G que proviene de dos ensayos de transfección diferentes. EL ARN se purificó utilizando RNeasy mini kit (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se trató con ADNasa como se indicó anteriormente. Luego se generó el ADN copia utilizando el kit de retrotranscripción (Invitrogen). Todo el ADN copia generado se mezcló con la RT<sup>2</sup> Real-Time SyBR Green/ROX PCR Mix (dNTPs, buffer, Sybergreen), se alicuotaron 25 µl de la mezcla en cada pocillo de la placa. Para realizar la reacción de qPCR se utilizó un equipo Stratagene Mx3000p (Stratagene, CA), se aplicó un programa de ciclado de dos pasos:

Paso 1: 1 ciclo de 10 min a 95°C

Paso 2: 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C.

En el arreglo se incluyen controles para evaluar contaminación con ADN genómico, para medir el desempeño de la técnica general, para evaluar la calidad del ARN y 5 genes “housekeeping” que fueron utilizados para relativizar los valores obtenidos. Los datos se analizaron aplicando el método de  $\Delta\Delta C_t$ , para cada gen se calculó la diferencia de expresión (factor de variación, *fold change*).

## **II.7 Inmunofluorescencia para SPARC**

Setenta y dos horas post transfección de la línea celular CFSC-2G con el ARN de interferencia, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 min a TA. Para realizar las inmunofluorescencias las células se permeabilizaron con PBS 0,2% tritón X-100 y se bloqueó con suero normal de cabra al 10% por 60 min a TA. Luego de lavarlas se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-SPARC (cedido por el Dr. Podhajcer) diluido en PBS 0,1% tritón (1:250) durante 2 hs a TA. Para detectar el anticuerpo primario se incubó 2 hs a 37°C con un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC (dilución 1:100; Jackson ImmunoResearch). Luego de 3 lavados con PBS las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (E800 Nikon) acoplado a una cámara CCD. Como control se realizó un ensayo sin el anticuerpo primario donde sólo se observa una leve tinción inespecífica.

## II.8 Ensayos de proliferación celular y apoptosis

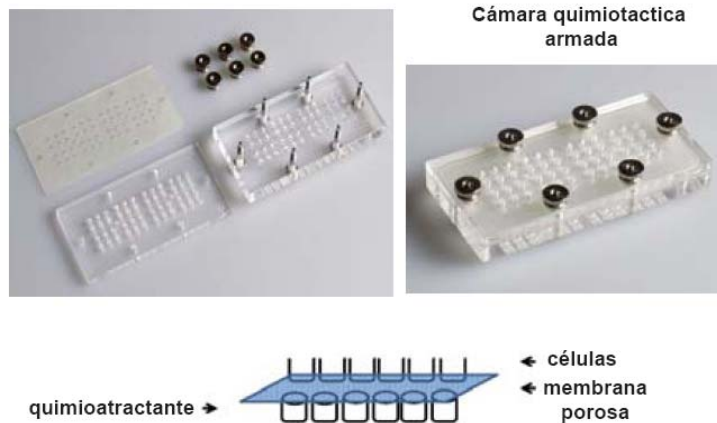
Para estudiar la proliferación las células se cultivaron en placa de 96 pocillos donde fueron transfectadas con las construcciones anteriormente descritas. Luego de 72 hs se reemplazó el sobrenadante por medio sin suero y se incubaron por 18 hs. A continuación se pulsaron con timidina tritiada 1  $\mu\text{Ci/ml}$  (actividad específica 20 Ci/ml; Perkin Elmer) durante 6 hs. Luego se lisaron las células y se midió la incorporación radioactiva utilizando un contador de centelleo (BeckmanLS 6500).

La apoptosis fue analizada por tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio. Setenta y dos horas luego de la transfección las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min, resuspendidas en 30  $\mu\text{l}$  de una solución de 100  $\mu\text{g/ml}$  de naranja de acridina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. Se realizaron al menos dos experimentos independientes, en cada uno se contaron 100 células discriminando entre viables y apoptóticas por sus características distintivas: fragmentación del núcleo, aumento del citoplasma y condensación de cromatina. Apoptosis temprana, núcleo verde donde se observa condensación de la cromatina (áreas verde intenso); apoptosis tardía, núcleo naranja con condensación de la cromatina; necrosis, células naranja donde no se distingue claramente núcleo y citoplasma.

## II.9 Ensayos de migración

Se evaluó la capacidad migratoria de ambas líneas celulares sin transfectar y 72 hs post-transfección con los RNAi o plásmidos hacia diferentes estímulos quimiotractivos en cámaras de microquimiotaxis de Boyden de 48 pocillos (Neuroprobe) (**Figura 14**). Los pocillos inferiores se cargaron con TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) (Peprotech), PDGF-BB (10ng/ml) (Peprotech) o SFB como quimiotractivos, y sobre ellos se colocó una membrana de polycarbonato (membranas Nucleopore, poro de 5  $\mu\text{m}$  o 8  $\mu\text{m}$ , Neuroprobe). Las células cultivadas por 18 hs en medio sin suero se agregaron en los pocillos superiores (50000 células/pocillo). En otro ensayo se estudió la capacidad migratoria de las células CFSC-2G transfectadas con siSPARC al preincubarlas durante 24 hs con 0,1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (Peprotech). La cámara se incubó 4 horas a 37°C para las células CFSC-2G o durante 12 hs para las células LX2. Luego se quitó la membrana y las células en el lado superior de la membrana fueron cuidadosamente removidas por medio de una cuchilla. Aquellas que migraron, en el lado inferior de la membrana se fijaron con formol 2% y se tiñeron con May-

Grünwald/Giemsa. El número de células que migraron se determinó por microscopía, registrándose 10 campos por pocillo y se calculó el número promedio de células por campo. Todos los ensayos fueron repetidos al menos 3 veces.



**Figura 14. Cámara de Boyden modificada.** La cámara consta de varias partes, en el dispositivo inferior se coloca el quimioattractante y en el superior la células. Entre ambas partes se coloca una membrana de policarbonato porosa y una silicona para que el sistema quede bien armado. Las células con capacidad de migrar serán capaces de atravesar los poros y migrar hacia el quimioattractante quedando en la cara inferior de la membrana de policarbonato.

## II.10 Ensayos de adhesión

Para determinar la capacidad de las células para la adhesión se transfectaron ambas líneas de CEH (CFSC-2G y LX2) y el cultivo primario de CEH. Setenta y dos horas después de la transfección se estudió la adhesión a fibronectina. Para esto se sensibilizaron placas de 96 pocillos con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fibronectina (Sigma) en PBS durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon con BSA 1%, se lavó 3 veces con PBS y se sembraron 50.000 células/pocillo en medio con suero, incubando 2 hs a TA. Las células no adheridas fueron removidas y las células adheridas se fijaron con 50  $\mu\text{l}$  de Cristal violeta (cristal violeta 0,5% en metanol 20%). Se incubó 10 min a TA. Se lavó exhaustivamente hasta no observar liberación de color. Luego de agregar 200  $\mu\text{l}$  de ácido acético 10% se leyó a 600nm. El porcentaje específico de adhesión fue calculado mediante la DO a 600nm de las células adheridas a fibronectina menos la DO600nm de las células adheridas al plástico (adhesión inespecífica).

### **II.11 Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ 1**

Para evaluar la producción de TGF- $\beta$ 1 en CEH transfectadas con siSPARC se realizó un ELISA (R&D). Cuarenta y ocho horas post transfección se reemplazó el medio por uno sin suero. Luego de 24 hs los medios condicionados se recolectaron y se centrifugaron a 5000 x g a 4°C por 10 min. Se utilizaron los sobrenadantes para cuantificar la producción de TGF- $\beta$ 1 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pre trataron los medios condicionados con 1M HCl por 15 min a temperatura ambiente y luego se neutralizaron con 1M NaOH. Este procesamiento permite convertir la forma latente de TGF- $\beta$ 1 en la forma activa.

### **II.12 Tinción de faloidina**

Con el objetivo de estudiar la disposición de las fibras de actina del citoesqueleto, las células CFSC-2G y LX2 sin transfectar o transfectadas con las construcciones previamente nombradas se tiñeron con faloidina (Molecular Probe). En primer lugar las células tratadas se cultivaron a baja densidad sobre cubreobjetos cubiertos de polilisina y fibronectina (Sigma) 4 hs a 37°C. Luego se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a TA y se permeabilizaron con 0,1% tritón X-100 en PBS durante 10 min. Las células se lavaron y se incubó con faloidina conjugada a Alexa Fluor 546 durante 2 hs a TA. Los vidrios se montaron en gelatina-glicerol (Sigma). Cuantificando al menos 30 células por condición, se calculó el % de células con un fenotipo migratorio (polarizado) y con presencia de fibras gruesas. Por otro lado se calculó el área positiva para la tinción en células con fenotipo migratorio utilizando el software ImageJ (NIH), se consideran células con este fenotipo aquella con prolongaciones mayores al tamaño del núcleo. Dado que la morfología irregular de las células dificulta el análisis de área positiva se consideraron dos áreas, una perimetral y otra interna, en cada célula analizada. Las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (E800 Nikon) acoplado a una cámara CCD.

### **II.13 Análisis estadísticos**

Los intervalos de confianza (IC) de 95 % se determinaron a través del cálculo de los valores promedios y la varianza de los porcentajes de adhesión y migración celular. Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos con los distintos tratamientos fueron significativas, se

utilizó el Test t de dos colas. El análisis de varianza (ANOVA) también fue utilizado para evaluar los resultados de adhesión y migración. En todos los casos donde los valores no siguieron una distribución normal se utilizaron test no paramétricos como Mann-Whitney. Se empleó el software Prism (Graph Pad) y se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### III PARTE

#### III.1 Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares de hepatocarcinoma (HC) humanas, HepG2, Hep3B y Huh7, gentilmente cedidas por el Dr. Jesús Prieto (Universidad de Navarra, España). La línea celular HepG2 deriva de un hepatocarcinoma obtenido de un individuo masculino de 15 años de edad. La línea celular Hep3B, proviene de un hepatocarcinoma obtenido de un individuo masculino de 8 años. Por último, la línea celular Huh7, establecida por Nakabayashi y Sato (Nakabayashi *et al.*, 1982), se originó a partir un tumor hepático de un individuo japonés masculino de 57 años de edad. En la **tabla 7** figura el nombre de cada una de ellas, su origen y el medio utilizado para su amplificación.

Las células se cultivaron a 37°C en 5 % de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo indicado suplementado con 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los reactivos para los cultivos celulares son de GIBCO (Invitrogen), y las placas de cultivo son de Greiner Bio-one y Falcon.

**Tabla 7**

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen); SFB: suero fetal bovino descomplementado (Natocor).

| <i>Línea celular</i> | <i>origen</i>                 | <i>Medio de crecimiento</i> |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <b>HepG2</b>         | <b>Hepatocarcinoma humano</b> | <b>DMEM + 10% SFB</b>       |
| <b>Hep3B</b>         | <b>Hepatocarcinoma humano</b> | <b>DMEM + 10% SFB</b>       |
| <b>Huh7</b>          | <b>Hepatocarcinoma humano</b> | <b>DMEM + 10% SFB</b>       |

#### III.2 Generación de los vectores adenovirales recombinantes

Para esta parte del trabajo se utilizaron tres vectores adenovirales, uno que contiene la secuencia antisentido para SPARC (AdasSPARC), otro que codifica para el gen reportero  $\beta$ -galactosidasa (Ad- $\beta$ gal) (ver Materiales y Métodos 1.2 *Producción de los vectores adenovirales recombinantes*) y por último un vector que codifica para SPARC humano (AdsSPARC). Este último fue construido por el grupo del Dr. Osvaldo Podhajcer. El fragmento de 1,7 kb que contiene la secuencia sentido de SPARC humana se clonó en el vector pADPSY-LTRSVpolyA para generar el vector adenoviral AdsSPARC (Sosa *et al.*, 2007).

La producción del stock viral y la titulación se realizó según se indica en el apartado de Materiales y Método *I.2 Producción de los vectores adenovirales recombinantes*.

### **III.3 Transducción de las líneas celulares HepG2, Hep3B y Huh7**

Para la transducción de las líneas celulares se utilizaron los vectores adenovirales de primera generación descritos, AdasSPARC, AdsSPARC y Ad- $\beta$ gal. Veinticuatro horas antes se sembraron las células en placas (dependiendo el ensayo se utilizaron p100, p6, p24, p96) de forma de obtener una confluencia del 80 % al momento de realizar la transducción. En todos los casos se utilizó una MOI de 100. Se retiró el medio reemplazándolo por la mínima cantidad de medio DMEM 2% SFB necesario para cubrir las células. Luego se agregaron los  $\mu$ l correspondientes de virus (MOI de 100), se agitaron suavemente las placas cada 20 min durante 2 hs. Cumplido este plazo, se agregó DMEM 2% hasta completar los volúmenes habituales dependiendo del tipo de placa de cultivo.

### **III.4 Inmunofluorescencia para SPARC**

Para observar la expresión y localización de SPARC en las células tumorales se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Cuarenta y ocho horas post transducción, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min a TA. Para realizar las inmunofluorescencias las células se permeabilizaron con PBS 0,2% tritón X-100 y se bloquearon con suero normal de cabra al 1% por 60 min a TA. Luego de lavarlas se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-SPARC humano (AON, cedido por el Dr. Podhajcer) diluido en PBS 0,1% tritón (1:250) durante 2 hs a TA. Para detectar el anticuerpo primario se incubó 2 hs a 37°C con un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC (dilución 1:100; Jackson ImmunoResearch). Luego de 3 lavados con PBS las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (E800; Nikon) acoplado a una cámara CCD. Como control se realizó un ensayo sin el anticuerpo primario donde sólo se observa una leve tinción inespecífica.

### III.5 Generación *in vitro* de esferoides tridimensionales

Se evaluó la capacidad de las líneas celulares, HepG2 y Hep3B, de crecer *in vitro* en esferoides. Esta técnica permite simular, de alguna manera, el crecimiento tumoral *in vitro*. Primero se cubrió cada pocillo de una placa de 96 con 75  $\mu$ l de agarosa 1% en PBS. Las células infectadas con AdasSPARC, AdsSPARC, Ad- $\beta$ gal o sin infectar se sembraron en 150  $\mu$ l de DMEM SFB 2 % en placa de 96 pocillos ( $5 \times 10^3$  células/pocillo). Para obtener un único esferoide por pocillo las placas se agitaron de forma circular durante 1 min en intervalos de 5 min durante media hora. Cada 3 días se reemplazaron 75  $\mu$ l del sobrenadante por medio fresco. Los esferoides se fotografiaron en un microscopio invertido a día 3 y 6. El volumen de los esferoides se calculó midiendo altura y ancho con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). En otro ensayo y para determinar la importancia de la presencia de SPARC en el entorno del esferoide, se sembraron células HepG2 sin infectar con o sin SPARC recombinante (0,5  $\mu$ l/ml). Luego se procedió como ha sido descripto.

### III.6 Ensayo de viabilidad *in vitro*

Para medir la viabilidad celular se trabajó con diferentes líneas celulares (HepG2, Hep3B y Huh7) sin infectar o infectadas con AdasSPARC, AdsSPARC y Ad- $\beta$ gal. Se utilizó un ensayo colorimétrico de MTT (Invitrogen), el MTT se intercala en el ADN. Se colocaron 3000 células por pocillo de microplaca de p96 en 100  $\mu$ l de medio y fueron infectadas como se describe previamente. A diferentes tiempos post infección se reemplazó el medio por 100  $\mu$ l de una solución que contiene 5 mg/ml de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-3-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma). Se incubó 4 hs a 37°C, se solubilizó el colorante y se cuantificó el color midiendo absorbancia a 490 nm. Cada ensayo fue realizado 3 veces en triplicado. Para medir la proliferación de los esferoides los mismos se incubaron con tripsina y luego se siguió con el protocolo como fue descripto.

### III.7 Determinación de la apoptosis *in vitro*

La inducción de apoptosis se analizó tanto en la línea celular HepG2 sin transducir o 72 hs post transducción con AdsSPARC o Ad- $\beta$ gal, como en los esferoides previamente disgregados con tripsina, mediante las siguientes metodologías.

### **III.7.a Morfología por microscopía de fluorescencia**

Los cambios morfológicos asociados con la inducción de apoptosis se analizaron mediante la tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina como se explicó anteriormente (ver apartado Materiales y Métodos II. 8 *Ensayos de proliferación celular y apoptosis*). Las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min, resuspendidas en 30  $\mu$ l de una solución de 100  $\mu$ g/ml de naranja de acridina y 100  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. Se contaron 200 células discriminando entre viables y apoptóticas por sus características distintivas. Se observaron al menos 100 células por tratamiento y se calculó el porcentaje de células apoptóticas. Los resultados tienen en cuenta 4 experimentos independientes.

### **III.7.b Medición de la apoptosis por Anexina V**

Se utilizó el kit para detección de apoptosis por anexina V (BioVision), que se basa en la detección de fosfatidil serina, una molécula que se transloca a la cara externa de la membrana celular cuando comienza el proceso apoptótico. Brevemente, las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron lavadas y resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer *binding* 1X provisto en el kit. Luego se adicionó 2,5  $\mu$ l de Anexina V-FITC y 2,5  $\mu$ l de yoduro de propidio. Se incubó 10 min en oscuridad, se agregaron 150  $\mu$ l de buffer de *binding* y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Los datos adquiridos fueron procesados con el programa WinMDI 2.8 (Scripps Institute).

### **III.8 Análisis del ciclo celular**

Para analizar la etapa del ciclo celular en que se encuentran las células,  $2 \times 10^6$  células HepG2 o Hep3B se lavaron con PBS y se fijaron en etanol frío (etanol 70%, SFB 25% y agua destilada). Luego se centrifugaron y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) (50 mg/ml PI, 180 U/ml de RNasa). El contenido de ADN fue determinado usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

### **III.9 Ensayo de migración**

Para evaluar la capacidad migratoria de la línea HepG2 y Huh7, las células fueron transducidas y luego de 48 hs se realizó el ensayo de migración en cámaras de microquimiotaxis de Boyden de 48 pocillos (Neuroprobe) como se describió anteriormente (ver apartado Materiales y Métodos II. 9 Ensayo de migración). Las células cultivadas por 18 hs en medio con bajo suero (SFB 1%) se agregaron en los pocillos superiores (50.000 células/pocillo). En los pocillos inferiores se agregó TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) como quimiotractante. Entre ambos pocillos se colocó una membrana de polycarbonato (membranas Nucleopore, poro de 8  $\mu$ m, Neuroprobe). La cámara se incubó 16 hs en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. Luego se quitó la membrana, las células en el lado superior de la membrana fueron cuidadosamente removidas. Aquellas que migraron, en el lado inferior de la membrana se fijaron con formol 2 % en PBS y se tiñeron con May-Grünwald/Giemsa. El número de células que migraron se determinó por microscopia, registrándose el total de células migradas por pocillo, con un total de 4 pocillos por condición. Todos los ensayos fueron repetidos al menos 3 veces. Para evaluar la capacidad de adherencia de las células HepG2 infectadas o no a la membrana de polycarbonato, se armó la cámara de quimiotaxis como ha sido descripto y se sembraron las células en el pocillo superior. Luego de 4 hs las células adheridas a la membrana (cara superior, células que aun no han migrado) se fijaron y tiñeron.

### **III.10 Ensayo de formación de colonias**

Para evaluar la capacidad de las células de crecer en colonias, las células HepG2, Hep3B y Huh7 se infectaron con los vectores AdsSPARC, AdasSPARC y Ad- $\beta$ gal o como control no fueron infectadas. Las células ( $1 \times 10^3$ ) células se incubaron en un pocillo de p6 durante 2 semanas y luego se tiñeron con cristal violeta. Las colonias, compuestas por aproximadamente 20-30 células, se observaron en un microscopio de contraste de fases. Los ensayos se repitieron 3 veces y cada condición fue evaluada por triplicado.

### **III.11 Análisis de la expresión de SPARC y caderina por Western blot**

#### **III.11.a Preparación de los extractos proteicos**

Para confirmar la expresión diferencial de SPARC se recolectaron sobrenadantes de las células tumorales transducidas con los vectores adenovirales o sin transducir 72 hs post-

transducción. Veinticuatro horas antes las células se cultivaron en medio sin suero. Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron dos veces a 10.000 x g a 4°C por 20 min para clarificarlos y se precipitaron con 4,5 volúmenes de acetona fría ON a -20°C. Luego de centrifugar a 11.000 x g durante 30 min el precipitado se resuspendió en 30mM NaCl y se analizó por SDS-PAGE. Para estudiar la expresión de caderina E se prepararon extractos proteicos de células HepG2 transducidas con los vectores adenovirales o sin transducir 72 hs post transducción. Las células se recolectaron (sin tripsina), se lavaron y se resuspendieron en buffer de lisis con agregado de inhibidores de proteasas (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7,4; 0,1% Tween-20; 150mM NaCl; 10 µg/ml aprotinina; 5 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF) durante 30 min en hielo. Luego se centrifugaron a 9.000 x.g durante 15 min y se midieron las proteínas totales en sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó por la técnica de Bradford.

### **III.11.b Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot**

Los extractos se mezclaron con buffer de siembra con  $\beta$ -mercaptoetanol 2% y se sembraron en geles de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa luego se bloqueó con BSA 3% en PBS durante toda la noche. Se lavaron 2 veces con TBS-Tween (0,1% Tween-20 en TBS) durante 5 min y se incubaron con anticuerpos específicos para SPARC humano (diluido 1:500, monoclonal anti-SPARC humano, cedido por el Dr. Podhajcer) o caderina E (diluido 1:2000, gentilmente cedido por la Dra. Berasain, Universidad de Navarra) durante toda la noche o durante 2 hs en TBS-1% BSA respectivamente. Luego de 1 lavado de 10 min y 3 lavados de 5 min con PBS-Tween se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa (dilución 1:1000, Vector) durante 1,5 horas en TBS. Las membranas se lavaron 2 veces durante 10 min con PBS-Tween y 2 veces por 5 min con PBS. Las proteínas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) por exposición a las placas de autoradiografía. Las placas fueron fotografiadas y se realizó el análisis densitométrico utilizando el software Scion Image 1.54 (Scion Corporation). Como control de carga del western blot para SPARC se realizó una tinción con rojo Ponceau de la membrana de nitrocelulosa. En el caso del western blot para caderina E la membrana se incubó con un anticuerpo anti-actina (diluído 1:700, Sana Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) que se reveló con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa.

### **III.12 Determinación de la expresión de caderina N por citometría de flujo**

Para evaluar la expresión de caderina N en células HepG2 transducidas o no con los vectores adenovirales, se recolectaron células cultivadas en medio con 2% SFB 48hs y 72hs post-transducción. Las células se despegaron utilizando EDTA 1,25 mM para evitar daño en sus moléculas de membrana. Después de lavar bien se procedió a incubar las células con 2 mg/ml de un anticuerpo anti-caderina N (anti-A-CAM, clon CG-4, Sigma) durante 30 min a 4°C. Finalmente, se lavaron bien las muestras de células para eliminar el anticuerpo sobrante y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a FITC (Jackson Immuno Research). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a TA y posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

### **III.13 Determinación de la expresión de caderina N y $\alpha$ -SMA por inmunohistoquímica**

Para estudiar la expresión de estas proteínas se cultivaron, sobre cubreobjetos cubiertos por polilisina/fibronectina,  $1 \times 10^3$  células HepG2 previamente transducidas o no. Luego de 8 hs de incubación a 37°C las células se fijaron a los vidrios con paraformaldehído 4%. Se permeabilizaron con PBS 0,2% tritón X-100. Sobre las células fijadas se realizó inmunohistoquímica para caderina N y  $\alpha$ -SMA. Las células se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo de ratón anti-caderina N (1:50; Zymed, Sigma) o con un anticuerpo de ratón anti- $\alpha$ -SMA (1:200; Sigma), la marca específica del anticuerpo fue detectada por incubación durante 2hs a TA con un anticuerpo de burro anti-ratón acoplado a biotina (1:100; Vector). Luego se agregó el complejo avidina-peroxidasa. La actividad de la peroxidasa se detectó usando diaminobenzidina (DAB) y níquel. Se cuantificó la intensidad de la tinción considerando únicamente las células pegadas y con morfología normal. Con este propósito se utilizó el software ImageJ y se analizaron al menos 20 células por condición. Se obtuvo una intensidad media por células considerando 5 áreas citoplasmáticas (para la cuantificación de  $\alpha$ -SMA) o 5 áreas de la periferia celular para la tinción con caderina N.

### **III.14 Estudio con animales**

#### **III.14.a Animales empleados**

En el estudio se utilizaron ratones machos BALB/c *nude* (ratones atímicos N:NIH(S)-*nude*) de entre 6 y 8 semanas de edad. Durante el período de experimentación los animales fueron mantenidos en el bioterio de Biofucal (Pilar, Argentina). Los animales fueron alojados en jaulas condicionadas sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 hs de duración a una temperatura y humedad constantes. Recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales que involucran animales vivos se realizaron ajustándose a las normas indicadas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D.C. 1996).

#### **III.14.b Desarrollo de tumores subcutáneos.**

Se eligió un modelo subcutáneo (s.c.) debido su accesibilidad y fácil monitoreo. El tumor se estableció mediante la inoculación directa de células HepG2 o Huh7 en el tejido s.c. de los animales. Se resuspendieron  $1,5 \times 10^6$  células HepG2 o  $5 \times 10^6$  células Huh7 en 100ul de solución salina y se inocularon en la región dorso lateral de ratones *nude*. Cuarenta y ocho horas antes de la inoculación las células fueron transducidas con los vectores adenovirales, AdsSPARC, AdasSPARC y Ad- $\beta$ gal. Se utilizaron 10 animales por grupo. El tamaño tumoral fue monitoreado dos veces por semana mediante la medición de dos diámetros tumorales empleando calibre de precisión. El volumen tumoral fue calculado mediante la multiplicación entre el cuadrado del mayor diámetro (b) y el menor diámetro (a) del tumor ( $V = a \times b^2$ ). Por razones éticas, los animales fueron sacrificados cuando el tamaño del tumor excedía a 1,5 cm en dos diámetros perpendiculares o cuando uno de ellos era mayor de 2cm. La significación estadística entre los diferentes grupos fue estudiada mediante el análisis de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. La supervivencia fue analizada con una curva de Kaplan-Meyer (Test de Log-rank).

### **III.15 Histología y ensayo de inmunohistoquímica para macrófagos.**

Para realizar estos ensayos se sacrificaron animales 5 días luego de la inoculación. Los tumores se extrajeron y se fijaron en formol al 10% y posteriormente se incluyeron en parafina. Se

realizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Los tejidos se desparafinizaron y fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) como se indicó anteriormente (*1.8 Tinciones Histológicas*) para evaluar su morfología. Para estudiar la presencia de macrófagos en los tumores se realizó una inmunohistoquímica para F4/80. Los pasos generales de la inmunohistoquímica fueron descritos previamente (*1.10 Ensayos de inmunohistoquímica*), en particular para la detección de macrófagos se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-F4/80 (dilución 1:100; Serotec). Luego de incubar con un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a biotina (dilución 1:100; Vector) y con el complejo avidina-peroxidasa se reveló con diaminobenzidina y níquel. Tanto el control sin anticuerpo primario como al utilizar un suero no específico no dieron marca positiva. El análisis cuantitativo se realizó con el software Image J a partir de microfotografías con aumento de 400 veces.

### III.16 TUNEL *in vivo*

Con el fin de estudiar la presencia de células apoptóticas en los tumores generados en ratones *nude*, se realizó TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) en muestras de tejido tumoral obtenidas 5 días después de la inoculación. Este ensayo permite la detección de fragmentos de ADN nucleosomal propios del proceso apoptótico. Se utilizó el kit de FragEL™ (Calbiochem) sobre tejido tumoral en parafina siguiendo las instrucciones del proveedor. En resumen, se desparafinizó y rehidrató el tejido; luego se permeabilizó incubando con proteinasa K (2mg/ml) durante 20 min a TA. Después de sucesivos lavados el tejido se embebió en *TdT Equilibration buffer* (provisto en el kit) y se agregaron deoxinucleótidos marcados con fluoresceína junto con la enzima TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa*), que permite transferir los dideoxinucleótidos marcados a los oxhidrilos 3'libres generados en la apoptosis. Luego de 1,5 hs de incubación a 37°C, los preparados se lavaron y montaron en medio de montaje. Las células apoptóticas se observaron en un microscopio de fluorescencia (E800; Nikon) con filtro para fluoresceína (465 – 495 nm) acoplado a una cámara CCD.

## ***RESULTADOS***

## I PARTE

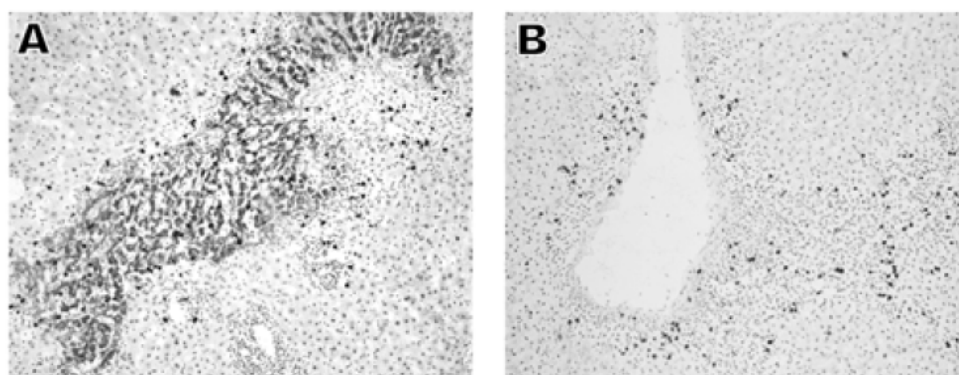
---

Como se mencionó previamente, uno de los objetivos de esta tesis doctoral es estudiar el papel de SPARC en la fibrosis hepática. Teniendo en cuenta que SPARC ha sido implicada en el proceso fibrogénico en otros órganos y la evidencia, aunque limitada, de que SPARC se sobreexpresa en la cirrosis, postulamos que puede ser una proteína con un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática. El modelo de fibrosis inducida por TAA en rata fue el primer modelo utilizado en el trabajo para corroborar nuestra hipótesis. Mediante una colaboración científica entre nuestro laboratorio y el grupo del Dr. Podhajcer (Fundación Instituto Leloir) pudimos adquirir un adenovirus de primera generación tipo 5 que expresa una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC. Como se mostró previamente, los adenovirus son herramientas muy útiles para la transferencia de genes a las células diana tanto *in vivo* como *in vitro* (Hall *et al.*, 2010). Además, poseen una eficiencia de transducción muy alta, es relativamente fácil su producción en títulos altos y, al no integrarse en el genoma del huésped, no existen riesgos de mutagénesis por inserción. Los adenovirus tienen un tropismo hepático muy marcado lo cual los convierte en una herramienta excelente para el tratamiento de ciertas enfermedades hepáticas (Wilson, 2001a; Ilan *et al.*, 1999b; Yu *et al.*, 2002a).

### I.1 Transferencia génica en hígados de ratas

En diversos modelos experimentales se ha demostrado que los vectores basados en adenovirus resultan de utilidad para la transferencia génica. Con el objetivo de estudiar la eficacia de la transferencia génica en el modelo de fibrosis hepática en rata se indujo la fibrosis mediante la administración crónica de TAA. Como se observa en la **Figura 10** (Materiales y métodos) la fibrosis fue generada mediante la administración de TAA 3 veces por semana y, conjuntamente con la primera administración de TAA, se inoculó el adenovirus por vía intravenosa. Luego de 7 días se administró una segunda dosis mediante la inyección intrahepática directa bajo laparotomía. Con el fin de estudiar la eficacia de la transferencia génica en el parénquima hepático un grupo de animales recibió una dosis intravenosa del adenovirus reportero Ad-βgal. Dos días después de la inyección intravenosa (día 2) o 2 días después de la administración intrahepática (día 10) se observó la presencia del gen reportero en el tejido hepático, detectándose la presencia de células transducidas distribuidas en áreas periportales (**Figura 15A**). A día 10, la magnitud de

células que expresan el gen reportero fue menor que a día dos; resultado esperado debido a la respuesta inmunitaria antiviral generada luego de la primera administración de adenovirus (**Figura 15B**). Consideramos que si se hubiera administrado el vector adenoviral de forma intrahepática a tiempos previos, es decir antes del 7 día de la primera administración intravenosa, la respuesta inmunitaria hubiese sido menor y, quizás, la expresión más potente. Sin embargo, se prefirió distanciar ambas dosis con 7 días para lograr una inhibición eficaz de SPARC durante los primeros días del desarrollo de la fibrosis.

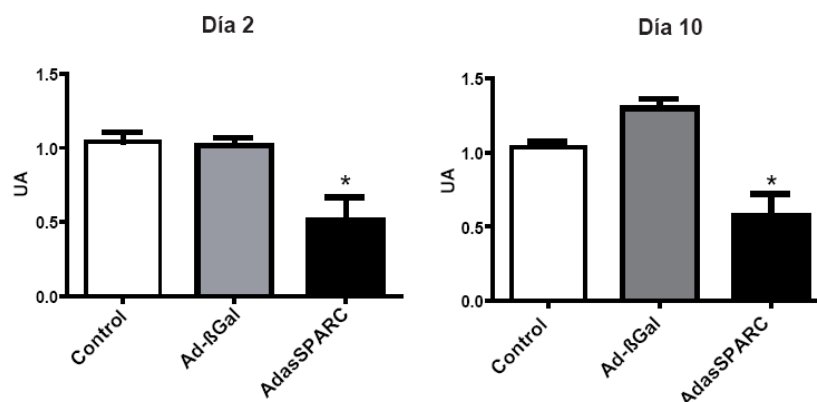


**Figura 15.** Eficiencia de transducción hepática con el adenovirus reportero Ad-βgal. Inmuno-histoquímica para β-galactosidasa. A) 48hs (día 2) luego de la primera administración intravenosa de  $5 \times 10^9$  DICT50 del vector Ad-βgal. B) 48hs luego de la segunda administración intrahepática del vector Ad-βgal (día 10).

## 1.2 Análisis de la expresión hepática del ARN mensajero para SPARC

Para estudiar la eficacia de la inhibición de la expresión de SPARC en los animales tratados con el adenovirus que contiene la secuencia antisentido para el ARNm de SPARC (AdasSPARC) se realizó qPCR, a día 2 y a día 10, en muestras de tejido hepático provenientes de animales tratados con TAA. Como se observa en la **Figura 16** el tratamiento con el vector AdasSPARC redujo significativamente los niveles de ARN mensajero para SPARC 2 días después de la administración intravenosa del vector AdasSPARC ( $50 \pm 15\%$ ) en comparación a los animales inoculados con solución salina (control) o con el vector Ad-βgal. A pesar de la respuesta inmunitaria antiviral que pudo haberse generado (y que no fue medida experimentalmente) se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la inhibición de SPARC; en este sentido, 2 días luego de la administración intrahepática (día 10) la inhibición de la expresión de SPARC fue del  $44 \pm 14\%$ . De esta forma se disminuyó la expresión de SPARC, al menos, durante los primeros 10 días de tratamiento con TAA.

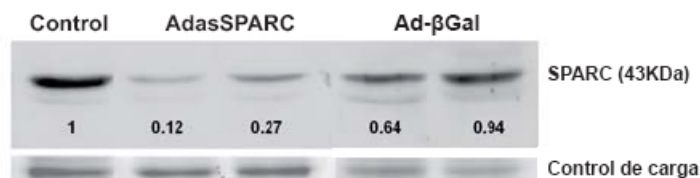
Los efectos observados son específicos del vector AdasSPARC ya que no se observaron cambios significativos al utilizar el vector control Ad- $\beta$ gal.



**Figura 16.** El vector AdasSPARC reduce la expresión del ARN mensajero para SPARC en hígados tratados con tioacetamida. qPCR para SPARC. Se obtuvo ARN total de hígados de animales tratados con solución salina (control), con Ad- $\beta$ gal o AdasSPARC luego de 2 y 10 días del inicio del tratamiento con TAA y de la primera administración de los adenovirus. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias relativos al los animales control (sin administración de adenovirus). \* $p < 0,05$  vs. control

### 1.3 Inhibición de la expresión de SPARC en ratas tratadas con tioacetamida y AdasSPARC

Coincidentemente con los resultados observados a nivel de ARN mensajero, se observó por la técnica de *Western blot* una disminución significativa de la expresión de SPARC en tejido hepático 2 días después de la administración intrahepática del vector AdasSPARC (día 10). Se observó expresión de SPARC tanto en los animales a los que se les administró solución fisiológica como aquellos animales a los cuales se les administró el vector Ad- $\beta$ gal (**Figura 17**). Por el contrario, en los animales tratados con AdasSPARC se observó una reducción significativa de la expresión de SPARC. Estos resultados junto con los estudios previos demuestran que el vector AdasSPARC resulta eficaz para inhibir la expresión de SPARC tanto a nivel del ARNm como a nivel proteico.

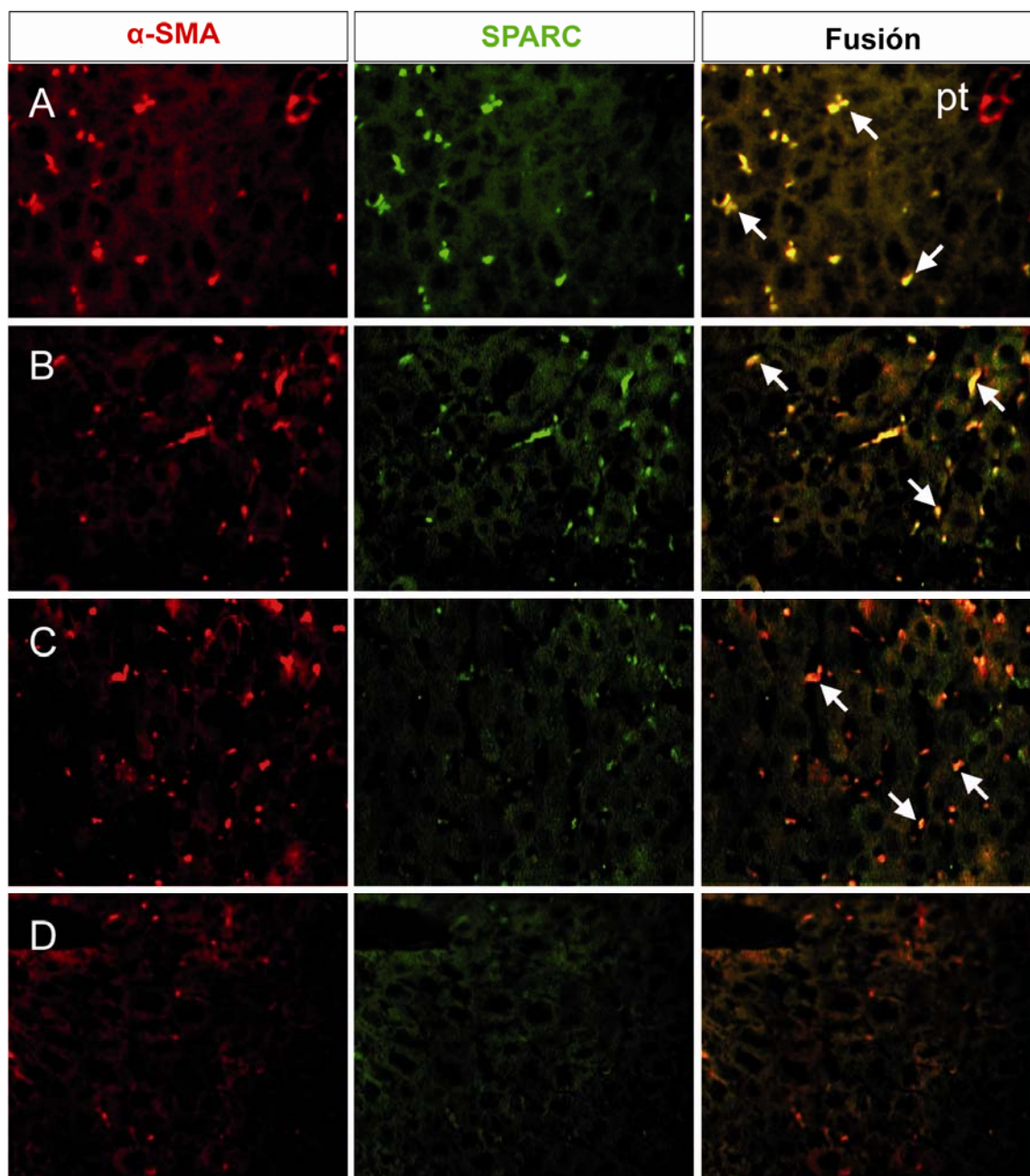


**Figura 17.** El vector AdasSPARC reduce la expresión de SPARC en hígados tratados con tioacetamida. Western blot para SPARC utilizando extracto proteico de tejido hepático. Ratas tratadas con TAA recibieron solución salina (control), AdasSPARC o Ad-βGal a día 0 por vía intravenosa y, a día 7, una segunda administración por vía intrahepática directa. A día 10 se extrajeron los hígados y se analizó la expresión de SPARC. Se muestra un experimento representativo de 3 que arrojaron resultados similares.

Como se comentó en la sección de introducción, se ha descrito aumento de la expresión de SPARC en otros modelos de fibrosis como la fibrosis renal o pulmonar y, en menor medida, en la fibrosis hepática. Con el objetivo de ver el efecto del tratamiento con TAA en la síntesis de SPARC se estudió la expresión de esta proteína por inmunofluorescencia. En nuestro modelo experimental se observó también un aumento sustancial de SPARC por inmunofluorescencia en el parénquima hepático de los animales tratados durante 7 semanas con TAA en comparación con los animales sanos (**Figura 18**). En otras palabras, demostramos que la expresión de SPARC se incrementó en el proceso de fibrosis inducido en ratas. Como se describe luego, un resultado similar se observó en ratones tratados durante 10 semanas con TAA.

Los adenovirus de primera generación, como los utilizados en este trabajo, no se integran al genoma por lo que su expresión es transitoria y no se espera que se expresen mas allá de 7 a 10 días posteriores a su inoculación. Sin embargo, los efectos de la inhibición de SPARC al inicio del tratamiento producen cambios en el progreso de la enfermedad de modo que la expresión de SPARC se encuentra disminuida en comparación con animales tratados con solución salina o Ad-βgal (**Figura 18 C vs A y 17**).

Para estudiar la relación entre SPARC y la activación de las CEH, fundamentales en el desarrollo de la fibrosis, se realizó una inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de SPARC y de α-SMA, un marcador reconocido de activación de CEH. Mediante esta técnica se observó colocalización de SPARC y de α-SMA en la zona perisinusoidal en células con morfología característica de las CEH (**Figura 18**). El número de células positivas para SPARC disminuye en los



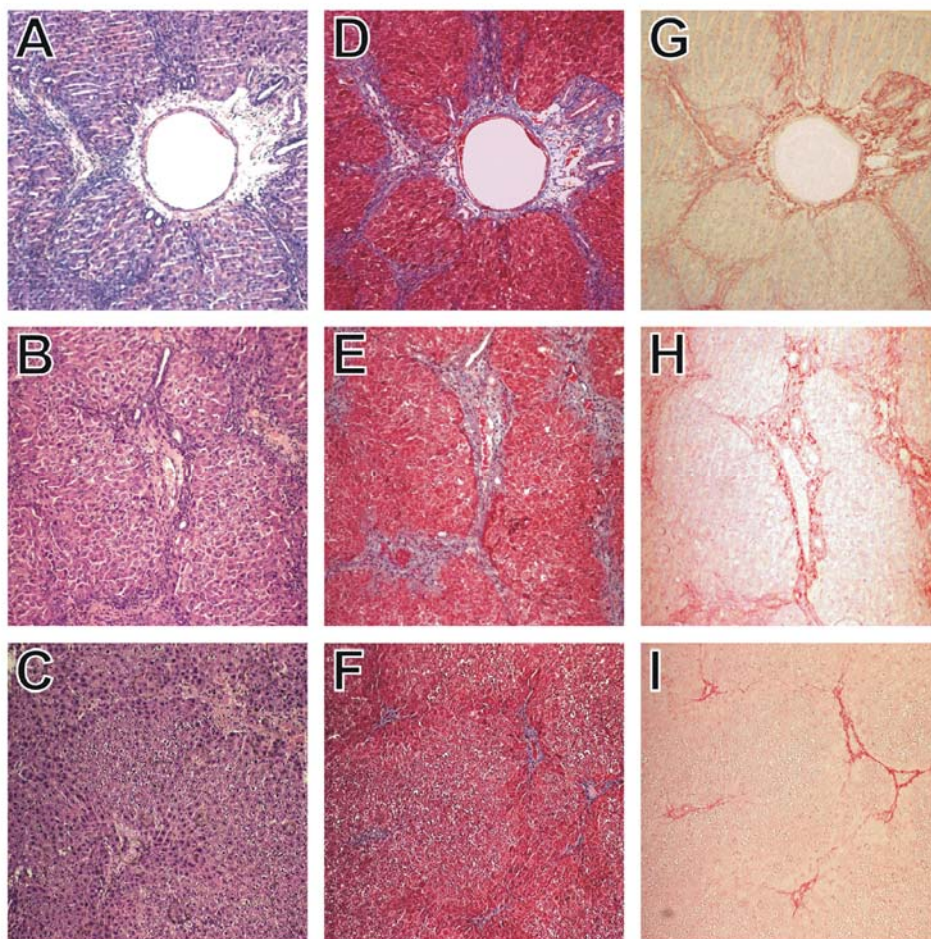
**Figura 18.** El vector AdasSPARC disminuye la expresión de SPARC en CEH activadas. Inmunofluorescencia para SPARC y  $\alpha$ -SMA. Se obtuvo tejido hepático de ratas tratadas con solución salina (A), Ad- $\beta$ Gal (B) o AdasSPARC (C) luego de 7 semanas de administración de TAA. D) Ratas sanas sin fibrosis. Flechas blancas, CEH que expresan SPARC. Pt, espacio porta.

cortes hepáticos provenientes de los animales tratados con el vector AdasSPARC, mientras que, por esta técnica, no se observa reducción del número de células positivas para  $\alpha$ -SMA entre los animales tratados con AdasSPARC y los animales tratados con Ad- $\beta$ gal o inyectados con solución salina. Dado que la inmunofluorescencia no es la técnica más adecuada para el estudio de la expresión  $\alpha$ -SMA, más adelante se muestran los resultados de inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA que permiten estudiar en forma global la expresión de esta proteína en el parénquima hepático.

#### **I.4 La administración del vector AdasSPARC disminuye el grado de fibrosis hepática en ratas.**

Una vez explorada la capacidad del vector AdasSPARC para inhibir la expresión de SPARC a nivel hepático decidimos evaluar el impacto de este efecto en la fibrogénesis inducida por TAA. Con este fin se estudió la expresión y los depósitos de colágeno fibrilar, como producto de la excesiva reparación tisular e indicador del grado de fibrosis, utilizando tinciones de rojo Sirio. Como se esperaba, las ratas que recibieron TAA mostraron un grado severo de fibrosis luego de 7 semanas de administración del tóxico (Metavir F3-F4, **Tabla 8**), caracterizada por una distorsión de la arquitectura hepática general, la presencia de extensos tractos fibrosos de tipo porto-portales y porto-centrales y la presencia de nódulos de regeneración hepática. Por el contrario, los animales tratados con el vector AdasSPARC presentaron una reducción significativa del grado de fibrosis (Metavir F1-2). A su vez, las tinciones con rojo Sirio mostraron una disminución significativa de los depósitos de colágeno fibrilar (**Figura 19**).

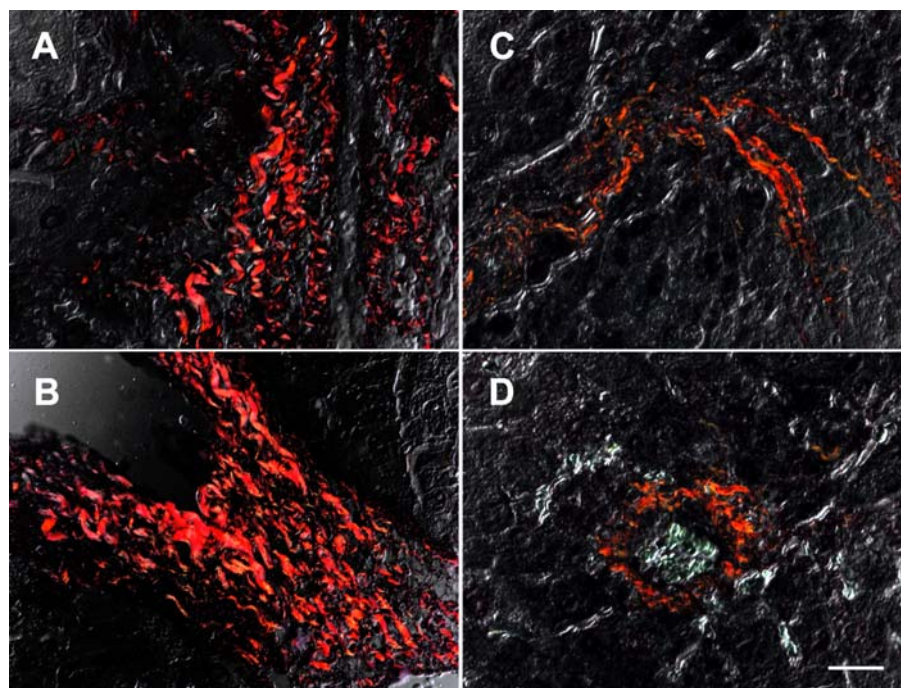
Tanto los animales tratados con el vector Ad- $\beta$ gal como con solución salina no presentaron modificación del grado de fibrosis hepática (Metavir F3-4) (**Tabla 8, Figura 19 A-H**). Este resultado sugiere que la reducción de la fibrosis es consecuencia directa de la administración del vector AdasSPARC.



**Figura 19. La administración del vector AdasSPARC disminuye la severidad de la fibrosis hepática.** Microfotografías representativas de secciones de hígados de ratas tratadas con TAA. Se obtuvieron muestras de animales tratados con solución salina (A-G), con Ad- $\beta$ Gal (B-H) o con AdasSPARC (C-I) luego de 7 semanas y se tiñeron con H&E (A, B, C), tricrómico de Masson (D, E, F) o rojo Sirio (G, H, I). Magnificación original 200X.

Recientemente se ha observado que SPARC es una proteína involucrada en la síntesis de fibras de colágeno. Como fuera desarrollado en la introducción de esta tesis SPARC tiene incidencia directa en la expresión y maduración de las fibras de colágeno. En este sentido, Rentz y colaboradores demostraron que la ausencia de SPARC se acompaña de alteraciones en el ensamblado de las fibras de colágeno (Rentz *et al.*, 2007). Es por ello que decidimos estudiar en nuestro modelo el grado de ensamblado y madurez de las fibras de colágeno entre los diferentes grupos de tratamientos mediante el empleo de microscopia con luz polarizada en las tinciones de

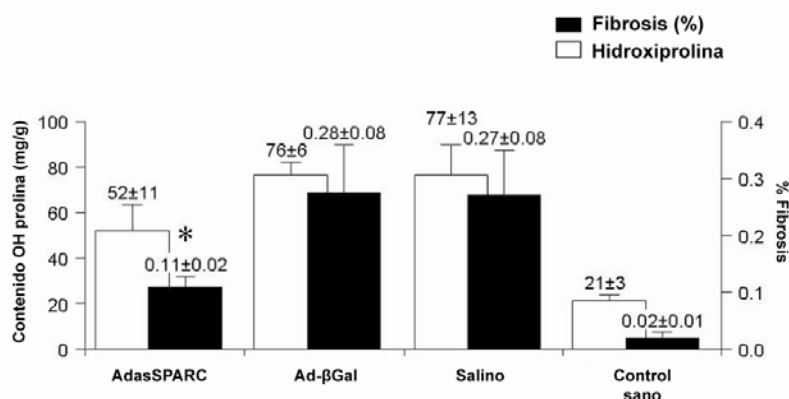
rojo Sirio; esta técnica permite discriminar fibras maduras, con una coloración roja intensa, de las fibras inmaduras con una coloración naranja-amarilla. Las ratas tratadas con el vector AdasSPARC presentaron una menor acumulación de fibras de colágeno con predominio de fibras inmaduras (amarillas), mientras que las ratas tratadas con el vector Ad- $\beta$ gal o que recibieron solución salina mostraron fibras de colágeno de tipo maduras (rojo intenso) (**Figura 20**).



**Figura 20.** La disminución de la expresión hepática de SPARC produce alteraciones en el estado de madurez de las fibras de colágeno. Secciones histológicas de hígados provenientes de ratas tratadas con solución salina (A), Ad- $\beta$ Gal (B) o AdasSPARC (C, D) luego de 7 semanas de recibir TAA se tiñeron con rojo Sirio y se observaron bajo microscopio de luz polarizada. Barra de escala, 25  $\mu$ m. Magnificación original 400X.

Las imágenes presentadas en la **Figura 20** muestran que los cambios en los depósitos de colágeno no solo están relacionados con la maduración sino también con la cantidad de fibras. En este sentido, el porcentaje de áreas hepáticas con fibrosis (depósitos de colágeno) se determinó por análisis de imágenes cuantificando el área positiva para la tinción de rojo Sirio. Los animales tratados con el vector AdasSPARC presentaron menor fibrosis ( $0,11 \pm 0,04\%$ ) en comparación con los animales tratados con el vector Ad- $\beta$ gal o que recibieron solución salina que fue de  $0,27 \pm 0,15\%$  y  $0,28 \pm 0,16\%$ , respectivamente (**Figura 21**).

La cuantificación de hidroxiprolina es otra manera muy extendida para estimar la cantidad de colágeno presente en los hígados. Acorde a los resultados obtenidos, los niveles de hidroxiprolina en hígados de ratas tratadas con el vector Ad- $\beta$ gal o solución salina son mayores en comparación con hígados de animales tratados con el vector AdasSPARC ( $76 \pm 11$  mg/gr,  $76 \pm 26$  mg/gr y  $52 \pm 22$  mg/gr, respetivamente) (**Figura 21**).

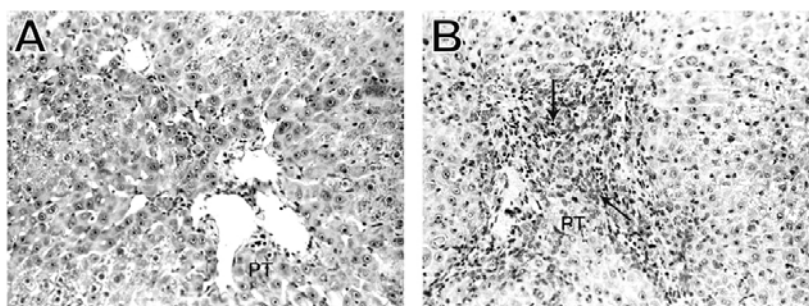


**Figura 21.** El tratamiento con el vector AdasSPARC disminuye la severidad de la fibrosis hepática.

Análisis histomorfológico del grado de fibrosis hepática y cuantificación de hidroxiprolina hepática. El tratamiento preventivo con el vector AdasSPARC reduce significativamente el contenido de colágeno fibrilar hepático determinado por la relación entre contenido de hidroxiprolina (mg) y peso del hígado (gr) (barras blancas). El porcentaje de fibrosis (barras negras) se determinó por un análisis morfométrico computarizado del área positiva para la tinción de rojo Sirio. Se representan los promedios  $\pm$  DS. \* $p < 0,05$  versus Ad- $\beta$ Gal y solución salina.

### 1.5 Disminución de la actividad necroinflamatoria hepática inducida por tioacetamida en ratas tratadas con el vector AdasSPARC

El daño crónico inducido por agentes tóxicos como TAA genera necrosis de los hepatocitos y consecuentemente un aumento del infiltrado inflamatorio en las zonas dañadas; estos eventos conducen, finalmente, y con la exposición crónica a la generación de fibrosis hepática. Para estudiar las características y la magnitud de la necrosis y del infiltrado inflamatorio en hígado se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (H&E). Utilizando esta tinción se determinó el índice necroinflamatorio (índice de Knodell) en cada uno de los grupos experimentales. Las ratas inoculadas con el vector AdasSPARC presentaron una menor actividad necroinflamatoria ( $6,13 \pm 1,81$ ) en comparación con los animales tratados con el vector reportero Ad- $\beta$ gal ( $13,80 \pm 1,64$ ) o que recibieron solución salina ( $12,83 \pm 1,94$ ) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Disminución del infiltrado inflamatorio hepático en ratas tratadas con el vector AdasSPARC. Luego de 7 semanas de tratamiento con TAA se colectaron hígados de ratas tratadas con solución salina, AdasSPARC (A) o Ad-βgal (B), y se tiñeron con H&E. Se observó necrosis hepatocitaria y un intenso infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear (flechas) periportal en animales control. Magnificación original 200X.

**Tabla 8:** Índices de actividad necroinflamatoria y fibrosis

|                                               | Salino (n=6)       | Ad-βgal (n=6)      | AdasSPARC (n=6)          |
|-----------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| Necrosis periportal y periseptal              | 2,67 ± 1,37        | 3,80 ± 0,45        | 1,75 ± 1,39 <sup>a</sup> |
| Degeneración intralobulillar y necrosis focal | 3,17 ± 1,17        | 3,40 ± 1,34        | 2,5 ± 0,93               |
| Inflamación portal                            | 3,67 ± 0,52        | 3,60 ± 0,55        | 1 ± 0 <sup>b</sup>       |
| Fibrosis                                      | 3,33 ± 0,52        | 3 ± 0              | 0,88 ± 0,35 <sup>b</sup> |
| Índice de Knodell                             | 12,83 ± 1,94       | 13,80 ± 1,64       | 6,13 ± 1,81 <sup>b</sup> |
| Índice de Metavir                             | F3 (n=4), F4 (n=2) | F3 (n=4), F4 (n=2) | F1 (n=5), F2 (n=1)       |

<sup>a</sup>p<0,005 vs Ad-βGal, <sup>b</sup>p<0,0001 vs salino y Ad-βGal

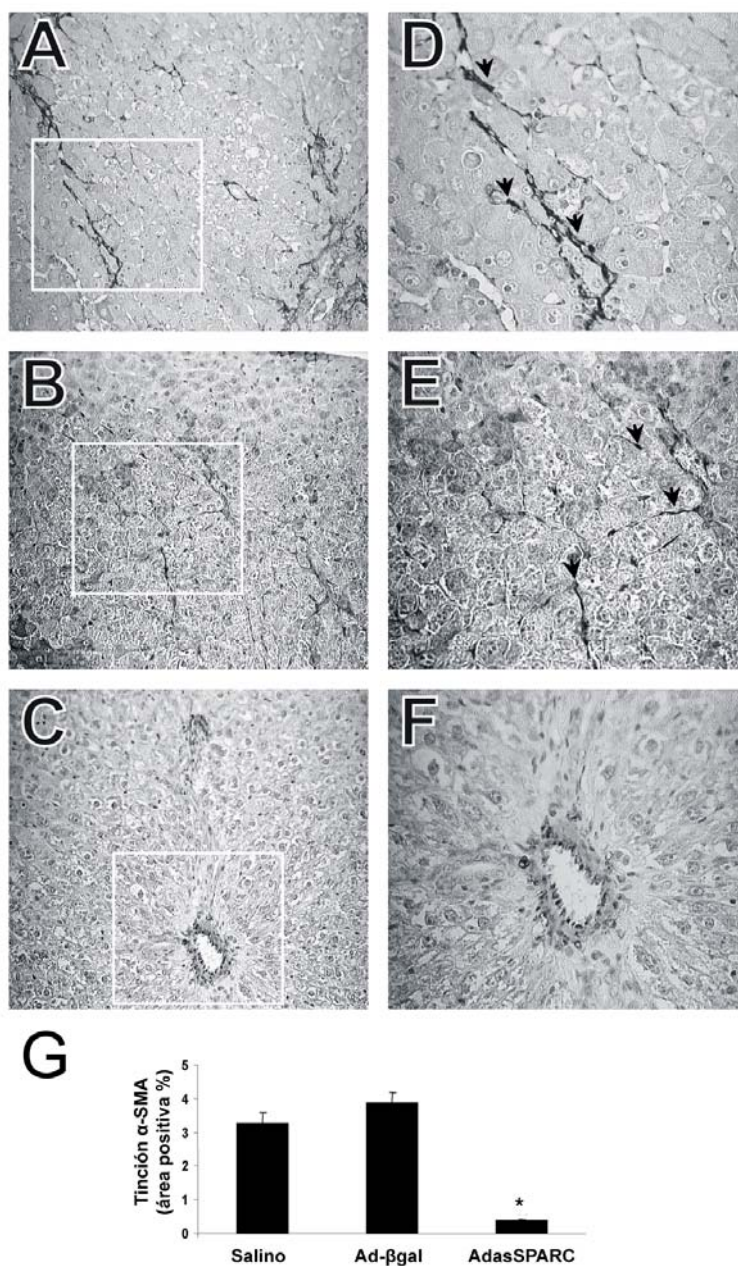
Las ratas tratadas con AdasSPARC también presentaron reducción significativa en la necrosis periportal y en puentes; si bien se observó reducción de la necrosis focal estas diferencias no son significativas estadísticamente (**Tabla 8**). Coincidentemente con los datos de necrosis obtenidos, se observó una significativa disminución en la inflamación periportal luego de la terapia anti-SPARC en comparación con los tratamientos control.

### ***1.6 La inhibición de la expresión de SPARC a nivel hepático se asocia a una reducción del número de células estrelladas hepáticas activadas y miofibroblastos***

En los hígados sometidos a injuria y que desarrollan fibrosis se observa un aumento del número de CEH activadas y de células con aspecto de miofibroblastos, que se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -SMA. Para identificar y cuantificar esta población de CEH activadas en el hígado de los animales incluidos en el estudio, realizamos ensayos de inmunohistoquímica para este marcador luego de 7 semanas de administración de TAA. Los hígados provenientes de ratas tratadas con el vector AdasSPARC presentaron menor cantidad de células  $\alpha$ -SMA positivas en comparación con los animales tratados con el vector Ad- $\beta$ gal o con solución salina (**Figura 23**). Las microfotografías presentadas en la **Figura 23** demostraron tanto en animales tratados con el vector Ad- $\beta$ gal o con solución salina la presencia de células positivas para  $\alpha$ -SMA en sinusoides y en la zona periportal.

Claramente la disminución de CEH activas y miofibroblastos en animales tratados con el vector AdasSPARC contribuye a la reducción del daño. Este resultado coincide con la reducción de la injuria hepática observada en estos animales. Asimismo, con el objetivo de estudiar en todo el parénquima la presencia de células positivas para  $\alpha$ -SMA se estudió el porcentaje de área positiva para la tinción en distintas regiones hepáticas. Se observaron diferencias significativas entre los animales tratados con AdasSPARC y los animales tratados con Ad- $\beta$ gal o con solución salina ( $0,37 \pm 0,05\%$  vs.  $3,2 \pm 0,3\%$  y  $3,85 \pm 0,31\%$ , respectivamente) (**Figura 23G**).

Estos resultados sugieren que, uno de los mecanismos por los cuales la inhibición de la expresión de SPARC *in vivo* atenúa la fibrosis hepática inducida por TAA, es la reducción del número de CEH activadas y miofibroblastos.

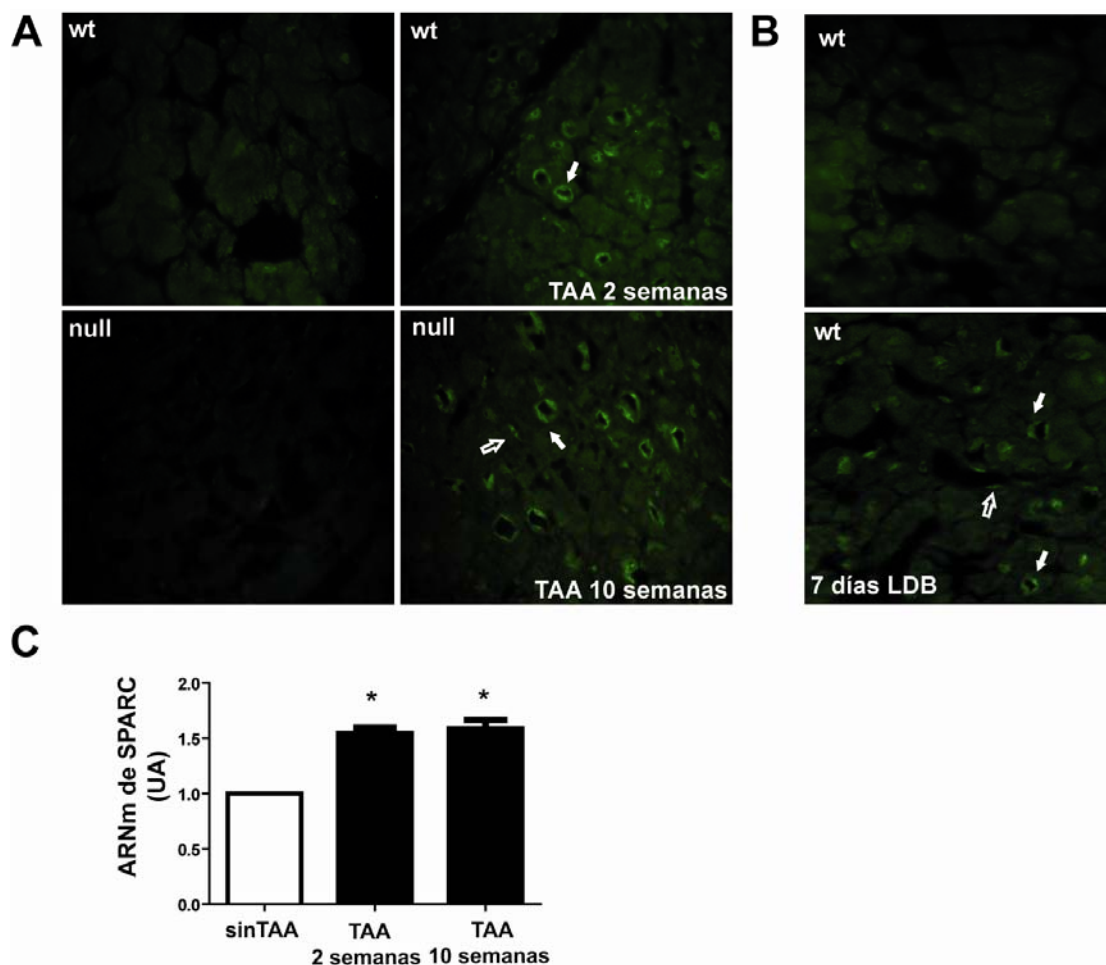


**Figura 23.** El tratamiento con el vector AdasSPARC disminuye el número de CEH activadas. Inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA en tejido hepático proveniente de ratas tratadas con TAA. Se extrajeron muestras hepáticas luego de 7 semanas de tratamiento: ratas tratadas con solución salina (A,D), con Ad- $\beta$ gal (B,E) o con AdasSPARC (C,F). Magnificación 200X (A,B,C), 400X (D,E,F). Las flechas indican células positivas para  $\alpha$ -SMA. (G) Análisis morfométrico del área positiva para la tinción de  $\alpha$ -SMA (%) en secciones hepáticas de semana 7. (\*)  $p < 0,001$  vs animales tratados con solución salina y Ad- $\beta$ gal.

### 1.7 El desarrollo de fibrosis induce la expresión de SPARC en ratones

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que SPARC participa del proceso de fibrogénesis hepática y que su inhibición, en un modelo preventivo, tiene efectos beneficiosos obteniéndose una reducción significativa del grado de fibrosis. Con el objetivo de confirmar estos primeros resultados en un modelo más controlado y teniendo la posibilidad de adquirir ratones “*knock-out*” para SPARC (de ahora en más SPARC *null*) comercializados por Jackson Laboratories, decidimos emplear la cepa de ratones SPARC *null* en estudios de desarrollo de fibrosis experimental. En estos animales se indujo fibrosis por dos mecanismos: administración crónica de TAA y ligadura del conducto colédoco (ver **Figura 11**, sección Materiales y Métodos). En ambos casos el desarrollo de la fibrosis hepática produce una inducción en la expresión de SPARC (**Figura 24**). En los ratones que recibieron TAA el aumento de SPARC comienza en las primeras semanas de tratamiento, aún cuando la fibrosis no se encuentra establecida. En este sentido, tanto la inmunofluorescencia para SPARC como la PCR semicuantitativa indican que luego de 2 semanas de tratamiento hay un aumento de los niveles de SPARC (factor de variación:  $1,55 \pm 0,09$ ) y esta expresión aumentada se mantiene luego de 10 semanas de tratamiento ( $1,59 \pm 0,15$ ) (ya con una fibrosis establecida). En el modelo de fibrosis por ligadura del colédoco también se observa por inmunofluorescencia un aumento de la expresión de SPARC. Recordemos que la ligadura del conducto colédoco se realiza por una intervención quirúrgica que conduce a la ausencia de flujo biliar extra-hepático con la consiguiente acumulación de bilis, especialmente de ácidos biliares, que genera un severo daño hepático que conduce a la fibrosis (cirrosis biliar secundaria). La magnitud del daño es tan importante que la supervivencia de estos animales es corta tras la ligadura por lo que el efecto fue evaluado 7 días después del procedimiento y no se sacrificaron animales a tiempos más prolongados. En este modelo la inducción de SPARC se observa a 7 días aun cuando la fibrosis no se encuentra totalmente desarrollada.

Los resultados obtenidos en ratas, presentados en la **Figura 18**, demuestran que SPARC se expresa en células  $\alpha$ -SMA positivas como lo son las CEH. En ratón no se pudieron realizar ensayo de colocalización para comprobar qué células expresan SPARC ya que no contamos con anticuerpos adecuados. Sin embargo, el aspecto morfológico de las células que expresan SPARC se parece fenotípicamente tanto a las CEH y como a las células endoteliales (**Figura 24**; flechas vacías y rellenas, respectivamente). El patrón de localización es similar en ratones donde se administró TAA o ratones con ligadura del conducto colédoco.



**Figura 24.** Inducción de la expresión de SPARC durante el desarrollo de la fibrosis. A) Inmunofluorescencia para SPARC en ratones sanos (WT) o SPARC *null* luego de 2 y 10 semanas de inducción de fibrosis con TAA. B) Inmunofluorescencia para SPARC en ratones con ligadura del conducto colédoco (LDB). Las flechas rellenas señalan células con fenotipo endotelial, mientras que las vacías indican CEH. C) PCR semicuantitativa para SPARC en muestras de tejido hepático provenientes de ratones sanos o tratados con TAA.

### 1.8 Los animales SPARC null presentan un menor grado de fibrosis y actividad necroinflamatoria

Una vez alcanzados estos resultados nos propusimos estudiar el desarrollo de la fibrosis en un modelo con ausencia total de SPARC. Con este objetivo se estableció el modelo de fibrosis en ratones SPARC *null*; para ello, animales SPARC *null* y de la cepa salvaje (WT) recibieron TAA durante 10 semanas. Los ratones SPARC *null* soportaron el tratamiento con TAA de la misma forma que los ratones WT, no observándose cambios en la supervivencia entre ambos grupos.

Como esperábamos, los animales WT presentaron una importante distorsión de la arquitectura hepática, extensos tractos fibróticos porto-portales y porto-centrales, y la presencia de nódulos de regeneración. El contenido de colágeno aumentó luego de 10 semanas de tratamiento (**Figura 26**) y, por el contrario, los ratones SPARC *null* presentaron protección contra los efectos tóxicos de la TAA.

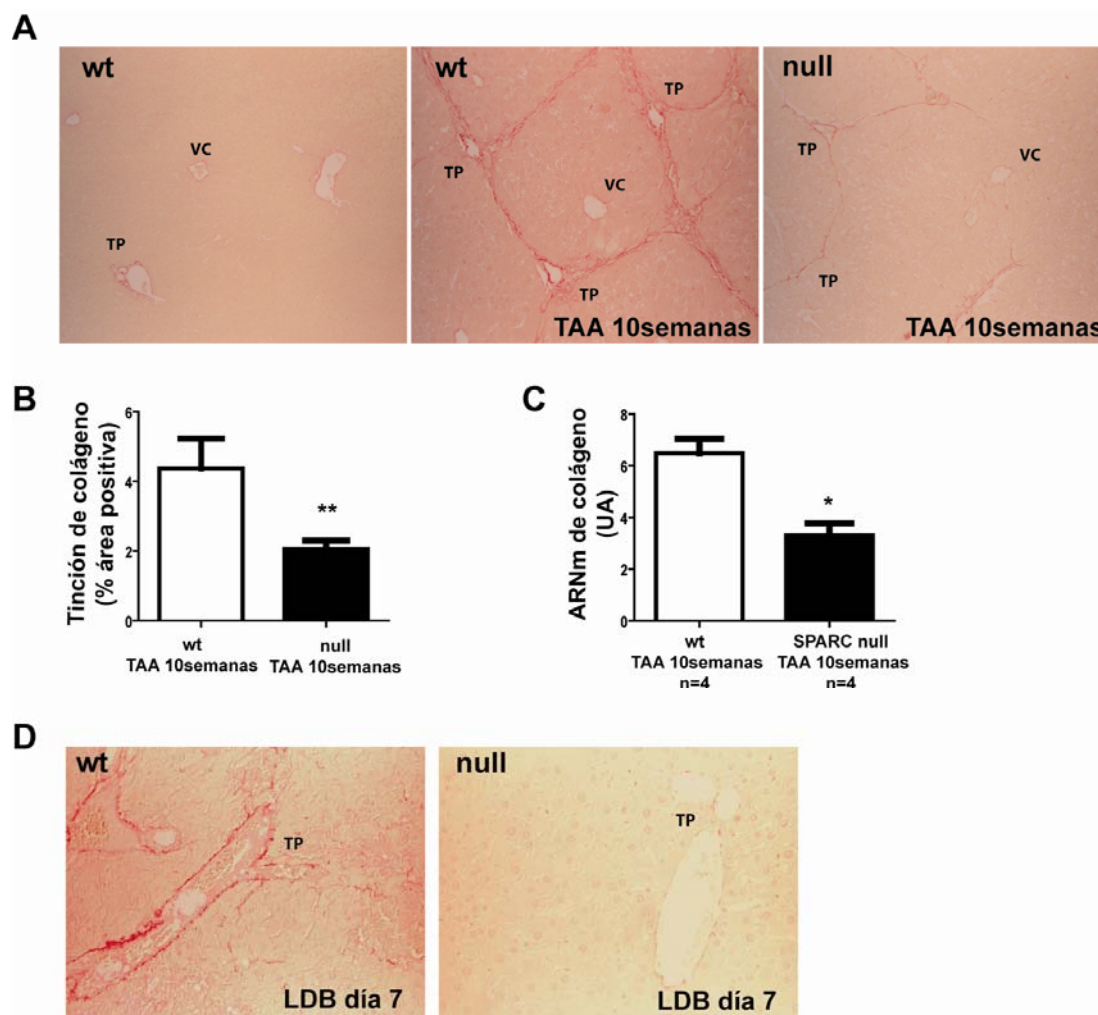
Como se observa en la tinción con rojo Sirio los ratones SPARC *null* mostraron disminución en el número y grosor de los puentes de colágeno si se los compara con los animales pertenecientes al grupo WT (**Figura 25**). A su vez, como se observa en las microfotografías presentadas, los animales WT presentaron extensos tractos fibróticos porto-portales mientras que los animales SPARC *null* mostraron septos fibrosos incompletos (tractos que no abarcan la zona comprendida entre dos espacios vasculares). El análisis morfométrico del área positiva para la tinción de rojo Sirio, o área de fibrosis, es significativamente menor en los animales SPARC *null* ( $2,06 \pm 0,23$ ) en comparación a los animales del grupo WT ( $4,37 \pm 0,85$ ) (**Figura 25B**).

El aumento de la expresión de colágeno no solo fue explorado por tinciones histológicas sino que estudiamos la expresión del gen de colágeno por qPCR en tejido hepático. Los resultados también indican una reducción significativa del niveles de ARN mensajero para colágeno ( $6,48 \pm 0,95$  veces vs  $3,31 \pm 0,64$  veces en ratones salvajes y SPARC *null*, respectivamente) (**Figura 25C**).

Coincidentemente se observaron resultados similares en los animales donde la fibrosis se generó por ligadura del conducto colédoco. Como se comentó previamente, el daño ocasionado por la ligadura produce un patrón diferente de fibrosis, predominantemente periportal y sinusoidal. Como se observa en la **Figura 25D** los ratones WT a 7 días de la ligadura del conducto colédoco presentaron extensos depósitos de colágeno en la región periportal mientras que la presencia de colágeno fibrilar en los ratones SPARC *null* se encontró claramente disminuida. Todo lo expuesto indica que la ausencia de SPARC resulta clave para la síntesis y producción de colágeno en los modelos animales estudiados en esta tesis doctoral.

La actividad necroinflamatoria y la presencia de depósitos de colágeno también fueron evaluadas mediante tinciones histológicas (H&E y tricrómico). En las microfotografías de la **Figura 26** se muestran diferencias en la actividad necroinflamatoria (H&E) y en la presencia de depósitos de colágeno (tricrómico). Siguiendo los criterios del índice de Knodell se cuantificó la actividad necroinflamatoria y la fibrosis de estos animales. Si bien en ambos grupos se observó actividad

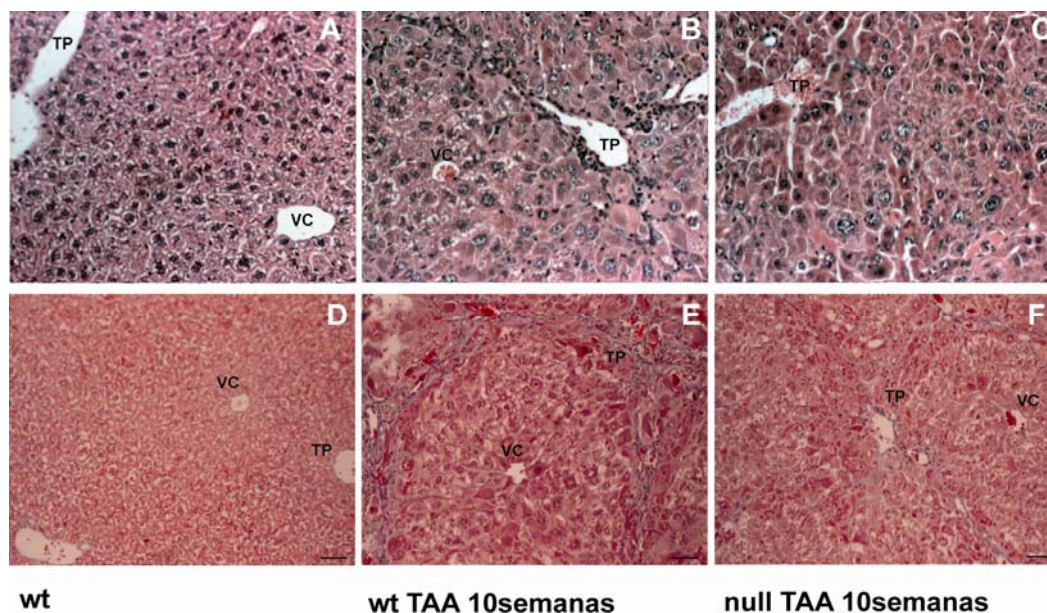
necroinflamatoria, los animales SPARC *null* mostraron una disminución significativa en la necrosis periportal y periseptal ( $2,7 \pm 0,5$  vs.  $1,3 \pm 1,03$  en ratones WT o SPARC *null* respectivamente), en la



**Figura 25.** La ausencia de SPARC se asocia a una disminución significativa de la acumulación de fibras de colágeno. A) Microfotografías representativas de secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio de un animal sin daño o WT y de ratones *null* tratados con TAA. B) Análisis morfométrico de la tinción con rojo Sirio; porcentaje de área positiva para la tinción. Media  $\pm$  DS. \*\* $p < 0,01$ . C) PCR cuantitativa en tiempo real para colágeno de tejido hepático. Los valores están relativizados a las muestras de animales WT. UA, unidades arbitrarias. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney. D) Microfotografías representativas de secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio de un animal wt o SPARC *null* 7 días luego de la ligadura del conducto colédoco (LDB). TP, tracto portal; VC, vena central.

necrosis focal ( $2,5 \pm 0,57$  vs.  $1,16 \pm 0,98$  en ratones WT y SPARC *null* respectivamente) y menor inflamación portal ( $3,7 \pm 0,5$  vs.  $2,5 \pm 0,54$  en ratones WT y SPARC *null* respectivamente). El grado de

fibrosis también fue significativamente diferente en ambos grupos ( $4 \pm 1,4$  vs.  $2,3 \pm 0,51$  en ratones WT y SPARC *null* respectivamente) (**Tabla 9**). Los animales WT que recibieron TAA mostraron una marcada actividad necroinflamatoria en comparación con los ratones SPARC *null* (índice de Knodell:  $13,25 \pm 1,25$  vs.  $7,33 \pm 1,56$ ,  $p < 0,05$  para ratones WT y SPARC *null*, respectivamente).



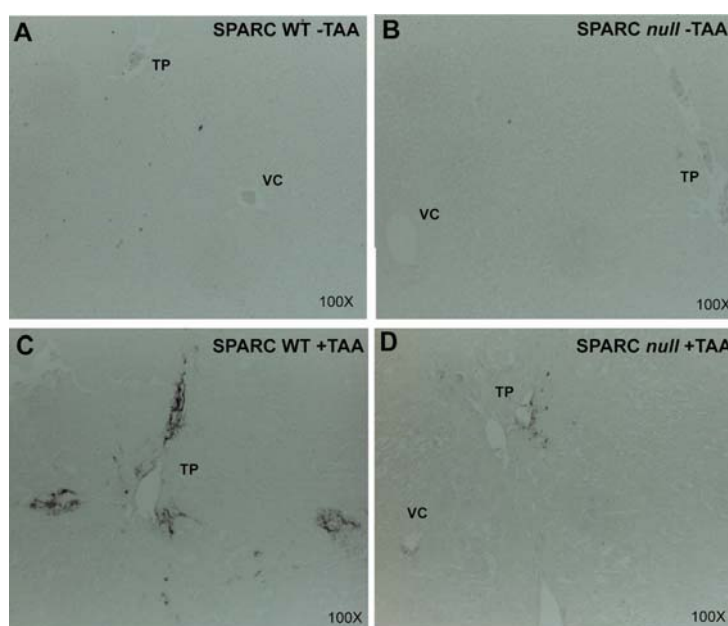
**Figure 26.** Los animales SPARC *null* desarrollaron una menor actividad necroinflamatoria y un menor grado de fibrosis hepática tras la injuria crónica con tioacetamida. A-F) Microfotografías representativas de secciones hepáticas que muestran los cambios histológicos observados en ratones WT tratados con TAA y en ratones SPARC *null* con el mismo tratamiento. Panel superior, tinción de H&E de un animal WT (A), WT tratado durante 10 semanas con TAA (B) o un ratón *null* tratado por 10 semanas con TAA. Panel inferior, tinción tricrómica de Masson de un animal WT (D), WT tratado con TAA (E) o *null* tratado con TAA (F). PT, tracto portal. VC, vena central.

**Tabla 9:** Índices de actividad necroinflamatoria y fibrosis en ratones SPARC *null* y WT que recibieron TAA

|                                               | WT 10 semanas TAA | <i>null</i> 10 semanas TAA |
|-----------------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Necrosis periportal y periseptal              | $2,7 \pm 0,5$     | $1,3 \pm 0,4$ *            |
| Degeneración intralobulillar y necrosis focal | $2,5 \pm 0,57$    | $1,16 \pm 0,98$ *          |
| Inflamación portal                            | $3,7 \pm 0,5$     | $2,5 \pm 0,54$ *           |
| Fibrosis                                      | $4 \pm 1,4$       | $2,3 \pm 0,51$ *           |
| Índice de Knodell                             | $13,25 \pm 1,25$  | $7,33 \pm 1,5$ *           |

\*  $p < 0,005$ . Test de Mann-Whitney

El ácido hialurónico (AH) es un glucosaminoglicano sintetizado por células productoras de MEC, entre ellas las CEH (Guha *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que puede ser un marcador no invasivo de fibrosis hepática, pudiendo ser medido en suero (Hartley *et al.*, 2006). Como otra forma de profundizar en el estudio de los cambios que acontecen durante el desarrollo de la fibrosis en animales en los que se modula la expresión de SPARC, estudiamos la presencia de AH por una tinción histoquímica en tejido hepático de ratones WT o SPARC *null* tratados con TAA. La **Figura 27** muestra que los ratones SPARC *null* presentan reducción en los depósitos de AH en comparación con los animales WT. Nuevamente, estos resultados comprueban que los ratones SPARC *null* presentan resistencia al daño inducido por TAA con un menor depósito de componentes de la MEC, en este caso de AH.

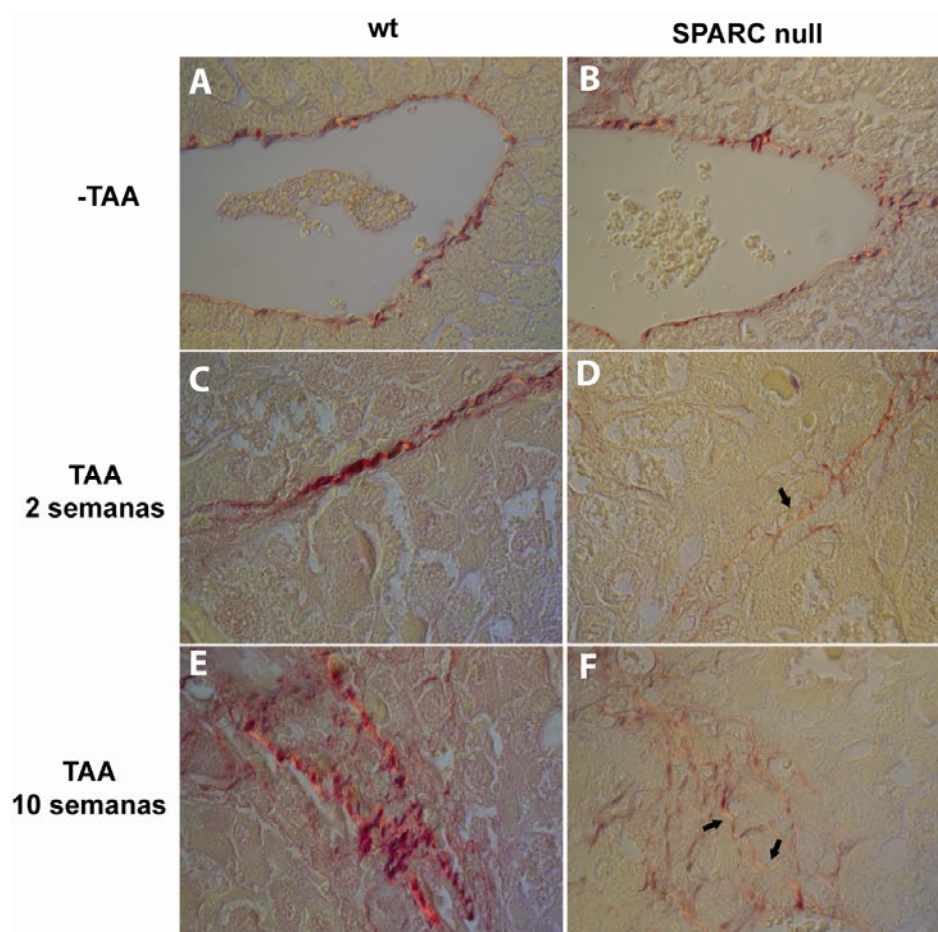


**Figura 27.** Disminución de los depósitos de ácido hialurónico en animales SPARC *null* tratados con tioacetamida. Histoquímica para ácido hialurónico en ratones sanos (-TAA), WT (A) y *null* (B), y tratados durante 10 semanas con TAA, WT (C) y *null* (D). Aumento 100X. TP, tracto portal; VC, vena central.

### I.9 La ausencia de SPARC se asocia a un cambio en las características de los depósitos de colágeno tras la administración crónica de tioacetamida

Como ya hemos mencionado, SPARC está estrechamente relacionada no solo con la síntesis sino también con la maduración de las fibras de colágeno. Dado los resultados obtenidos en los experimentos con ratas decidimos confirmar estos hallazgos en ratones SPARC *null* que

recibieron TAA de manera crónica. Para este fin, los tejidos teñidos con rojo Sirio se observaron bajo microscopio con luz polarizada. Pudimos observar que los ratones SPARC *null* mostraron fibras más inmaduras (tinción anaranjada), mientras que los animales WT presentaron fibras de colágeno gruesas y maduras (tinción roja) (**Figura 28**).

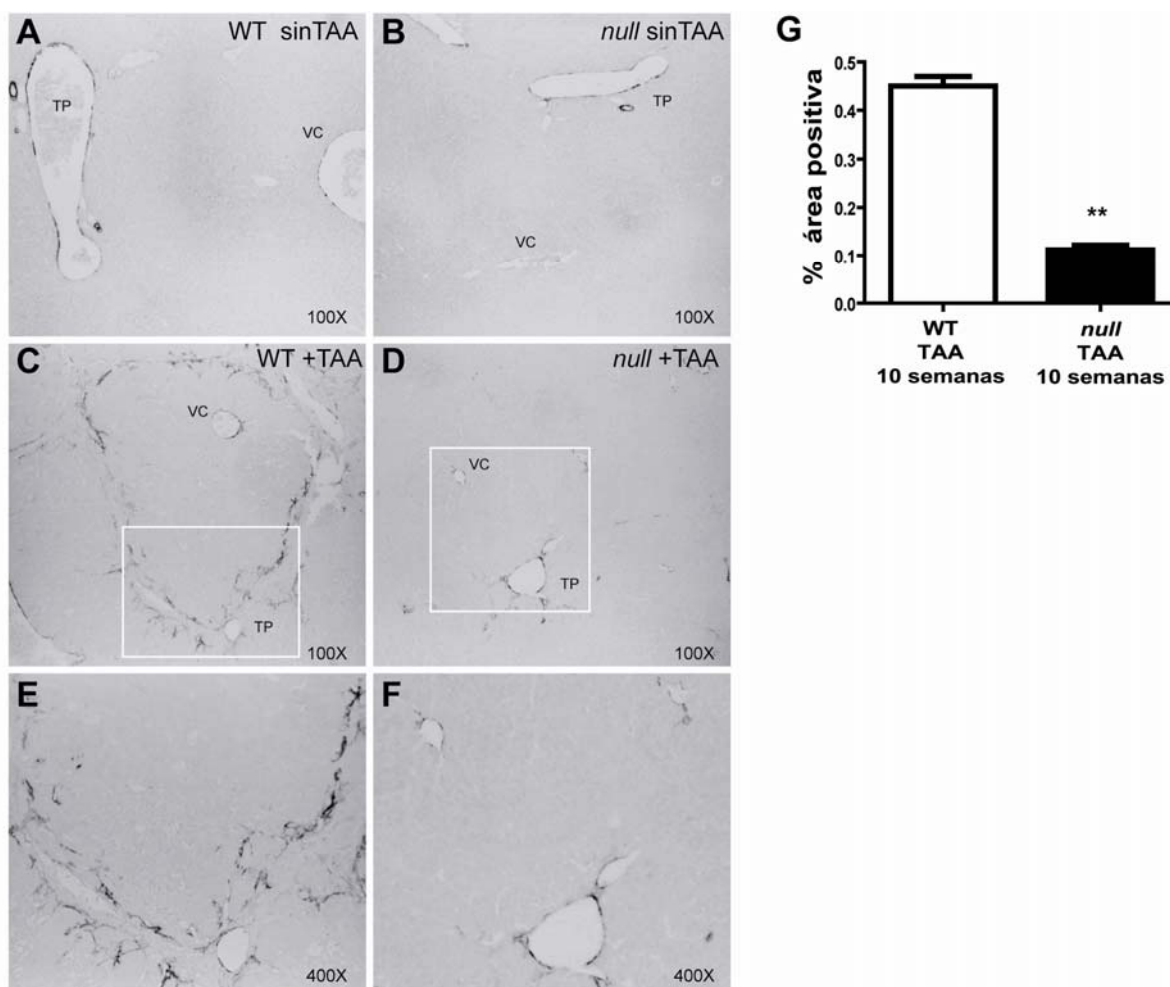


**Figura 28.** Los animales SPARC *null* presentan fibras de colágeno finas e inmaduras. Tinción de rojo Sirio visualizada bajo microscopio de luz polarizada de secciones hepáticas de animales sin tratar (A-B) o WT y *null* tratados con TAA por 2 (C-D) o 10 semanas (E-F). Los ratones WT tratados con TAA presentan fibras maduras y compactas (en rojo) mientras que los animales SPARC *null* se caracterizan por presentar menor cantidad de fibras y de características inmaduras (en amarillo, flecha negra).

#### ***1.10 Menor activación de células estrelladas hepáticas y miofibroblastos en ratones SPARC null***

Uno de los resultados más relevantes obtenidos en esta parte del trabajo es la disminución del número de CEH (células protagonistas para el desarrollo de la fibrosis hepática) obtenida al tratar las ratas con el vector AdasSPARC en el modelo de prevención de la fibrosis. Con el objetivo

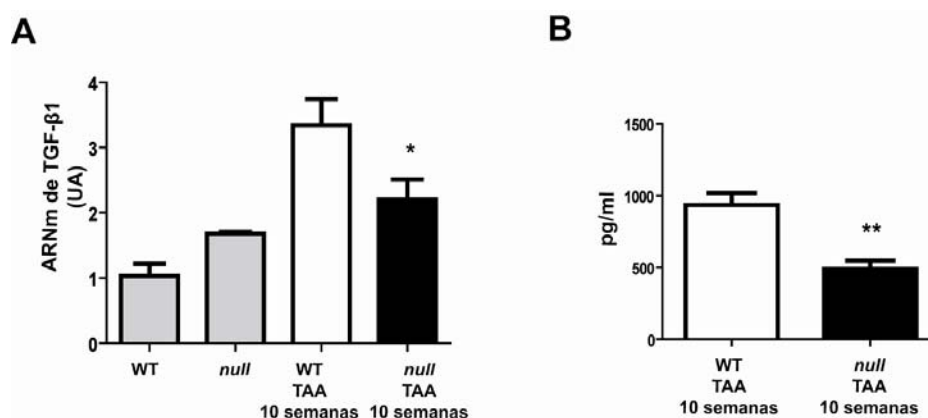
de evaluar el número de CEH activadas ahora en tejidos que carecen completamente de la expresión de SPARC se estudió mediante tinción inmunohistoquímica la expresión de  $\alpha$ -SMA en tejidos hepáticos. Los animales SPARC *null* que recibieron TAA solo presentan una marca tenue comparado con los animales WT (**Figura 29**). La cuantificación del área con tinción positiva mostró una importante reducción de la cantidad de CEH activadas y miofibroblastos en el grupo de animales SPARC *null* en comparación con los animales WT ( $0,11 \pm 0,01$  vs.  $0,45 \pm 0,02$ , respectivamente). Este resultado sugiere que la ausencia de SPARC se asocia con una reducción en el número de CEH activadas y miofibroblastos, células fundamentales en el desarrollo de la fibrogenesis, tras el estímulo fibrogénico.



**Figura 29.** La ausencia de SPARC se correlaciona con una reducción en el número de CEH activadas. Inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA. A-B) Tejido hepático de ratones WT y *null* sanos, C-D) ratones WT y *null* tratados con TAA durante 10 semanas. E-F) Mayor aumento (400X), hígados provenientes de ratones tratados con TAA donde se observa localización peri-sinusoidal y en tractos fibrosos de las células con tinción positiva. G) Cuantificación morfométrica del área con tinción positiva. \*\* $p < 0,01$ . Test de Mann-Whitney.

### I.11 Disminución en la expresión y en los niveles sistémicos de TGF- $\beta$ 1 en ratones SPARC *null*

El papel de TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo de la fibrosis es de crucial importancia y su relación con SPARC ha sido ampliamente reportado en la literatura donde se ha demostrado una retroalimentación positiva de la expresión de estas proteínas. Por lo tanto, decidimos evaluar la expresión del ARN mensajero para TGF- $\beta$ 1 por qPCR en tejidos de ratones, WT y SPARC *null*, que recibieron TAA durante 10 semanas. Como era esperable la administración de TAA aumenta la expresión de TGF- $\beta$ 1 ( $1,032 \pm 0,11$  vs.  $3,34 \pm 0,25$ ; WT y WT con administración de TAA, respectivamente). Interesantemente, en la **Figura 30A** se observa una disminución significativa de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en tejidos de animales SPARC *null* en comparación con animales WT al recibir TAA ( $2,20 \pm 0,19$  vs.  $3,34 \pm 0,25$ ; SPARC *null* y WT, respectivamente). Este dato coincide con una menor activación de las CEH, quienes son las principales productoras de esta citoquina.



**Figura 30.** La ausencia de SPARC induce una disminución de los niveles de expresión y secreción de TGF- $\beta$ 1 tras el estímulo fibrogénico con TAA. A) qPCR para TGF- $\beta$ 1 en muestras de tejido hepático provenientes de ratones WT y *null* con o sin tratamiento con TAA. Datos relativos al WT. UA, unidades arbitrarias. B) Niveles de TGF- $\beta$ 1 en suero de animales WT y *null* tratados con TAA durante 10 semanas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \* vs. WT tratados con TAA. Test de Mann-Whitney.

Por otro lado, se estudió la expresión de TGF- $\beta$ 1 mediante la técnica de ELISA. Medimos los niveles de TGF- $\beta$ 1 en suero de animales WT y SPARC *null* que recibieron TAA. Como se encuentra graficado en la **Figura 30B** se observó una disminución en los niveles secretados de TGF- $\beta$ 1 en animales SPARC *null* tratados con TAA luego de 10 semanas de tratamiento ( $489,1 \pm 59,6$  pg/ml vs.  $936 \pm 83,3$  pg/ml, SPARC *null* y WT respectivamente). Estos resultados sugieren que la disminución de TGF- $\beta$ 1 podría atenuar el proceso fibrogénico, aunque también es cierto que la disminución de la expresión de TGF- $\beta$ 1 puede ser la consecuencia directa de un menor desarrollo de la fibrosis. Con el objetivo de profundizar en el papel de TGF- $\beta$ 1 y su relación con SPARC, en la segunda parte de esta tesis doctoral se realizaran estudios *in vitro* destinados a clarificar los mecanismos anti-fibróticos subyacentes.

## II PARTE

---

Como se presentó en la parte I de esta sección de resultados, la ausencia permanente o transitoria de SPARC tiene efectos beneficiosos en cuanto a la inhibición del desarrollo de fibrosis hepática en tres modelos desarrollados *in vivo*. Hemos demostrado en este trabajo que la inhibición de la expresión de SPARC disminuye la síntesis y/o maduración de las fibras de colágeno fibrilar, disminuye la activación de las CEH y la producción de la citoquina pro-fibrogénica TGF- $\beta$ 1. Con el fin de ahondar en los mecanismos subyacentes a este potente efecto anti-fibrótico *in vivo*, decidimos analizar el comportamiento de las CEH en cultivos tanto de líneas celulares como en cultivos primarios.

### **II.1 Inhibición de la expresión de SPARC en líneas celulares y cultivos primarios de células estrelladas hepáticas de rata utilizando ARN de interferencia específicos.**

En primer lugar se diseñaron ARN de interferencia específicos para inhibir SPARC. Todo el trabajo *in vitro* se realizó en dos líneas de CEH, la línea de rata CFSC-2G y la línea humana LX2, y en cultivo primario de CEH de rata. Como se comentó anteriormente la obtención de cultivos primarios es una técnica laboriosa y con un rendimiento muy bajo, es por ello que el trabajo con líneas celulares es útil para desarrollar estudios *in vitro*. Consecuentemente se utilizaron distintas estrategias en el diseño de los ARN de interferencia dependiendo las células utilizadas.

Para inhibir la expresión de SPARC en células de rata se utilizó una mezcla de 4 ARN sintéticos (adquiridos a la empresa Dharmacon) específicos para SPARC (a partir de ahora me referiré a los mismos como siSPARC) (ver **Figura 12A**, sección Materiales y Métodos). El mecanismo de ARN de interferencia (ARNi) es muy específico, consiste en diseñar un oligonucleótido pequeño (de 20 nucleótidos aproximadamente) totalmente complementario a la secuencia del ARNm cuya expresión se desea inhibir. La región en la que se produce el apareamiento entre el ARNi y el ARNm es crucial para que el mecanismo de interferencia ocurra. No todo ARNi diseñado realmente posee la capacidad de silenciar la expresión del ARNm blanco, es por este motivo que se suelen adquirir mezclas de ARNi de forma de potenciar la inhibición. A su vez se utilizó como control un ARNi no específico (siCtr) que, en principio, está desprovisto de efecto específico anti-SPARC.

Gracias a la colaboración realizada con el laboratorio del Dr. Podhajcer (Fundación Instituto Leloir) pudimos utilizar, para inhibir SPARC en células humanas, un plásmido

(denominado pRNATinH1.4siSPARC) que lleva un ARNi específico para SPARC humana. Como control se utilizó el mismo plásmido con un ARNi no específico (pRNATin) (ver **Figura 12B**, sección Materiales y Métodos). Es decir, en esta parte del trabajo se utilizaron dos estrategias de ARNi, ARNi sintéticos o ARNi codificados en plásmidos, dependiendo si se desea inhibir SPARC en células humanas o de rata, respectivamente (**Figura 13**, sección Materiales y Métodos).

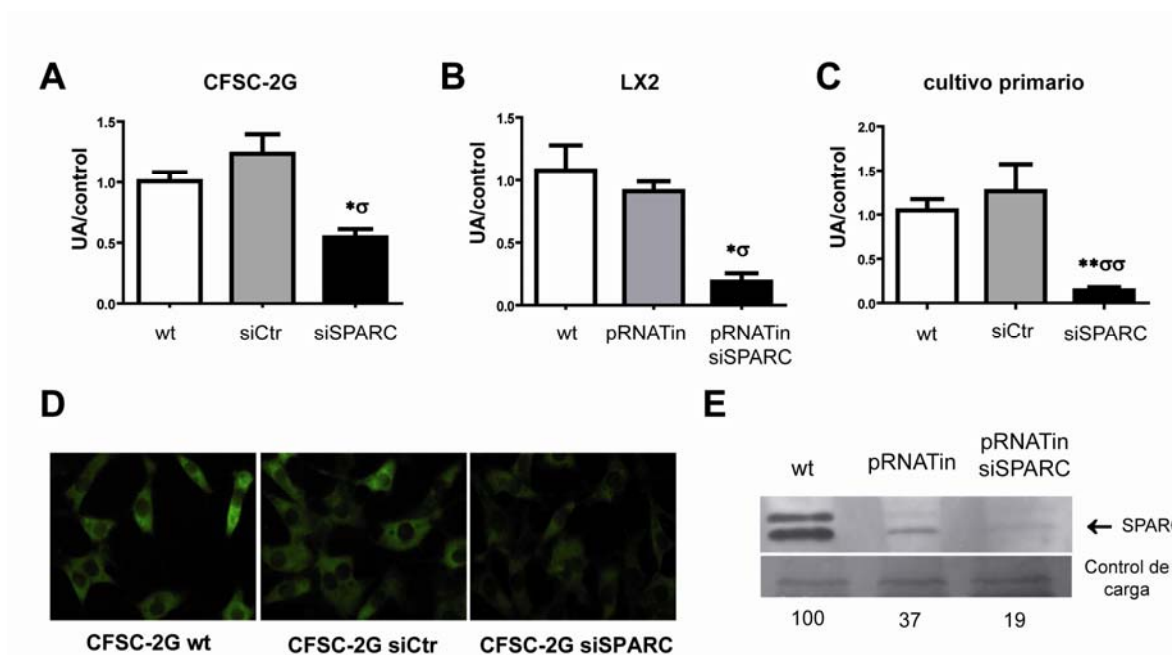
La eficiencia de transfección tanto de las células CFSC-2G como de las células pertenecientes al cultivo primario de CEH se evaluó utilizando un ARNi marcado con el fluorosforo FITC, mientras que para la línea LX2 se utilizó el plásmido pRNATinH1.4 (que codifica para la proteína reportera GFP). Mediante recuento celular en microscopio de fluorescencia se calculó la eficiencia de transfección para cada línea celular obteniéndose los siguientes resultados: una eficiencia del  $50 \pm 10\%$  en las células CFSC-2G, un  $68 \pm 11\%$  de inhibición en las células LX2 y una eficiencia del  $53 \pm 8\%$  para el cultivo primario de CEH.

SPARC se expresa en CEH y en particular demostramos por qPCR y inmunofluorescencia que se expresa en las células utilizadas en este trabajo (**Figura 31**). El tratamiento con siSPARC inhibió significativamente la producción de ARNm para SPARC en células CFSC-2G luego de 72 hs de la transfección ( $0,54 \pm 0,06$  vs  $1,24 \pm 0,16$ , siSPARC vs siCtr, respectivamente) (**Figura 31A y D**). En el caso de las células LX2 se obtuvo un resultado similar 72hs post-transfección con el plásmido pRNATinH1.4siSPARC ( $0,19 \pm 0,07$  vs  $0,91 \pm 0,08$ , siSPARC vs siCtr, respectivamente) (**Figura 31B**).

Como se explicó anteriormente las CEH obtenidas de ratas sanas se encuentran en estado quiescente, pero al ponerlas a cultivar en placas de cultivo de plástico las células se activan con el correr de los días. En particular trabajamos con el cultivo primario a día 8, donde ya se considera que las CEH se han activado. En ese momento se trataron con el ARNi específico para SPARC obteniendo una inhibición significativa de la expresión de SPARC ( $0,14 \pm 0,04$  vs  $1,26 \pm 0,3$ , siSPARC vs siCtr, respectivamente) (**Figura 31C**).

Por otro lado, sabiendo que SPARC es una proteína secretada se evaluó su expresión en sobrenadantes de células LX2, en las que el efecto inhibitorio fue más contundente. En la **Figura 31E** se demuestra la inhibición de la síntesis de SPARC en células tratadas con ARNi para SPARC.

Hemos demostrado la eficiencia de transfección de los sistemas empleados así como también la inhibición de SPARC tanto a nivel ARNm como proteína. A continuación estudiaremos el comportamiento de las CEH en donde se inhibe la expresión de SPARC. En la **Figura 13** (sección Materiales y Métodos) se ilustra el diseño experimental utilizado.



**Figura 31:** Eficiencia de la inhibición de la expresión de SPARC en las distintas poblaciones de CEH.

Análisis de la expresión del ARNm de SPARC mediante qPCR en células CEH: CFSC-2G (A), LX2 (B) y cultivo primario de CEH de rata (C). D) Inmunofluorescencia para SPARC (en verde) en células de la línea CFSC-2G, imágenes representativas de cada tratamiento. Magnificación 400X. E) Western blot para SPARC de sobrenadantes provenientes de células LX2 3 días post-transfección. Los números indican la cuantificación de las bandas teniendo en cuenta el control de carga. wt, células sin transfectar; siCtr, células tratadas con un ARNi no específico; siSPARC, células tratadas con ARNi específico para SPARC; pRNATin, células transfectadas con el plásmido pRNATinH1.4; pRNATinsiSPARC, células transfectadas con el plásmido que lleva un ARNi específico para SPARC humano. <sup>\*</sup>, <sup>σ</sup> P<0,05, <sup>\*\*</sup>, <sup>σσ</sup> P<0,01. ; <sup>\*</sup> vs wt; <sup>σ</sup> vs siCtr o pRNATin.

## II.2 La inhibición de SPARC reduce la capacidad migratoria de las células estrelladas hepáticas sin afectar su capacidad proliferativa

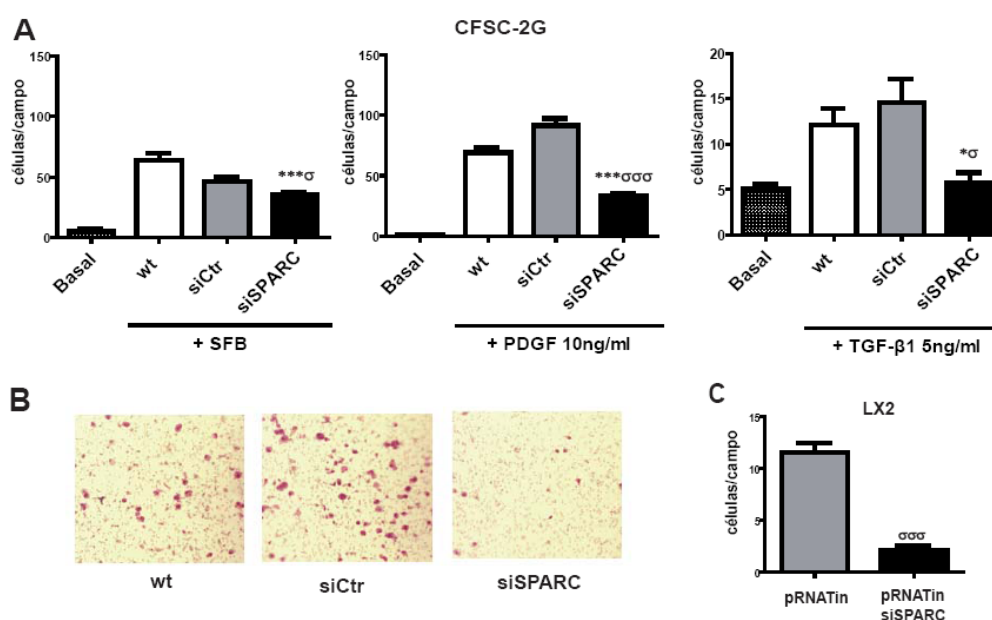
En respuesta a una injuria hepática se produce una gran cantidad de factores como citoquinas y quimiocinas que están involucradas en procesos biológicos claves para las CEH y para el desarrollo de la fibrosis. Estos factores participan activamente en procesos tales como la activación, proliferación y migración de las CEH, facilitando, entre otros eventos, la acumulación de las CEH en las zonas de injuria e inflamación (Friedman, 2000). Sabiendo que la proliferación de las CEH activadas es esencial en el proceso fibrogénico nos propusimos estudiar el efecto de la inhibición de SPARC en la actividad proliferativa y la inducción de apoptosis. Estos procesos se

evaluaron en las células CFSC-2G. La proliferación se cuantificó mediante la técnica de incorporación de timidina [ $^3\text{H}$ ]. El tratamiento con ARNi para SPARC no produjo cambios significativos en la proliferación de las CEH (dpm:  $15087 \pm 669,8$  vs.  $13590 \pm 677,5$  vs.  $15177 \pm 1460$ ; wt vs. siCtr vs. siSPARC, respectivamente;  $n=5$ ;  $p=0,96$ , siSPARC vs. wt;  $p=0,38$ , siSPARC vs. siCtr; test de T de student). La apoptosis fue evaluada por tinción con NaAc/BrEt (ver *Materiales y Métodos II. 8 Proliferación celular y apoptosis*). Consistentemente, solo se observó un leve aumento en la apoptosis tardía (% de células apoptóticas:  $5,5 \pm 2,5$  vs.  $7,5 \pm 0,5$  vs.  $11 \pm 1$ ; wt vs. siCtr vs. siSPARC, respectivamente; en dos experimentos independientes) y ningún cambio aparente en la apoptosis temprana (% de células apoptóticas:  $6 \pm 0$  vs.  $7 \pm 1$  vs.  $8,5 \pm 1,5$ ; wt vs. siCtrl, vs. siSPARC, respectivamente; en dos experimentos independientes) en comparación con los diferentes grupos.

Dado que no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular ni en la apoptosis al inhibir SPARC en las células CFSC-2G, nos preguntamos si existen diferencias en la capacidad migratoria que pudieran explicar los efectos antifibróticos de la inhibición de SPARC. En este sentido, las CEH activadas poseen la habilidad de migrar y acumularse en los sitios de injuria donde van a producir matriz fibrilar e inducir la producción de citoquinas inflamatorias. La presencia de estos factores aumenta el reclutamiento de CEH, creando un mecanismo de retroalimentación positiva. Consecuentemente, durante el desarrollo de la enfermedad los sitios de injuria hepática producen gran número de moléculas proinflamatorias que actúan como quimiotractantes de CEH a los lugares de lesión, siendo el PDGF uno de los factores más relevantes en la inducción de la migración de CEH. Por tal motivo, se utilizó esta citoquina como quimiotractante para evaluar los efectos de la inhibición de SPARC en la migración de células CFSC-2G y LX2 utilizando una cámara de migración de tipo “Boyden”. El ensayo consistió en resuspender las células transfectadas en medio de cultivo sin suero en el pocillo superior de la cámara de mientras que en el pocillo inferior se colocó el quimiotractante. Entre el pocillo superior y inferior se dispuso una membrana con poros que debe ser atravesada por las células con capacidad migratoria como se describe en la sección II.9 (*II. 9 Ensayo de migración*).

En primer lugar se utilizó suero como estímulo migratorio de células CFSC-2G sin transfectar o transfectadas con ARNi; el tratamiento con siSPARC presentó menor número de células con capacidad de migrar (**Figura 32**). Para evaluar el potencial migratorio bajo un estímulo característico del entorno fibroso, se utilizó PDGF como quimiotractante. Como se comentó en la

introducción de esta tesis, en los sitios de daño de tejido hepático existen una variedad de factores pro-inflamatorios que actúan como quimiotractantes de las CEH, pero sin duda el PDGF es uno de los factores más potentes (Yang *et al.*, 2003). La concentración óptima de PDGF se estableció en 10ng/ml luego de realizar una titulación para ambas líneas celulares. Como vemos en la **Figura 32** la inhibición de SPARC redujo significativamente la capacidad migratoria de las células tratadas con ARNi para SPARC en comparación con las células tratadas con un ARNi no específico o sin transfectar. Los resultados fueron similares en ambas líneas celulares sugiriendo que el efecto no depende del tipo celular en estudio. Es necesario aclarar la susceptibilidad de las células LX2 a la transfección con ADN exógeno, lo cual tiene un impacto negativo en la capacidad migratoria de estas células en general, mientras que las células no transfectadas poseen una capacidad migratoria considerablemente mayor. Por esta razón, aunque la inhibición de SPARC induce una disminución de la migración en relación con el plásmido control, estos resultados no se incluyen en la grafica mostrada en la **Figura 32C**.

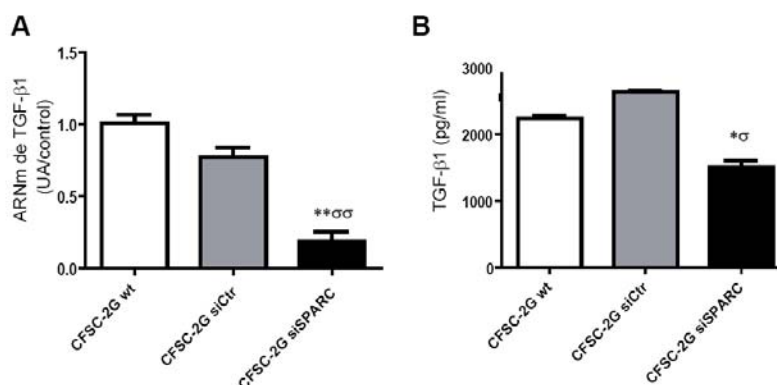


**Figura 32:** La inhibición de la expresión de SPARC disminuye la capacidad de migración de las CEH en respuesta a SFB, PDGF y TGF-β1. Ensayo de migración en cámara de tipo Boyden. (A) Migración de células CFSC-2G en respuesta a SFB, PDGF o TGF-β1. wt, células sin transfectar; siCtr, células tratadas con un ARNi no específico; siSPARC, células tratadas con ARNi específico para SPARC. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , vs. wt;  $^{\sigma}$   $p < 0,05$ ,  $^{\sigma\sigma\sigma}$   $p < 0,001$ , vs. siCtr. (B) Microfotografías representativas donde se muestra la reducción del número células migradas. (C) Cuantificación de la migración de células LX2 en respuesta a PDGF. pRNATin, células transfectadas con el plásmido pRNATinH1.4; pRNATin siSPARC, células transfectadas con el plásmido que lleva un ARNi específico para SPARC.  $^{\sigma\sigma\sigma}$   $p < 0,001$ .

Entre sus múltiples funciones TGF- $\beta$ 1 es, además de una citoquina multifuncional fundamental por su actividad pro-fibrogénica, una molécula con efectos quimiotractantes. Al realizar los ensayos de migración utilizándola como quimiotractante también se observó disminución de la capacidad migratoria de las células CFSC-2G tras la inhibición de SPARC (**Figura 32A**). En resumen, estos resultados sugieren que al inhibir la expresión de SPARC en las CEH estas células adquieren un fenotipo con baja capacidad migratoria.

### II.3 La inhibición de SPARC modula la síntesis y secreción de TGF- $\beta$ 1 afectando la migración celular

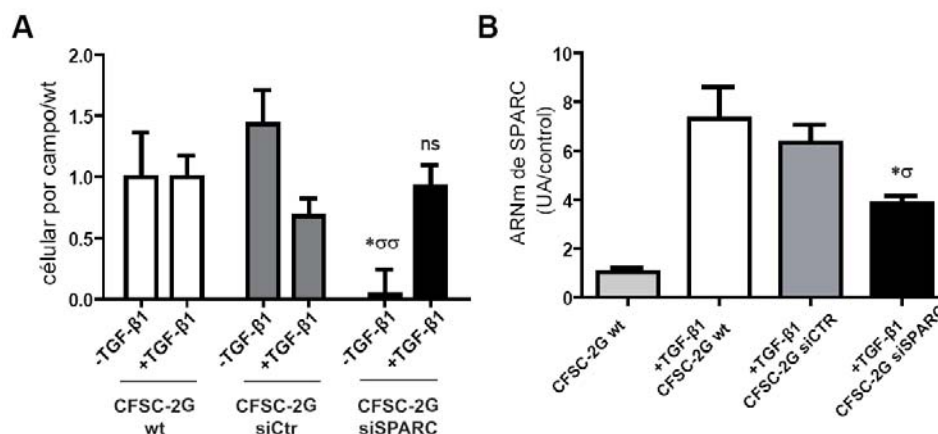
De los resultados presentados en la primera parte de este trabajo se desprende que los ratones SPARC *null* presentan disminución en los niveles de TGF- $\beta$ 1. Con esta información presente, y con el objetivo de estudiar los efectos del ARNi, realizamos estudios destinados a medir no sólo la síntesis de ARNm sino también la secreción de TGF- $\beta$ 1. Coincidentemente con lo observado anteriormente, los resultados obtenidos por qPCR demuestran inhibición de la expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 en la línea CFSC-2G transfectada con siSPARC ( $1,08 \pm 0,05$  vs.  $0,77 \pm 0,07$  vs.  $0,18 \pm 0,06$ ; wt vs. siCtr vs. siSP, respectivamente) (**Figura 33A**). De la misma forma, se demostró por ELISA la inhibición de la secreción de TGF- $\beta$ 1 en sobrenadantes de células CFSC-2G transfectadas con ARNi para SPARC ( $2237 \pm 33,7$  vs.  $2634 \pm 15,01$  vs.  $1503 \pm 97,57$ ; wt vs. siCtr vs. siSPARC, respectivamente) (**Figura 33B**). La reducción del nivel de TGF- $\beta$ 1 probablemente esté involucrada en la actividad anti-fibrótica observada *in vivo* previamente.



**Figura 33: La inhibición de SPARC reduce la expresión y secreción de TGF- $\beta$ 1.** A) Niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 estudiados por qPCR. Los datos se relativizaron a las células sin transfectar (CFSC-2G wt). UA, unidades arbitrarias. (B) Cuantificación por ELISA de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en sobrenadantes de células CFSC-2G tratadas. wt, células sin transfectar; siCtr, células tratadas con un ARNi no específico; siSPARC, células tratadas con ARNi específico para SPARC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , vs. wt; °  $p < 0,05$ , °°  $p < 0,01$ , vs. siCtr.

Con el objetivo de estudiar si la reducción de la capacidad migratoria en las células tratadas con ARNi para SPARC puede ser consecuencia de la expresión reducida de TGF- $\beta$ 1, realizamos un ensayo de migración donde, luego de inhibir la expresión de SPARC, preincubamos las células con TGF- $\beta$ 1 por 24hs. Más tarde se realizó el ensayo de migración, y observamos que las células tratadas con ARNi para SPARC y las tratadas con TGF- $\beta$ 1 recuperaron la habilidad de migrar en respuesta a al estímulo de PDGF (**Figura 34A**). Es decir, sabiendo que TGF- $\beta$ 1 puede estimular la expresión de SPARC nos preguntamos si la restauración de la capacidad migratoria se debe a la presencia de TGF- $\beta$ 1 o a que el agregado exógeno de TGF- $\beta$ 1 pudo contrarrestar los efectos de la inhibición con ARNi aumentando la expresión de SPARC. Para evaluar estas posibilidades se estudió la síntesis de ARNm para SPARC en las células CFSC-2G pretratadas durante 24 hs con TGF- $\beta$ 1. Los resultados de la qPCR que se muestran en la **Figura 34B** indican que el pretratamiento con TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión de SPARC en las células tratadas con ARNi para SPARC, sin embargo, los niveles de SPARC no se restauran completamente (aproximadamente un 60%). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el restablecimiento de la capacidad migratoria de las células tratadas con TGF- $\beta$ 1 depende parcialmente de la reexpresión de SPARC.

Estas observaciones nos permiten hipotetizar que durante la activación de las CEH, SPARC podría actuar sobre la vía de producción de TGF- $\beta$ 1 permitiendo y/o aumentando la habilidad de estas células de responder a estímulos quimiotácticos.

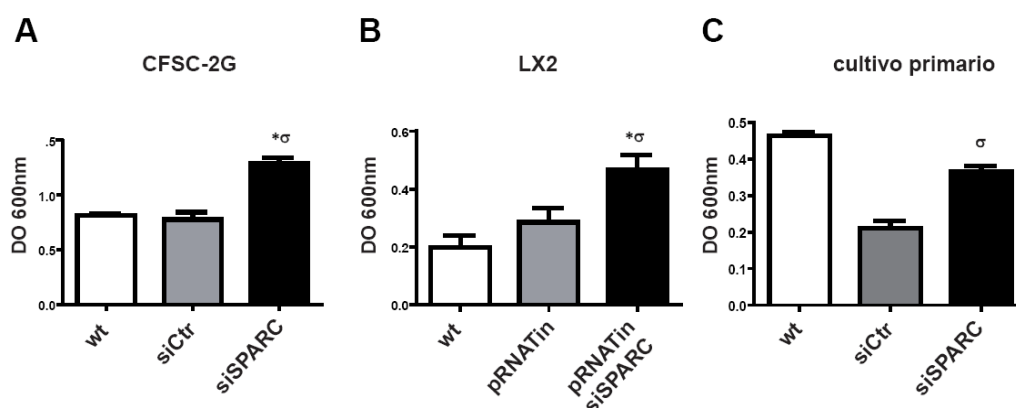


**Figura 34: El pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 restablece la capacidad migratoria de las células CFSC-2G transfectadas con siSPARC.** A) Cuantificación del ensayo de migración de CEH en respuesta a PDGF, con y sin pre-tratamiento por 24 hs con TGF- $\beta$ 1 (0,1 ng/ml). \*  $p < 0,05$ , vs. CFSC-2G wt -TGF- $\beta$ 1;  $\sigma\sigma$   $p < 0,01$ , vs. CFSC-2G siCtr -TGF- $\beta$ 1. B) Análisis de los niveles de ARNm de SPARC por qPCR en células CFSC-2G transfectadas con ARNi sin y con pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1. Valores relativos a las células sin transfectar y sin pretratamiento con TGF- $\beta$ 1 (CFSC-2G wt). UA, unidades arbitrarias. \*  $p < 0,05$ , vs. CFSC-2G wt +TGF- $\beta$ 1;  $\sigma$   $p < 0,05$ , vs. CFSC-2G siCtr +TGF- $\beta$ 1.

#### II.4 La disminución de los niveles de expresión de SPARC aumentan la capacidad adhesiva de las células estrelladas hepáticas y alteran el citoesqueleto de actina

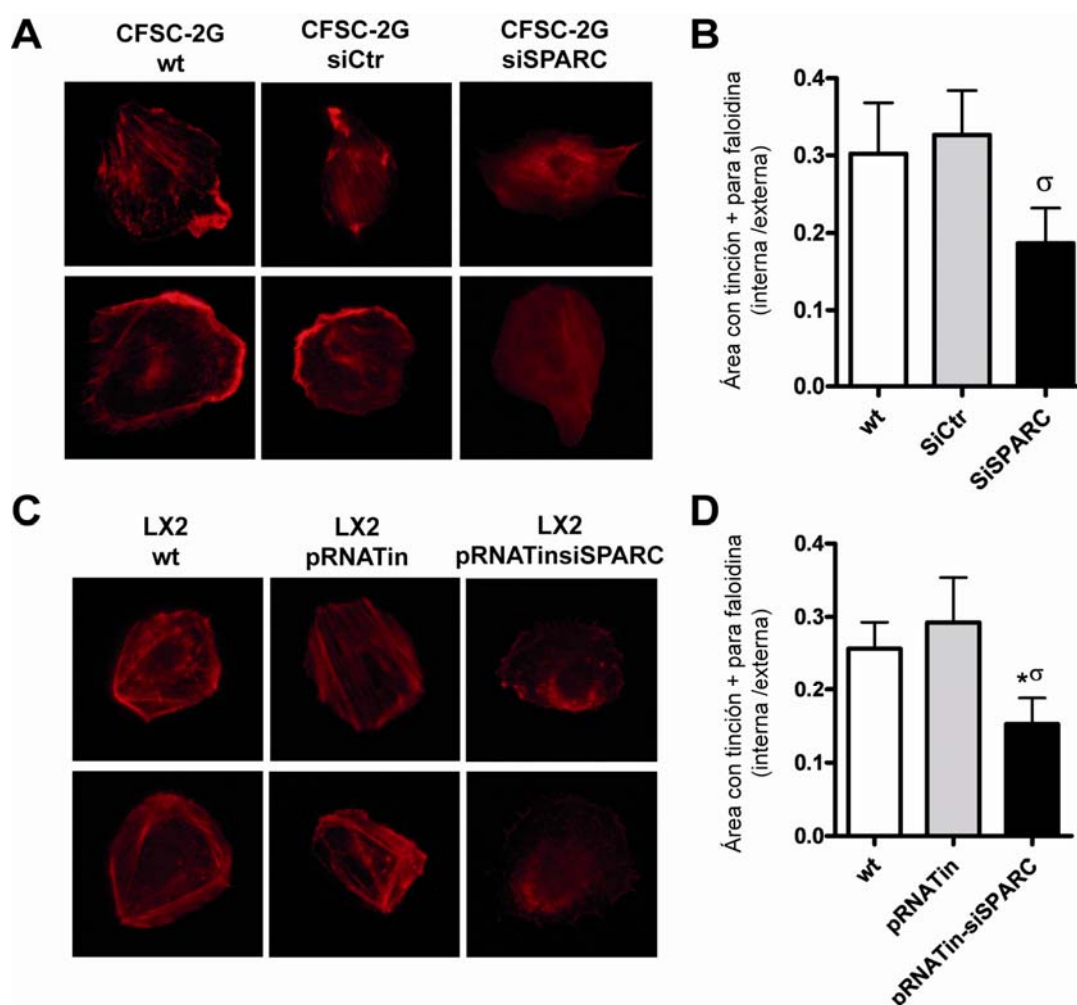
El proceso de migración celular implica la existencia de un equilibrio adecuado entre adhesión y separación del sustrato. Este proceso involucra señales intracelulares dependientes de moléculas de MEC y cambios dinámicos de los filamentos de actina del citoesqueleto. Se ha demostrado en otros sistemas que SPARC provoca cambios hacia un fenotipo redondeado induciendo inhibición de la adhesión al menos en parte por disolución del complejo focal y reorganización de las fibras de estrés (Murphy-Ullrich *et al.*, 1995; Melton *et al.*, 2007). Con el objetivo de estudiar si la disminución de la capacidad migratoria al inhibir SPARC puede deberse a cambios en su adhesividad, estudiamos la capacidad de las CEH de adherirse a fibronectina, un componente fundamental de la MEC que promueve la formación de complejos de adhesión vía integrinas de superficie celular.

Tanto la línea celular CFSC-2G como las células LX2 transfectadas con ARNi para SPARC mostraron un aumento significativo en su capacidad de adherirse a fibronectina (**Figura 35A-B**). La inhibición de SPARC aumenta la adhesión lo que puede tener implicancias importantes como la reducción de la capacidad de las CEH para migrar en respuesta a estímulos quimiotractantes presentes en las zonas de injuria hepática durante el desarrollo de la fibrosis. De la misma forma se realizó el ensayo de adhesión con el cultivo primario de CEH obtenidas de rata luego de 8 días de cultivo en placa, de manera interesante reprodujimos los mismos efectos en el cultivo primario de CEH (**Figura 35C**).



**Figura 35:** La inhibición de SPARC aumenta la capacidad adhesiva de las CEH. Ensayo de adhesión a fibronectina de células CFSC-2G (A), LX2 (B) y provenientes del cultivo primario de CEH de rata (C). \* $p < 0,05$  vs. wt; <sup>σ</sup>  $p < 0,05$  vs. siCtr o pRNAtin. Test de Mann-Whitney.

Los cambios en la adhesión y migración están por lo general relacionados con alteraciones en el citoesqueleto y filamentos de actina. Para estudiar los cambios en el citoesqueleto, las CEH se incubaron sobre vidrios recubiertos con polilisina/fibronectina durante 4 hs y luego se realizó tinción de faloidina, una micotoxina capaz de unir específicamente filamentos de actina, marcada con un fluorocromo. En ambas líneas celulares tratadas con ARNi para SPARC se observó una reducción significativa tanto en la proporción de células con fibras de estrés gruesas como también en la distribución de la tinción con faloidina (**Figura 36**).

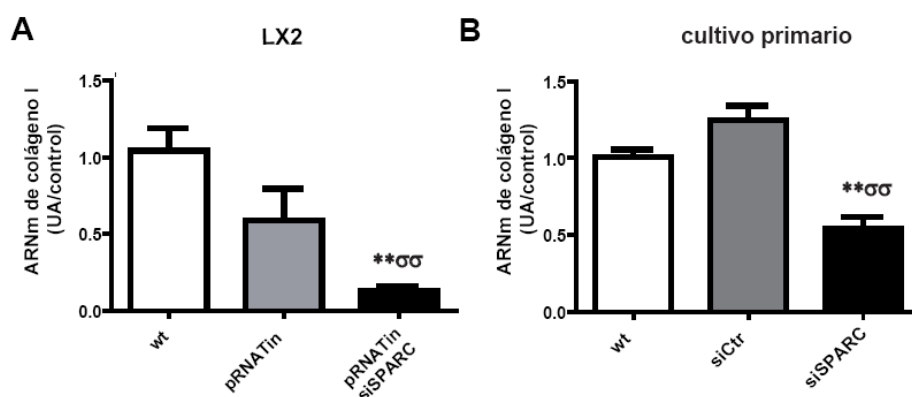


**Figura 36:** La inhibición de SPARC altera el patrón de fibras de actina del citoesqueleto de las CEH. Microfotografías representativas de la tinción para faloidina en células CFSC-2G (A) y LX2 (C). Panel superior en A y C muestra fotos representativas de la expresión de fibras de stress, mientras que los paneles inferiores muestran fenotipos polarizados. B-D) Cuantificación de la tinción para faloidina en células CFSC-2G (B) y LX2 (D). Los valores expresan la relación entre el área con tinción positiva interna y externa. \* $p < 0,05$  vs. WT; <sup>σ</sup>  $p < 0,05$  vs. ARN de interferencia control; <sup>σ</sup>  $p < 0,01$  vs ARN de interferencia control. Test de Mann-Whitney.

La inhibición de SPARC disminuyó el número de células con fenotipo migratorio, es decir, se vio afectada la presencia de polarización y fibras de estrés gruesas, en comparación con las células tratadas con el ARNi control o las células sin tratar (el porcentaje de células con fenotipo migrante fue del 70%, 60% y 40% para células CFSC-2G wt, tratadas con siCtr o con siSPARC, respectivamente; para la línea LX2 los porcentajes obtenidos fueron del 60%, 64% y 40% para células wt, transfectadas con pRNATin o pRNATinsiSPARC, respectivamente;  $p < 0,05$ , test de Fisher). Estos resultados sugieren una relación entre la disminución de la capacidad migratoria y las alteraciones en los filamentos de actina del citoesqueleto.

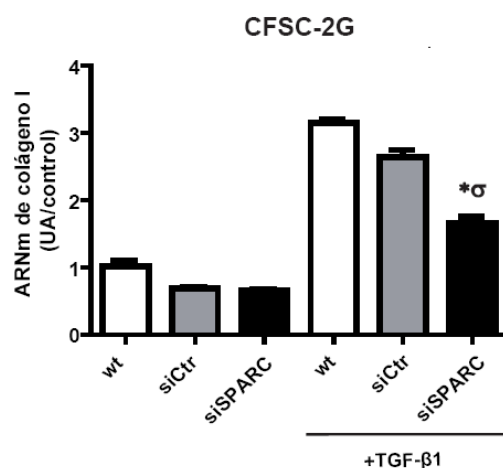
### II.5 La inhibición de SPARC disminuye la expresión de ARNm para colágeno

Debido a que las CEH son las mayores productoras de colágeno tipo I durante el proceso fibrogénico y sabiendo que en los estudios *in vivo* observamos una reducción en los depósitos de colágeno nos preguntamos si la inhibición de SPARC en estas células podría tener los mismos efectos sobre su capacidad productora de colágeno. Luego de 72hs post transfección con ARNi evaluamos la expresión de colágeno por qPCR. En la **Figura 37A** se observa que las células LX2 transfectadas con siSPARC disminuyeron los niveles de ARNm para colágeno comparado con las células no tratadas, interesantemente los mismos resultados se observan en el cultivo primario transfectado a día 8, momento en el que las células ya han adquirido un fenotipo activado (**Figura 37B**)



**Figura 37:** La inhibición de SPARC induce una menor expresión del ARNm para colágeno tipo I. PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión del ARNm de colágeno tipo I en células LX2 (A) y en cultivo primario (B) transfectado con ARNi para SPARC. Análisis por el método de  $\Delta\Delta C_t$  relativo a las células sin transfectar. wt, células sin transfectar; pRNATin, células transfectadas con el plásmido pRNATinH1.4; pRNATinsiSPARC, células transfectadas con el plásmido que lleva un ARNi específico para SPARC; siCtr, células tratadas con un ARNi no específico; siSPARC, células tratadas con ARNi específico para SPARC. \*\*  $p < 0,01$  vs. wt; σσ  $p < 0,01$  vs. ARNi control. Test de Mann-Whitney.

Cuando se evaluó la expresión de colágeno en las células CFSC-2G transfectadas con siSPARC no se observaron diferencias significativas. Teniendo en cuenta que en estas células la inhibición de SPARC no es tan contundente hipotetizamos que el cambio en la expresión no sería suficiente para alterar la expresión de colágeno. Por esta razón, 48 hs luego de la transfección de las células CFSC-2G, las estimulamos con TGF- $\beta$ 1. Como esperábamos TGF- $\beta$ 1 aumentó la expresión de colágeno en comparación con la producción por parte de las células no estimuladas (**Figura 38**), bajo este estímulo profibrogénico las células CFSC-2G transfectadas con ARNi para SPARC mostraron inhibición de la síntesis de ARNm para colágeno.

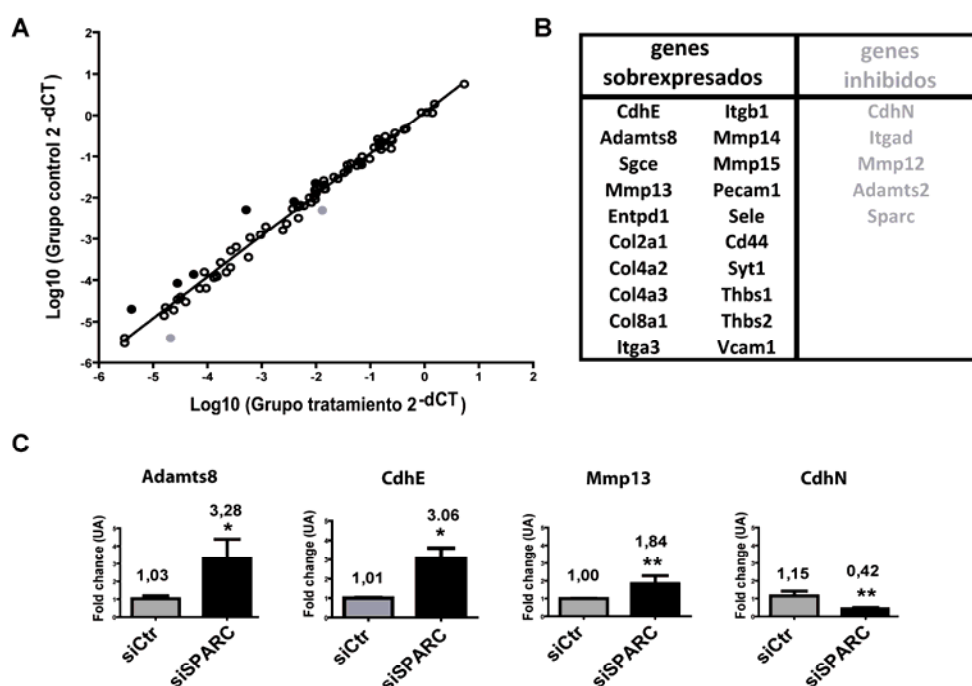


**Figura 38:** La inhibición de la expresión de SPARC en células CFSC-2G las convierte en resistentes a la producción de colágeno tras el estímulo con TGF- $\beta$ 1 exógeno. qPCR de colágeno en células CFSC-2G tratadas o no durante 24 hs con TGF- $\beta$ 1 tras 48hs de la transfección con ARNi. Los resultados, analizados se relativizaron a las células no tratadas con TGF- $\beta$ 1. \*  $p < 0,01$  vs. CFSC-2G wt tratadas con TGF- $\beta$ 1;  $^{\sigma}$   $p < 0,01$  vs. siCtr.

## II.6 La inhibición de SPARC induce, en las células estrelladas hepáticas, un cambio de un fenotipo mesenquimal a uno epitelial

Con el fin de profundizar sobre los mecanismos involucrados en la inhibición de la migración en las células tratadas con ARNi para SPARC estudiamos el patrón de expresión de moléculas de adhesión y de matriz extracelular de células tratadas con ARNi para SPARC en comparación con las tratadas con ARNi control. Se utilizó un arreglo para PCR en tiempo real que permite estudiar de forma simultánea la expresión de 84 genes involucrados en las vías mencionadas. De los 84 genes involucrados en interacciones célula-célula y célula-matriz, 20 se encontraron sobreexpresados (coeficiente de variación  $\geq 1,5$ ) y tan solo 5 genes inhibidos en

células CFSC-2G tratadas con ARNi para SPARC en comparación al control (**Figura 39A-B**). Consistentemente con los resultados de una mayor adhesividad en las células donde SPARC esta reprimida, 50% de los genes sobreexpresados se relacionan con adhesión células-MEC (Sgce, Col2a1, Col4a2, Col4a3, Col8a1, Itga3, Itgb1, Cd44, Thbs1 and Thbs2). Mientras que solo 2 genes relacionados con interacciones célula-MEC se encontraron inhibidos (CdhN y Itgad). Además 4 metaloproteinasas, Adamts8, MMP13, MMP14 y MMP15, aumentaron su expresión; mientras que hubo una inhibición de la expresión de MMP12 y Adamts2.



**Figura 39.** Análisis de la expresión de genes relacionados con el proceso de adhesión y con la MEC luego de inhibir la expresión de SPARC en CEH. Arreglo para PCR en tiempo real que estudia la expresión de 84 genes en células CFSC-2G relacionados con adhesión y MEC. A) Gráfico de correlación entre el cambio de expresión de genes en células tratadas con ARNi para SPARC o tratadas con ARN de interferencia control. Cada punto representa un gen evaluado. En negro y gris se representan genes sobre-expresados o inhibidos con un cambio (punto de corte) >2, respectivamente. B) En la tabla figuran todos aquellos genes con un cambio >1,5. C) Estudios de confirmación: cuantificación de la expresión de ARNm por qPCR de aquellos genes que están claramente modificados en el arreglo realizado. Los valores fueron normalizados a la expresión de GAPDH. La media del cambio obtenido se representa en los gráficos. \*\* p<0,01, \* p<0,05.

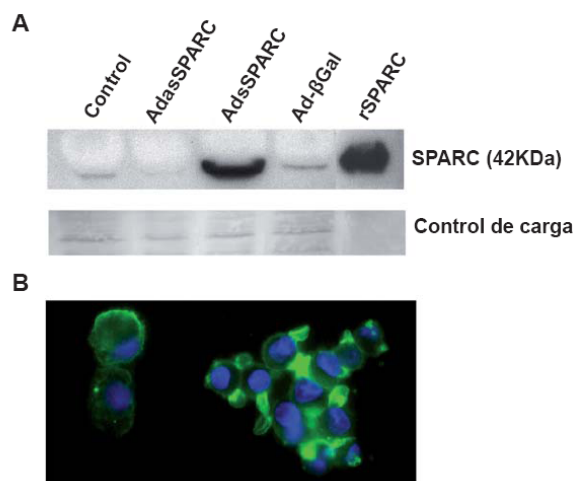
La expresión de los genes donde se observaron mayores cambios (Adamts8, CdhE, MMP13 y CdhN) se confirmaron por qPCR (**Figura 39C**). En las células deficientes de SPARC el gen que se encontró claramente sobreexpresado fue CdhE (coeficiente de variación: 9,7 en el arreglo de genes; coeficiente de variación: 3,3 en la qPCR). En congruencia con la información presente en la literatura se inhibió la expresión de CdhN (0,3 veces de cambio en el arreglo y 0,42 en la qPCR) (**Figura 39**). Estos resultados y el cambio de expresión de CdhN a CdhE sugieren la pérdida de las propiedades mesenquimales, asociado a una mayor expresión de CdhE. Este cambio del fenotipo estaría relacionado con las capacidades migratorias de las células y el estado de activación de las CEH, de hecho, las células tipo mesenquimal poseen una gran capacidad migratoria.

### III PARTE

#### III.1 Expresión de SPARC en células de hepatocarcinoma

Sabiendo que SPARC se expresa en hígados cirróticos y teniendo en cuenta que la cirrosis es considerada una patología que facilita la aparición del HC, decidimos investigar el papel de SPARC en este tumor. Sabiendo que existen datos contradictorios acerca de la funciones de SPARC en cáncer decidimos explorar los efectos de los cambios de la expresión de esta proteína y el comportamiento tumoral.

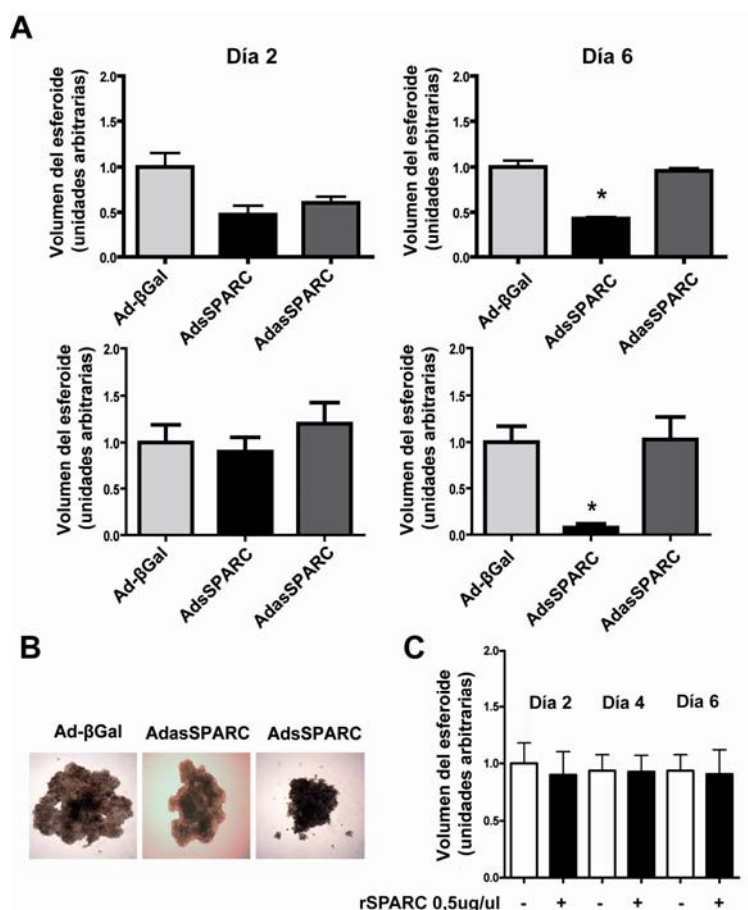
Con este fin estudiamos la expresión de SPARC en distintas líneas celulares de HC humano, líneas HepG2, Hep3B y Huh7, empleando diferentes vectores basados en adenovirus de primera generación. Se indujo la expresión de SPARC con un adenovirus que contiene la secuencia completa (sentido) de SPARC (AdsSPARC) empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Por *Western blot* e inmunofluorescencia se observa el aumento de la expresión de SPARC en las células HepG2, que fue máxima 3 días post-infección (**Figura 40**). Como se observa en la **Figura 40A** la transducción de las células con un adenovirus reportero que codifica para  $\beta$ -galactosidasa (Ad-  $\beta$ Gal) no modificó significativamente la expresión de SPARC, mientras que el adenovirus que expresa la secuencia antisentido para SPARC (AdasSPARC) inhibe la expresión de esta proteína de manera sustancial luego de 3 días.



**Figura 40.** Expresión de SPARC en células HepG2 utilizando distintos vectores adenovirales. A) Western Blot proveniente de medio condicionado obtenido de células HepG2 sin transducir (control) o 3 días después de transducidas con los vectores AdasSPARC, AdsSPARC o Ad- $\beta$ gal. rSPARC, SPARC recombinante. B) Inmunofluorescencia para SPARC (tinción verde) y tinción nuclear con DAPI (azul) en células HepG2 sin transducir.

### **III.2 La sobreexpresión de SPARC en células de hepatocarcinoma inhibe el crecimiento en esferoides.**

Como hemos comentado previamente SPARC es una proteína de MEC con múltiples funciones biológicas pero que, dependiendo del tipo de cáncer en estudio, puede tener efectos muy diversos, incluso contrapuestos. Para estudiar el efecto de SPARC en células de HC se realizaron una serie de ensayos *in vitro* que a continuación se detallan. En primer lugar se estudió el comportamiento de las células de HC donde se inhibió o sobreexpresó SPARC para establecer esferoides tridimensionales, que simulan, aunque de manera limitada, el crecimiento tumoral *in vitro*. Los esferoides son un modelo *in vitro* aceptado para el estudio de la biología de las células malignas (Carlsson and Acker, 1988). Los esferoides tienen la particularidad de conformar un conjunto tridimensional de células tumorales que cultivadas bajo condiciones permiten que se establezcan uniones célula-célula y célula-matriz muy particulares. Los esferoides se pueden establecer empleando uno o más tipos celulares, sin embargo, aún aquellos constituidos por un único tipo celular presentan heterogeneidad con células en estado quiescente, proliferantes e incluso necróticas. En nuestros ensayos, el armado de los esferoides fue realizado con un solo tipo celular, la línea celular HepG2 o la línea Hep3B. Las células fueron transducidas con los vectores adenovirales 72 hs antes del armado de los esferoides y el crecimiento de los mismos se evaluó a lo largo de 6 días. Llamativamente, los resultados muestran que el aumento de la expresión de SPARC en células HepG2 y en Hep3B inhibió sustancialmente el crecimiento de los esferoides en comparación a células transducidas con el adenovirus control (Ad- $\beta$ gal) o sin tratar (**Figura 41A-B**). De manera importante, ambas líneas celulares presentaron el mismo comportamiento. Sin embargo, la inhibición de SPARC utilizando AdasSPARC no modificó la capacidad de las células de crecer formando esferoides en comparación con los controles. Interesantemente, cuando se adicionó de forma exógena SPARC recombinante la tasa de crecimiento de los esferoides no fue modificada (**Figura 41C**), indicando que solo el aumento de SPARC endógena es capaz de inhibir el crecimiento de los esferoides.

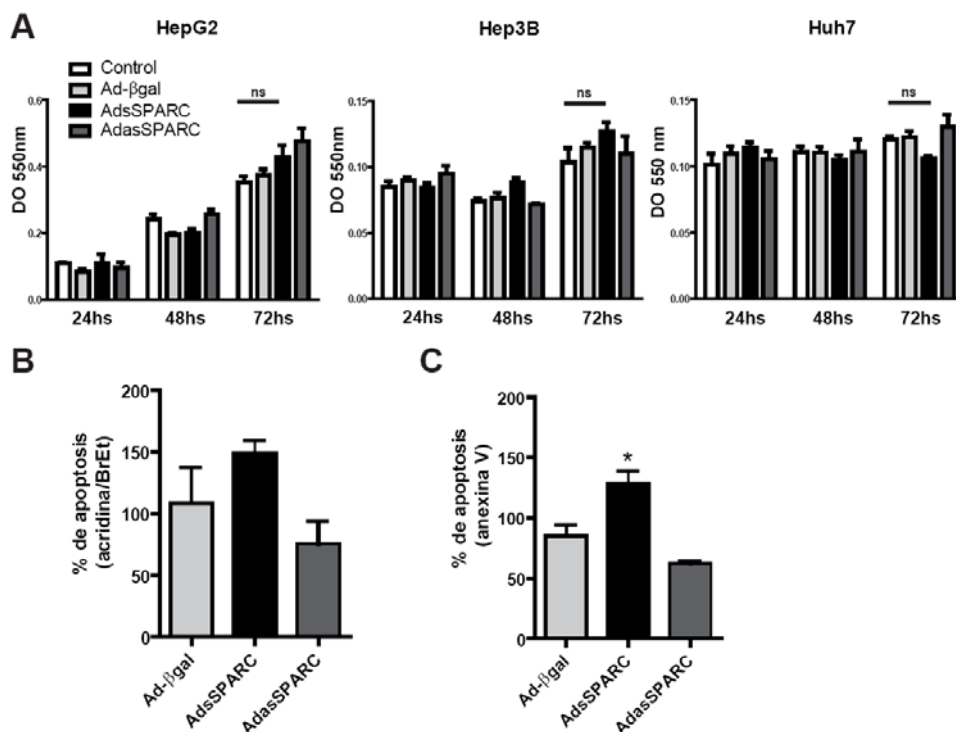


**Figura 41.** El aumento de la expresión de SPARC en células de hepatocarcinoma inhibe el crecimiento de esferoide tridimensionales *in vitro*. A) Crecimiento de células HepG2 (panel superior) o Hep3B (panel inferior) en esferoide. Las células fueron transducidas con Ad-βgal, AdsSPARC y AdasSPARC 48hs antes conformar los esferoide; luego de 2 y 6 días se analizó el volumen de los mismos. Datos correspondientes a tres experimentos independientes con 5 replicas cada uno. \* $p < 0,05$  vs Adβgal, test de Mann-Whitney. B) Fotografías representativas de los esferoide luego de 6 días de cultivo. C) Formación de esferoide con células HepG2 y administración exógena de SPARC recombinante (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). No se observan diferencias significativas en el crecimiento de los esferoide (test Kruskal-Wallis).

### III.3 La expresión endógena de SPARC en células de hepatocarcinoma no afecta su viabilidad

La inhibición en el crecimiento de los esferoide podría ser consecuencia de una menor capacidad proliferativa de las células que lo componen. Para evaluar esta posibilidad se estudió si la sobreexpresión de SPARC en distintas líneas de HC (HepG2, Hep3B y Huh7) puede influir en la capacidad proliferativa dependiente de sustrato. Se realizó un ensayo de crecimiento en plástico que consistió en cultivar las células transducidas y, a diferentes tiempos, medir la capacidad proliferativa mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Como se observa en la **Figura 42A** no se

detectaron diferencias significativas en la proliferación en los distintos grupos, aún luego de 72hs posteriores a la transducción (HepG2:  $0,35 \pm 0,02$ ,  $0,37 \pm 0,02$ ,  $0,43 \pm 0,04$ ,  $0,48 \pm 0,04$ ; Hep3B:  $0,1 \pm 0,002$ ,  $0,11 \pm 0,004$ ,  $0,13 \pm 0,007$ ,  $0,11 \pm 0,01$ ; Huh7:  $0,12 \pm 0,002$ ,  $0,12 \pm 0,004$ ,  $0,1 \pm 0,002$ ,  $0,13 \pm 0,009$ ; control, Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC o AdasSPARC, respectivamente). Resultados similares se observan luego de 5 días de cultivo.

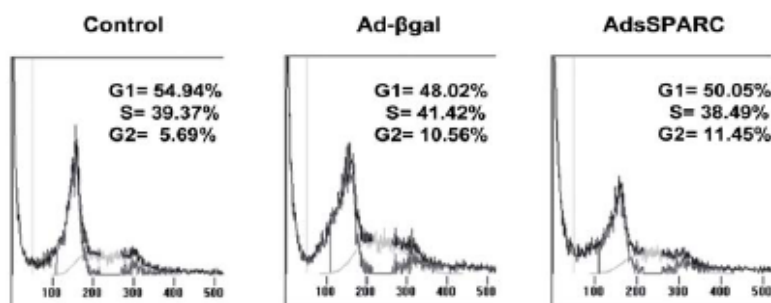


**Figura 42.** La sobreexpresión de SPARC no afecta la proliferación de las células de hepatocarcinoma *in vitro* aunque sí el proceso de apoptosis. A) Viabilidad celular determinada por ensayo de MTT. Se utilizaron células de HC (HepG2, Hep3B y Huh7) sin transducir (control) o transducidas con AdsSPARC, AdasSPARC o Ad- $\beta$ Gal luego de 72hs post-transducción. ns, sin diferencias estadísticas B) Análisis de la apoptosis, mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, 72 hs post-transducción con Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC o AdasSPARC. \* $p < 0,05$  vs. Ad- $\beta$ Gal usando test de Mann-Whitney. C) Análisis de la apoptosis, mediante citometría de flujo con anexina V, 72 hs post-transducción con Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC o AdasSPARC. Experimento representativo de 4 ensayos \* $p < 0,05$ , test de Mann-Whitney.

Al no detectar cambios en la proliferación celular decidimos estudiar si la inhibición en el crecimiento de los esferoides podría justificarse por una inducción de la apoptosis. En consecuencia, se tiñeron las células tumorales de los distintos grupos con una mezcla de naranja de acridina/bromuro de etidio que permite distinguir las células apoptóticas por su fenotipo al microscopio. Dependiendo de la coloración observada y de la morfología nuclear se pueden diferenciar células vivas de necróticas y de células en un estadio de apoptosis temprano o tardío.

Esta técnica nos permitió determinar que la sobreexpresión de SPARC en células de HC solo produjo un leve aumento, aunque no significativo, de la apoptosis ( $108,4 \pm 28,6$  %,  $148,8 \pm 10,26$  %,  $75,57 \pm 18,43$  %; Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC o AdasSPARC, respectivamente) (**Figura 42B**). Para confirmar los datos obtenidos se utilizó otra técnica para el estudio de apoptosis, la tinción de Anexina V. Con esta técnica, más sensible, se observó un aumento significativo de la apoptosis en células con sobreexpresión de SPARC ( $85,19 \pm 9,6$  %,  $128,6 \pm 10$  %,  $62,4 \pm 1,8$  %; Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC o AdasSPARC, respectivamente) (**Figura 42C**).

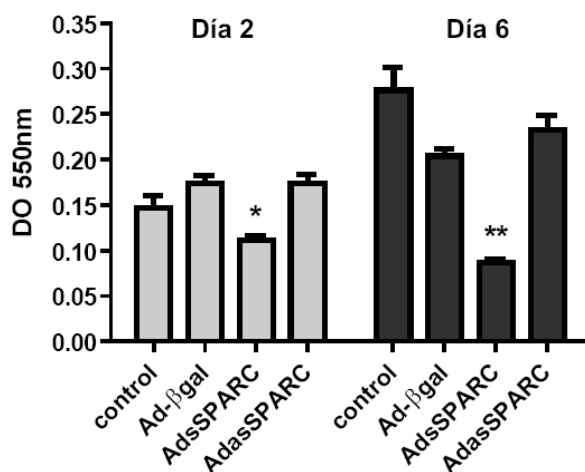
Para confirmar y caracterizar estos efectos y, teniendo en cuenta que SPARC puede actuar deteniendo el ciclo celular en G1 (Funk and Sage, 1991; Sage *et al.*, 1995), decidimos analizar en qué fase del ciclo celular se encontraban las células tratadas. Con este propósito se realizó un ensayo de citometría para evaluar el contenido de ADN. En la **Figura 43** se muestra un experimento, representativo de tres ensayos, que arrojó resultados similares, realizados con las células HepG2 a las 72 hs post-transducción con los vectores adenovirales. Como se puede observar en la **Figura 43**, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (En fase G1= 54,94%, 48,02% y 50,05%; en fase S = 39,37%, 41,42% y 38,49%; en fase G2= 5,69%, 10,56% y 11,45%; no transducidas, transducidas con Ad- $\beta$ gal o AdsSPARC, respectivamente). De la misma forma, se estudiaron las células Hep3B y tampoco se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones (En fase G1= 55,5%, 61% y 66%; en fase S = 35,6%, 31% y 24,5%; en fase G2= 8,9%, 7,2% y 9,1%; no transducidas, transducidas con Ad- $\beta$ gal o AdsSPARC, respectivamente). No se observaron diferencias sustanciales ni en proliferación ni en el estadio del ciclo en células de HC, con lo cual el aumento de la apoptosis observado por la técnica de Anexina V no parece ser crítico para el crecimiento celular dependiente de sustrato.



**Figura 43.** Fase del ciclo celular en que se encuentran las células HepG2 transducidas con AdsSPARC. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo 72hs post-infección de las células HepG2 con los vectores adenovirales. Sobre los gráficos se detalla el % obtenido en cada estadio del ciclo celular: G1, S y G2. Se grafica un experimento representativo de 3.

Los resultados encontrados hasta el momento se refieren al crecimiento celular dependiente de sustrato, por lo que a continuación nos propusimos analizar si la sobreexpresión de SPARC incide en el crecimiento independiente de sustrato y, además, de qué forma lo hace. Para ello se utilizó nuevamente el ensayo de crecimiento celular en esferoides. Las células HepG2 fueron utilizadas para el armado de los mismos y se estudió la proliferación y la apoptosis en este contexto. Para estudiar la viabilidad de los esferoides los mismos se disgregaron con tripsina y luego se realizó la técnica de MTT (como se describe en *Materiales y Métodos*). Contrariamente a los efectos observados al crecer las células en monocapa, se observó una reducción significativa de la proliferación en las células tratadas con AdsSPARC cuando las mismas conforman un esferoide (**Figura 44**). Como se puede observar en la **Figura 44** esta diferencia ya se observaba a los dos días del armado de los esferoides, aún cuando no hay diferencias significativas en el volumen entre el esferoide donde se sobreexpresa SPARC y los controles (**Figura 41A**). De la misma forma, se estudió la presencia de apoptosis por naranja de acridina/bromuro de etidio disociando los esferoides. En este caso no se observaron diferencias significativas.

De los resultados obtenidos en los experimentos mencionados, concluimos que la inhibición parcial del crecimiento en esferoides se debe a menor capacidad proliferativa independiente de sustrato.



**Figura 44.** La sobreexpresión de SPARC afecta el crecimiento de células de hepatocarcinoma independientemente de sustrato. Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de células crecidas en esferoides sin transducir (control) o transducidas con AdsSPARC, AdasSPARC o Ad-βGal. A día 2 o 6 se disgregaron los esferoides con tripsina y se evaluó la viabilidad celular. \*  $p < 0,05$  vs. control, \*\*  $p < 0,01$  vs. control, test de T-Student.

### **III.4 Inhibición de la capacidad migratoria y la capacidad de formar clones al sobreexpresar SPARC en células de hepatocarcinoma.**

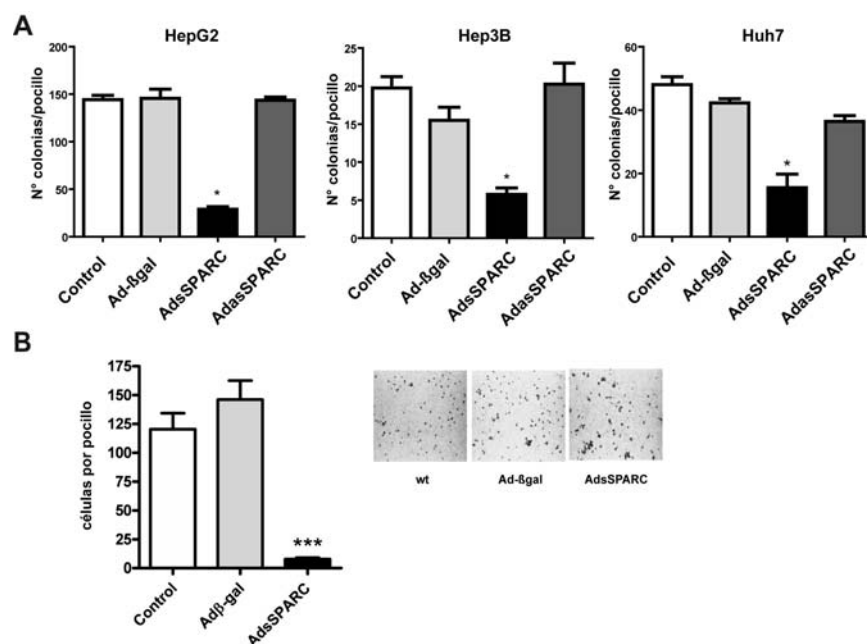
Otra propiedad relevante en el desarrollo tumoral es la capacidad de las células de invadir y generar metástasis. En este sentido, la capacidad de las células de formar clones es una característica de agresividad de las células tumorales. Para estudiar de qué forma la sobreexpresión de SPARC afecta la formación de colonias, las células transducidas se crecieron a muy baja densidad ( $1 \times 10^3$  células por placa de 60mm) en placas de cultivo. Luego de 15 días en cultivo, el número de colonias formadas por las células transducidas con AdsSPARC disminuyó significativamente en comparación con las células sin tratar o transducidas con Ad- $\beta$ gal (HepG2:  $29 \pm 2,64$  vs.  $145,7 \pm 6,67$  y  $144,3 \pm 4,48$ ; Hep3B:  $5,75 \pm 0,85$  vs.  $15,5 \pm 1,7$  y  $19,75 \pm 1,49$ ; Huh7:  $15,5 \pm 4,29$  vs.  $42,25 \pm 1,31$  y  $48 \pm 2,51$ ; AdsSPARC vs. Ad- $\beta$ gal y sin transducir, respectivamente) (Figura 45A).

Considerando que SPARC modula la capacidad de adhesión de algunas células tumorales (Murphy-Ullrich *et al.*, 1995), se estudió si el aumento de SPARC endógena puede afectar la adhesividad. Con este propósito, se realizó un ensayo de adhesión en el cual se puso a prueba la habilidad de las células para adherirse a fibronectina. Las evidencias preliminares indicaron que la sobreexpresión de SPARC disminuyó la capacidad de adhesión de las células tumorales (datos no mostrados). Si bien fue un resultado esperado debemos realizar más ensayos para confirmarlo.

Otro mecanismo central para el desarrollo tumoral y la generación de metástasis es la capacidad migratoria de las células tumorales. Se ha observado que SPARC puede tener efectos diversos en cuanto a cambios en la migración según el tipo celular, favoreciendo la migración en ciertos tumores, mientras que no induce cambios sustanciales en otros. En este sentido, Jacob y colaboradores demostraron que la presencia de SPARC promueve la migración y capacidad invasiva en células de cáncer de próstata (Jacob *et al.*, 1999). A su vez, en células de cáncer de mama se observó que si bien SPARC no estimula de forma directa la migración de las células tumorales sus propiedades anti-adhesivas colaboran en el proceso de migración y metástasis (Campo McKnight *et al.*, 2006). Sumado a estos trabajos se observó que la inhibición de SPARC en glioma tuvo como resultado una disminución de la capacidad migratoria e invasiva. Sin embargo, en otras líneas tumorales como células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-231, SPARC no influye en su migración (Seno *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de SPARC en la capacidad migratoria de células de HC

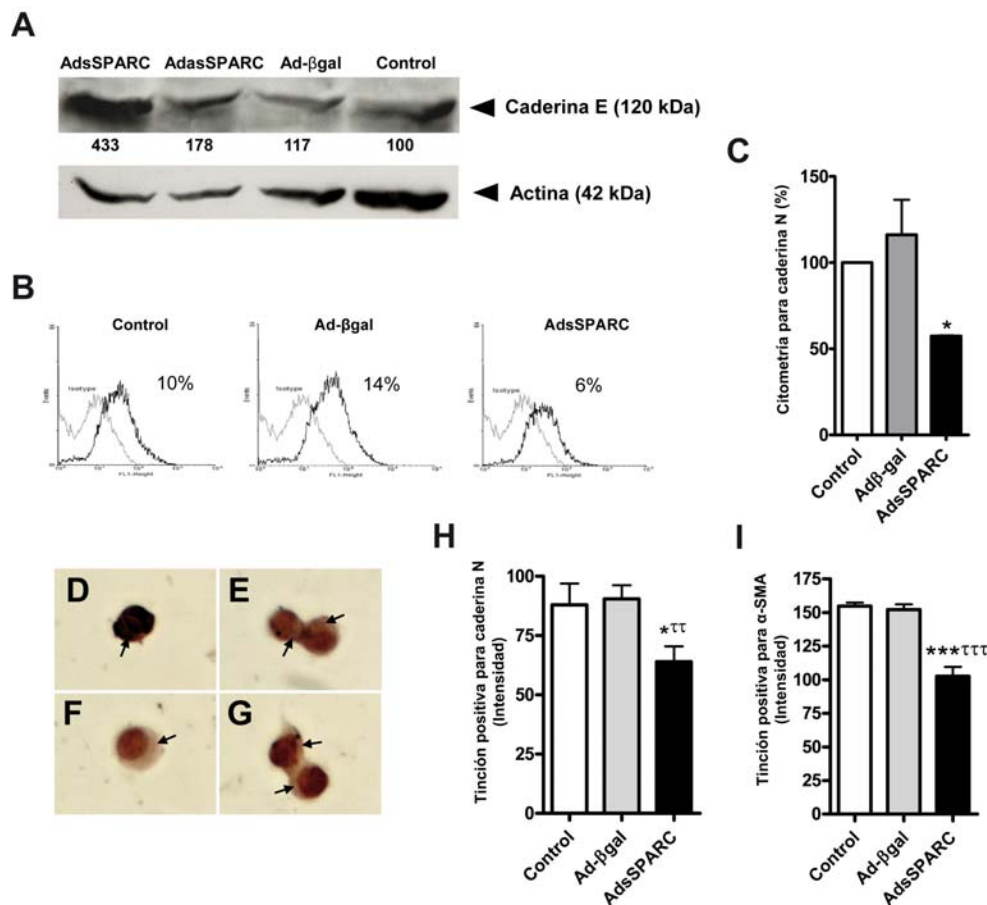
frente a TGF- $\beta$ 1, empleado como estímulo quimiotáctico. Con este fin se utilizó una cámara de migración de Boyden modificada, en el pocillo inferior se colocó el quimiotractante y en el pocillo superior las células sin tratar o transducidas en medio sin suero. Las células HepG2 tratadas con el vector AdsSPARC mostraron una disminución significativa de la capacidad migratoria en comparación a las células transducidas con Ad- $\beta$ gal o sin transducir (**Figura 45B**). La adhesión de las células a la membrana de polycarbonato utilizada en el ensayo de migración es la misma en las diferentes condiciones, por lo que las diferencias obtenidas no son consecuencia de adhesión diferencial (**Figura 45B**, microfotografías). Resultados similares se obtuvieron con otra línea de HC, Huh7, demostrándose que los efectos no son dependientes exclusivamente de un tipo celular determinado.

En resumen, los resultados de formación de colonias, adhesividad y migración sugieren que la sobreexpresión de SPARC disminuye la agresividad de las líneas tumorales estudiadas.



**Figura 45.** La sobreexpresión de SPARC disminuye la capacidad de las células de hepatocarcinoma para formar colonias así como también su capacidad migratoria. A) Ensayo de formación de colonias. Se cultivaron  $1 \times 10^3$  células en placas de pocillos de 6 durante 2 semanas; las colonias formadas se tiñeron con cristal violeta y se cuantificaron considerando como una colonia a grupos de 20-30 células. Se utilizaron células (HepG2, Hep3B y Huh7) sin tratar (control) o transducidas con Ad- $\beta$ gal, AdsSPARC y AdasSPARC. \* $p < 0,05$  vs. Control; Test de Mann-Whitney. B) Ensayo de migración en cámara de tipo Boyden, utilizando células HepG2 sin tratar o transducidas con Ad- $\beta$ Gal y AdsSPARC. Se utilizó 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 como quimioattractante. Luego de 16hs de incubación, las células que migraron se tiñeron y contaron. Microfotografías de las células adheridas a la cara superior de la membrana luego de 4 hs de incubación (células previas a migrar) y teñidas con May Grunwald-Giemsa donde se demuestra que la adhesión a la membrana utilizada en la migración es la misma independientemente del tratamiento. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control y Ad- $\beta$ gal; test de T-Student. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

Como se comentó en el apartado de introducción una de las características de las células tumorales que adquieren capacidad para diseminarse es el cambio de la expresión de caderinas, especialmente cambios que involucran la disminución de la expresión de caderina E y el aumento de la expresión de caderina N, dando lugar al proceso denominado de transición epitelio-mesenquimal (TEM) (Thiery, 2002). Las caderinas son moléculas involucradas en las interacciones célula-célula. La caderina E participa en el mantenimiento de la estructura epitelial de diversos tipos celulares, la inhibición de su expresión se asocia con un aumento en la expresión de caderina N, que induce en las células un fenotipo mesenquimal agresivo. En este sentido, se avanzó en el estudio de cambios en la expresión de moléculas involucradas en el mantenimiento del fenotipo mesenquimal. Con el objetivo de estudiar si los efectos provocados por la sobreexpresión de SPARC se relacionan con cambios en la expresión de caderina E y N, se realizaron ensayos de *Western blot* y citometría de flujo utilizando células HepG2 transducidas con el vector AdsSPARC o con Ad- $\beta$ Gal. Como resultado de estos estudios, se observó un aumento en la expresión de caderina E (**Figura 46A**) 3 días post-transducción, asimismo, se obtuvo una reducción del 50% en los niveles de expresión de caderina N presente en la membrana celular de las células tratadas con AdsSPARC comparado con los tratamientos control (**Figura 46B-C**). De forma similar, por inmunohistoquímica, se observó una inhibición en los niveles de caderina N al inducir la expresión de SPARC (**Figura 46D-H**). Para confirmar estos resultados se estudió otro marcador de células con fenotipo mesenquimal, la actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Consistentemente, en las células tratadas con AdsSPARC se observó una inhibición de  $\alpha$ -SMA (**Figura 46I**). En resumen, la sobreexpresión de SPARC en HepG2 produjo un aumento en la expresión de caderina E, así como la inhibición de la expresión de caderina N y  $\alpha$ -SMA, marcadores que describen una transición mesenquimal-epitelial (TME), sugiriendo que es posible reducir el fenotipo de agresividad de las células tumorales por esta vía.

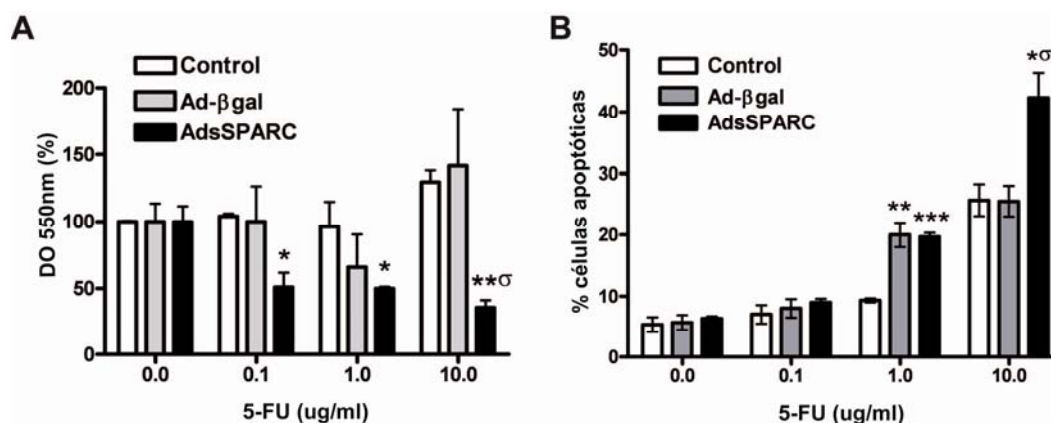


**Figura 46.** La sobreexpresión de SPARC en células de hepatocarcinoma induce la expresión de caderina E y disminuye caderina N y  $\alpha$ -SMA. A) Western blot para caderina E de extracto total de células HepG2 transducidas con AdSPARC, AdasSPARC o Ad-βgal, 72 hs post-infección. Se utilizó b-actina como control de carga. B) Análisis de la expresión de caderina N por citometría de flujo en células HepG2 72hs post-transducción con AdSPARC o Ad-βgal; % de células con tinción positiva. C) Análisis cuantitativo de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes similares al indicado en B. D,E,F,G) Inmunohistoquímica para caderina N de células HepG2 previamente transducidas con Ad-βGal (D,E) o con AdSPARC (F,G). H) Cuantificación del ensayo de inmunohistoquímica para caderina N. I) Inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA de células HepG2 previamente transducidas. Cuantificación de la tinción positiva. \*  $p < 0,05$ ,  $^{\tau}p < 0,01$ ,  $^{***\tau\tau\tau}p < 0,001$ ; \* vs. control,  $\tau$  vs. Ad-βgal. Test de T-Student.

### III.5 El aumento de la expresión de SPARC disminuye la viabilidad de las células de hepatocarcinoma y aumenta su susceptibilidad a la apoptosis en respuesta a quimioterapia

Una característica de las células de HC es que son naturalmente resistentes a las drogas quimioterapéuticas habituales, lo cual hace muy difícil obtener respuestas clínicas objetivas con los fármacos convencionales. La capacidad de SPARC de inducir apoptosis se ha propuesto como

uno de los mecanismos responsables de los efectos antitumorales observados en ciertos tumores como ovario y colon (Yiu *et al.*, 2001; Tang and Tai, 2007). En este último trabajo se demostró que SPARC induce apoptosis y aumenta la sensibilidad a quimioterapia mediante interacción con la pro-caspasa 8. Nos preguntamos entonces si la sobreexpresión de SPARC puede hacer a las células de HC más susceptibles a los agentes quimioterapéuticos. En esta tesis doctoral se estudiaron los efectos de dos fármacos como el 5-fluoruracilo (5-FU) y la adriamicina, en la proliferación y la inducción de apoptosis de células HepG2 tratadas con el vector AdSPARC. Efectivamente, observamos que la inducción de la expresión de SPARC aumentó la sensibilidad a 5-FU dado que se alcanzó una disminución de aproximadamente un 50% en la viabilidad celular (**Figura 47A**) y un aumento de la apoptosis de ~70% con 10 µg/ml 5-FU (**Figura 47B**). Por el contrario, no se observó ningún efecto al utilizar adriamicina.

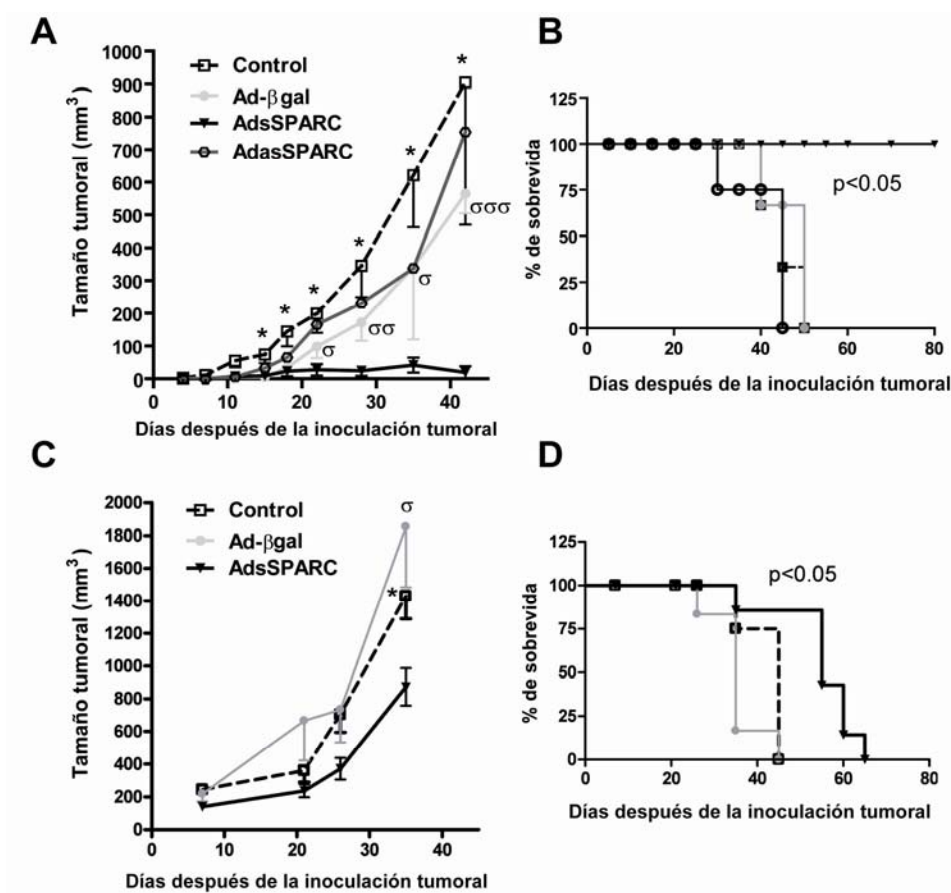


**Figura 47.** La sobreexpresión de SPARC disminuye la viabilidad y aumenta el grado de apoptosis de las células de hepatocarcinoma en respuesta a quimioterapia basada en 5-FU. A) Ensayo de viabilidad celular (MTT) de células HepG2 sin tratar o transducidas con AdSPARC o Ad-βgal. 48hs después de la transducción se incubaron las células con concentraciones crecientes de 5-FU durante 24hs y luego se analizó la viabilidad celular. B) Ensayo de apoptosis en células HepG2 sin tratar o transducidas con AdSPARC o Ad-βgal. 48hs post-transducción las células se incubaron con concentraciones crecientes de 5-FU durante 24 hs y luego se analizó apoptosis por naranja de acridina/bromuro de etidio. Se representa el % de células apoptóticas. \* vs. Control; σ vs. Ad-βgal. \*σ p<0,05; \*\*σ p<0,01; \*\*\*σ p<0,001. Test de T-Student.

### III.6 La sobreexpresión de SPARC inhibe la capacidad tumorigénica de células de hepatocarcinoma

En vista de los datos obtenidos en los experimentos realizados *in vitro*, se procedió a realizar estudios *in vivo* donde modulamos la expresión de SPARC en las células de HC. Se exploró la capacidad de dos líneas de HC, HepG2 y Huh7, para establecer tumores en ratones *nude* al

inducir la expresión de SPARC. Las células tumorales fueron infectadas *in vitro* y luego de 48 hs se inyectaron de forma subcutánea en ratones *nude*. La evolución del tamaño tumoral fue monitorizada en el tiempo. Observamos que los ratones *nude* inyectados con células HepG2 sin transducir desarrollaron tumores con volúmenes de 500-600 a 900mm<sup>3</sup> luego de 40 días. Por el contrario, la sobreexpresión transitoria de SPARC en células HepG2 inhibió significativamente el crecimiento tumoral (el máximo volumen tumoral promedio obtenido fue de 30mm<sup>3</sup>) (Figura 48A) y aumentó la supervivencia de los animales así tratados (test de “log-rank”  $p<0,05$ ) (Figura 48B). Pudimos observar que las células tratadas con el vector AdasSPARC, que inhibe la expresión de SPARC, no producen ningún cambio en el crecimiento tumoral; resultados similares se obtuvieron al utilizar la línea Huh7 (Figura 48C-D).

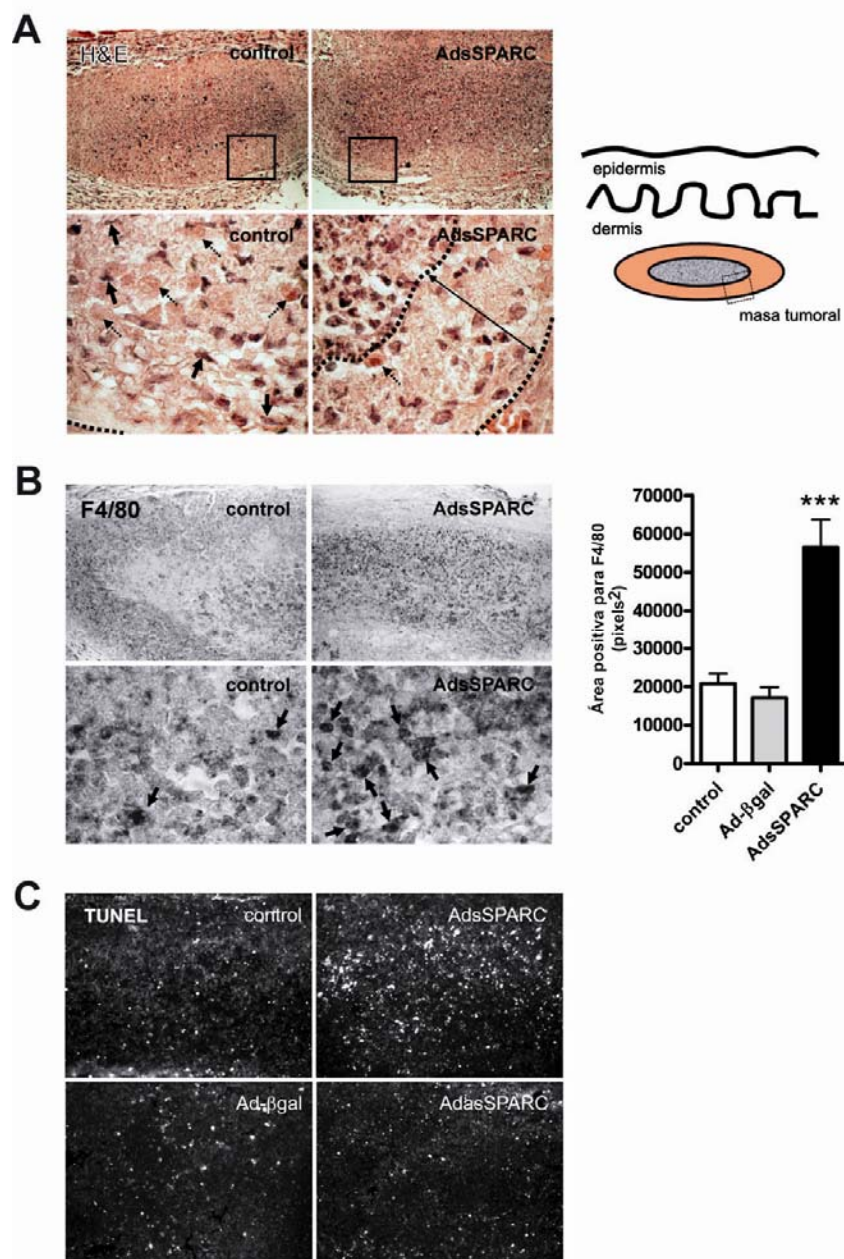


**Figura 48.** La sobreexpresión de SPARC reduce la capacidad tumorigénica *in vivo* de las células de hepatocarcinoma. A, C) Ratones *nude* fueron inoculados de forma sub-cutánea con  $1,5 \times 10^6$  células HepG2 (A) o  $5 \times 10^6$  células Huh7 (C) sin tratar o transducidas con AdsSPARC, AdasSPARC o Ad-βGal. Durante 42 días se midió el volumen tumoral. \*vs. Control; σ vs. Ad-βgal. \*,σ  $p<0,05$ ; \*\*,σσ  $p<0,01$ ; σσσ  $p<0,001$ . Test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. B, D) Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de animales tratados con células HepG2 (B) o Huh7 (C); test de log-rank.

Los estudios histológicos de los tumores mostraron diferencias sustanciales entre los distintos tratamientos. En primer lugar, en la tinción de H&E, se observó que los tumores no transducidos con AdSPARC conforman una especie de anillo de células tumorales viables, sin embargo, los tumores generados por las células HepG2 que sobreexpresan SPARC muestran una reducción de esta región de células tumorales en comparación a los controles (**Figura 49A**). A su vez, también se observa una reducción del número de células con morfología fibroblástica en los tumores generados con células HepG2 que sobreexpresan SPARC. Los fibroblastos asociados al tumor (CAF, *cáncer associated fibroblasts*) regulan muchos aspectos del proceso tumorigénico, como el crecimiento tumoral y la invasión. Los CAFs secretan citoquinas y factores que pueden estimular angiogénesis, ejercer un efecto parácrino sobre las células tumorales y aquellas presentes en el estroma tumoral y actuar en la inmunidad tumoral (Rasanen and Vaheri, 2010). Por lo tanto, conociendo la importancia de los fibroblastos en la progresión tumoral, podemos especular que una disminución de estas células se asocie a mejor pronóstico. Restan realizar experimentos para poder confirmar esta hipótesis.

### **III.7 Las células de hepatocarcinoma que sobreexpresan SPARC muestran un incremento de la apoptosis *in vivo* y un aumento del infiltrado de macrófagos**

Como mostramos previamente parece haber más muerte celular por apoptosis en los tumores que sobreexpresan SPARC. Esto nos motivó a estudiar la apoptosis *in vivo* empleando la técnica de TUNEL. Como resultado de estos estudios pudimos observar que se generó un mayor número de eventos apoptóticos en tumores obtenidos con células HepG2 transducidas con el vector AdSPARC (**Figura 49C**). Por otro lado, considerando la importancia de los macrófagos en la progresión tumoral se estudió de qué forma pueden estar involucrados en los cambios observados *in vivo*. De manera interesante, por inmunohistoquímica se observó que el número de macrófagos (células F4/80<sup>+</sup>) fue significativamente superior en los tumores generados por células HepG2 y transducidas *in vitro* con el vector AdSPARC en comparación con los controles (área positiva para F4/80: 56463±7209 vs. 17072±2767 vs. 20785±2634 pixels<sup>2</sup>; AdSPARC vs. Ad-βgal vs. Control; p<0,001; **Figura 49B**). Este fenómeno observado podría ser consecuencia del aumento de la apoptosis de las células tumorales.



**Figura 49.** La inhibición del crecimiento tumoral inducido por la sobreexpresión de SPARC se asocia a un aumento del infiltrado de macrófagos. A) Tinción de H&E de tumores extraídos de los ensayos *in vivo*. Se observa una reducción del anillo tumoral en tumores desarrollados en el grupo donde se inocularon células HepG2 transducidas con AdSPARC. Las flechas negras indican células con fenotipo fibroblástico, las flechas punteadas señalan células tumorales. B) Microfotografía representativa de la inmunohistoquímica para F4/80 (tinción para macrófagos) 5 días post inoculación de células HepG2 sin transducir o transducidas con AdSPARC (panel superior 100X, panel inferior 400X). El gráfico muestra la cuantificación de las áreas positivas (medias  $\pm$  error medio) para la tinción de F4/80; \*\*\*  $p < 0,001$ , \* vs. Control. Test de Mann-Whitney. C) Ensayo de TUNEL para determinar apoptosis *in vivo*. Microfotografías representativas de tumores 5 días post-inoculación de células HepG2 sin transducir o transducidas con AdSPARC, Ad-βGal y AdasSPARC.

## ***DISCUSIÓN***

## PARTE 1

---

Este trabajo de tesis doctoral se enfocó, en este apartado, en estudiar la relación entre SPARC y la fibrosis hepática. Los resultados obtenidos en los modelos animales sugieren que SPARC desempeña un papel central en la fibrogénesis hepática. Así lo demuestran los efectos obtenidos en el modelo preventivo del desarrollo de fibrosis en ratas y los estudios realizados con ratones SPARC *null*.

Se han comunicado múltiples abordajes para el tratamiento de la fibrosis experimental (Bataller and Brenner, 2005), incluso algunos de ellos implican el empleo de herramientas de terapia génica (Prieto *et al.*, 2004). Estas estrategias terapéuticas se han diseñado contra una variedad de blancos hepáticos tales como la inhibición de la activación de las CEH, la estimulación de la degradación del colágeno fibrilar, la reducción de la inflamación o la modulación de diferentes citoquinas con funciones críticas para la fibrogénesis como TGF- $\beta$ 1 (Bataller and Brenner, 2005; Gressner *et al.*, 2002; Dai and Jiang, 2001). Si bien algunas no han sido totalmente exitosas, otras presentan resultados al menos prometedores. En este estudio utilizamos una estrategia de terapia génica para inhibir la expresión del ARNm para SPARC utilizando un adenovirus de primera generación, de tipo no replicativo. Los adenovirus no replicativos han sido utilizados en numerosos ensayos tanto pre-clínicos como clínicos para transferir genes al hígado (Wilson, 2001b; Ilan *et al.*, 1999a; Yu *et al.*, 2002b). En particular, el adenovirus de tipo 5 tiene un tropismo natural por el hígado pudiendo infectar con alta eficiencia tanto células parenquimatosas como no parenquimatosas, incluyendo las CEH (Garcia-Banuelos *et al.*, 2002b; Yu *et al.*, 2002b). Tanto los hepatocitos como las CEH expresan el receptor responsable de la unión e internalización de los adenovirus tipo 5, receptor de coxsackie (CAR). Por lo tanto, si bien el tropismo hepático resulta una barrera en la aplicación de estos virus para el tratamiento de diversas enfermedades, es una ventaja para el tratamiento de trastornos hepáticos y puede ser empleado de forma relativamente segura y eficiente para la transferencia génica en hepatología.

En esta parte del trabajo se empleó un adenovirus con la secuencia antisentido de SPARC para inhibir la expresión de SPARC en hígados de ratas tratadas con TAA. El modelo de administración de TAA es un modelo establecido para generar fibrosis y cirrosis en diferentes modelos murinos (Muller *et al.*, 1988; Oren *et al.*, 1996). En nuestro caso decidimos emplear una estrategia de tipo preventiva aplicando el adenovirus conjuntamente con el inicio de la

administración de TAA. Con el objetivo de incrementar la eficacia de la transducción hepática se realizó una segunda administración del vector terapéutico directamente por vía intrahepática 7 días después de la primera dosis. Es importante destacar que la expresión de los adenovirus de primera generación es transitoria, es decir, la inhibición de SPARC no se da de forma estable, tanto por ser un vector que no se inserta en el genoma del huésped como por la respuesta inmunitaria humoral y celular que se genera frente a las proteínas virales (especialmente de la cápside). Dos días después de la primera dosis del adenovirus AdasSPARC se pudo alcanzar una inhibición de aproximadamente el  $50\pm 15\%$  evaluada por qPCR. La inhibición de SPARC luego de la segunda administración se mantuvo ( $44\pm 14\%$ ) aun teniendo en cuenta que la respuesta inmunitaria antiviral fue más intensa. Si bien no se siguió analizando la expresión de SPARC, en el tiempo no se espera que el virus inhiba de forma estable la expresión de SPARC. Sin embargo, este efecto inicial fue suficiente para proteger a los animales tratados del desarrollo de fibrosis inducido por TAA. La disminución de la expresión de SPARC luego de 7 semanas de tratamiento no se debe a una inhibición directa de SPARC sino que podría explicarse por la menor expresión de SPARC en hígados con menos fibrosis, en comparación con los animales WT.

La administración del vector AdasSPARC previene el desarrollo de la fibrosis en este modelo experimental. Los animales tratados con el vector AdasSPARC mostraron una disminución de la actividad necroinflamatoria, disminución en el grado de desarrollo de la fibrosis y disminución del número de CEH activadas luego de tratamientos prolongados con TAA.

También pudimos demostrar claramente que la terapia anti-SPARC disminuyó los depósitos de colágeno estudiados por rojo Sirio y por una técnica cuantitativa para hidroxiprolina. El control de la formación de fibras de colágeno es un paso crítico en la fibrogenesis. En este sentido, en el grupo de animales tratados con el vector AdasSPARC las fibras de colágeno fueron finas, dispersas e inmaduras en comparación con las fibras maduras y compactas presentes en los animales tratados con el vector no terapéutico o en los que recibieron solución salina.

Estos resultados fueron confirmados en un modelo genético en ratones SPARC *null*. Los ratones SPARC *null* expuestos a injuria crónica con TAA desarrollaron un grado de fibrosis sustancialmente menor que los ratones WT. Estos animales presentaron una disminución significativa del grado de fibrosis, con hígados con menores depósitos de colágeno, fibras de colágeno en estado inmaduro y disminución en la expresión de ARN mensajero de colágeno. En resumen, la ausencia de SPARC no solo trae consecuencias en el ensamblado y la maduración de

las fibras de colágeno sino también en la síntesis de colágeno. Estos resultados apuntan a una relación estrecha entre SPARC y colágeno. Nuestros resultados son consistentes con los datos previos que postulan que SPARC puede regular la expresión y maduración del colágeno (Francki *et al.*, 1999; Rentz *et al.*, 2007).

Otro punto importante de discusión es el efecto de SPARC en el proceso inflamatorio hepático. El daño producido por el tratamiento con TAA induce una necrosis severa de hepatocitos y, consecuentemente, un aumento en el infiltrado inflamatorio. Los animales tratados con el vector AdasSPARC mostraron una disminución significativa del infiltrado inflamatorio medido por el índice de Knodell; esto conduce a pensar que los efectos anti-fibróticos del vector AdasSPARC pueden estar mediados, al menos en parte, por disminución de la inflamación producida por TAA. Nuevamente, estos datos fueron corroborados en los ratones SPARC *null* tratados con TAA, que presentaron menor actividad inflamatoria.

La mayor parte de las estrategias antifibróticas apuntan a modular factores profibrogénicos producidos por las CEH activadas. De hecho estas células son, hasta ahora, las principales células involucradas en el proceso fibrogénico. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que las CEH activadas expresan SPARC (Nakatani *et al.*, 2002a; Blazejewski *et al.*, 1997b; Frizell *et al.*, 1995b), sugiriendo un papel activo de SPARC en la activación o en los mecanismos que se disparan en respuesta a la activación de las CEH. En este trabajo se estudió por inmunohistoquímica la expresión de  $\alpha$ -SMA, marcador de CEH activadas, 7 semanas luego de la primera dosis de AdasSPARC. De manera interesante, en paralelo con la inhibición de la fibrosis, de la producción de colágeno y de la actividad inflamatoria observamos una reducción del número de CEH activadas. Los resultados en ratones SPARC *null* también son contundentes en este aspecto; la ausencia de SPARC se asocia a una disminución de la activación de las CEH en el hígado sometido a injuria crónica. En este sentido, se sabe que las CEH activadas producen citoquinas y quimiocinas inflamatorias (Maher *et al.*, 1998), sugiriendo que la disminución de la actividad inflamatoria podría ser consecuencia directa de la disminución de CEH activadas.

En esta tesis no se ha estudiado como afecta la modulación de la expresión de SPARC a la activación/proliferación de otras células involucradas en la respuesta a injuria hepática, como son las células de Kupffer o células epiteliales biliares. Sin embargo, sería importante tenerlo en cuenta en investigaciones futuras.

Con el objeto de estudiar si las CEH son la principal fuente de SPARC se realizó una doble inmunofluorescencia de SPARC y  $\alpha$ -SMA. Se observó colocalización en la tinción de SPARC y  $\alpha$ -SMA en la región perisinusoidal en células con fenotipo de CEH tanto en animales tratados con solución salina como en animales tratados con Ad $\beta$ -gal. La tinción positiva de  $\alpha$ -SMA en miofibroblastos periportales y pericentrales no presentó colocalización con SPARC. La disminución de CEH positivas para SPARC en animales tratados con AdasSPARC, también explica, al menos en parte, la atenuación de la generación de la fibrosis.

Los resultados obtenidos en los estudios de la expresión de SPARC en ratones WT, tanto en la fibrosis inducida por TAA como por ligadura del conducto colédoco, son similares. Queda claro que se induce la expresión de SPARC frente a la injuria hepática; interesante la inducción de la expresión (expresión de ARNm para SPARC) es temprana ya que se observa aún sin fibrosis establecida (ratones tratados con TAA por 2 semanas) y se mantiene en el tiempo. Aunque no pudimos realizar estudios de colocalización con  $\alpha$ -SMA en ratones, las células SPARC positivas parecen no ser solo CEH sino también células del endotelio sinusoidal. En efecto, Sage y colaboradores la han descrito como una proteína producida por células endoteliales (Sage *et al.*, 1981).

La relación entre SPARC y TGF- $\beta$ 1 es uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de la fibrosis en general y de la hepática en particular. Como ya se ha comentado, TGF- $\beta$ 1 es una citoquina multifuncional con importantes efectos profibrogénicos (Framson and Sage, 2004). SPARC presenta la capacidad de estimular la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 por interacción con el receptor para TGF- $\beta$ 1 (Schiemann *et al.*, 2003). De hecho, los ratones SPARC *null* presentaron una disminución de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en células mesangiales que es restituida con el agregado de la proteína SPARC (Francki *et al.*, 1999). En este trabajo se probó que los ratones SPARC *null* tratados con TAA producen niveles significativamente menores de TGF- $\beta$ 1 medidos tanto por ELISA en suero como por qPCR del ARN extraído de tejido hepático. Postulamos, entonces, que la disminución de la expresión de SPARC afecta la producción de TGF- $\beta$ 1; esto podría, a su vez, producir una menor expresión de SPARC generándose una retroalimentación negativa. Los resultados sugieren que la menor expresión de TGF- $\beta$ 1 puede explicar la disminución del número de CEH activadas y los efectos antifibróticos observados. Estos hallazgos pueden ser los responsables, al menos en parte, de la atenuación de la fibrosis. De hecho, en la literatura se han utilizado diferentes estrategias antifibróticas enfocadas a inhibir TGF- $\beta$ 1, como la administración

del receptor soluble para TGF- $\beta$ 1 tipo II o la transferencia génica de una forma truncada de este receptor (Yata *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2000). Estos estudios demuestran que la disminución de TGF- $\beta$ 1 conlleva menor fibrogénesis en modelos experimentales.

Todos los resultados presentados en la primera parte de esta tesis apoyan estudios previos que demuestran que SPARC se encuentra involucrada en el proceso de fibrogénesis de otros órganos como pulmón, riñón y piel (Francki *et al.*, 1999; Pichler *et al.*, 1996; Kuhn and Mason, 1995; Strandjord *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005). Finalmente, nuestras observaciones, tanto en rata como en ratón, aportan información complementaria a los estudios que comunican sobreexpresión de SPARC en hígados con fibrosis (Nakatani *et al.*, 2002a; Blazejewski *et al.*, 1997b; Frizell *et al.*, 1995b).

La actividad de SPARC es compleja, los mecanismos mediante los cuales SPARC ejerce sus efectos y las rutas de transducción de señales no están bien definidos. La biología de SPARC es complicada teniendo en cuenta que SPARC produce distintos efectos dependiendo del órgano y del sistema donde se encuentre involucrada. A todo esto se le suma la complejidad inherente al desarrollo de fibrosis hepática. En la segunda parte de este trabajo se profundizó en el efecto de SPARC en cultivos de CEH para poder comprender aun más los mecanismos involucrados.

Los ratones SPARC *null* nos permitieron estudiar el modelo en ausencia completa de SPARC; sin embargo, la estrategia de terapia génica utilizando vectores adenovirales se acerca más a una herramienta terapéutica real. En este sentido en el trabajo se desarrolló una estrategia preventiva ya que el adenovirus se utilizó de forma conjunta con el inicio del daño hepática. Si bien los resultados son alentadores es necesario determinar si una cirrosis establecida puede ser revertida o atenuada mediante la inhibición de SPARC. En esta dirección, el desarrollo de vectores de expresión prolongada como los vectores adenovirales asociados (AAV) o adenovirus de expresión prolongada (*gutless*), contribuiría sustancialmente al diseño de terapias futuras más eficaces.

## PARTE II

---

Los resultados obtenidos en la primera etapa de la tesis nos condujeron a estudiar el mecanismo subyacente a los efectos antifibróticos de la inhibición de SPARC. Sabiendo, por bibliografía y por los resultados obtenidos, que SPARC se induce en CEH frente a la injuria hepática decidimos utilizar líneas establecidas de CEH así como también establecer un cultivo primario de CEH de rata para estudiar los efectos *in vitro* de la inhibición de SPARC. Con este objetivo se utilizaron ARN de interferencia específicos que resultaron una herramienta más potente que el adenovirus con la secuencia antisentido para SPARC en estudios *in vitro*.

Al inhibir SPARC no se observaron diferencias significativas en la proliferación ni en la apoptosis de las CEH. Por el contrario, la inhibición de SPARC en las dos líneas de CEH y en el cultivo primario aumentó su capacidad de adhesión y redujo significativamente su capacidad migratoria en respuesta a estímulos quimiotácticos potentes. El papel de SPARC en la migración celular ha sido reportado en fibroblastos y en algunas células tumorales (Wu *et al.*, 2006; Podhajcer *et al.*, 2008a). Sin embargo, no existen estudios realizados en CEH. Estas observaciones nos permiten especular que la inhibición de SPARC en las CEH, al afectar el proceso de migración, disminuiría la acumulación de CEH en los sitios de injuria. De esta forma, demostramos por primera vez, que SPARC podría contribuir al proceso fibrogénico facilitando el reclutamiento de CEH a sitios de lesión e inflamación.

De manera interesante, se demostró que la inhibición de SPARC reduce los niveles de TGF- $\beta$ 1. En coincidencia con los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo demostramos que SPARC es un potente estimulador de la síntesis y secreción de TGF- $\beta$ 1 en CEH. Creemos que, al menos parte de los efectos antifibróticos de SPARC encontrados *in vivo* están relacionados con la disminución de TGF- $\beta$ 1; como se ha desarrollado en la introducción de este trabajo TGF- $\beta$ 1 es crucial en la fibrogénesis, en particular en la transdiferenciación al fenotipo activado de las CEH y posee efectos pleiotrópicos en la fibrosis (Gressner and Weiskirchen, 2006). Se ha demostrado que la vía de Smad3 induce el aumento de los depósitos de colágeno y produce incremento de las fibras de estrés de  $\alpha$ -SMA (Uemura *et al.*, 2005). En este trabajo, observamos que la inhibición en la producción TGF- $\beta$ 1 está relacionada con los efectos encontrados en la migración. La reducción en la capacidad migratoria de las CEH al inhibir SPARC fue restaurada al preincubar las células con TGF- $\beta$ 1 sugiriendo la importancia de esta citoquina en el proceso migratorio. Si bien es cierto que

el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 restaura la expresión de SPARC en las células con ARN de interferencia, esta restauración es solo parcial, por lo que proponemos que la restauración de la capacidad migratoria estaría relacionada con otros mecanismos independientes de SPARC.

TGF- $\beta$ 1, como citoquina profibrogénica, estimula la síntesis de colágeno en CEH (Gressner *et al.*, 2002). La reducción en la producción de TGF- $\beta$ 1 encontrada al inhibir SPARC puede estar estrechamente relacionada con la reducción de síntesis del ARNm para colágeno observada *in vivo* e *in vitro* en este trabajo. La inhibición de SPARC disminuyó la síntesis de colágeno tanto en la línea LX2 como en el cultivo primario de CEH. En este sentido, Zhou y colaboradores demostraron en fibroblastos dérmicos que la inhibición de SPARC lleva a la reducción de la expresión de colágeno (Zhou *et al.*, 2005). Otro trabajo recientemente publicado confirma nuestros resultados en fibroblastos obtenidos de ratones TBR1, donde el receptor para TGF- $\beta$ 1 esta constitutivamente activo (Wang *et al.*, 2010). En la línea CFSC-2G donde la inhibición de SPARC fue cercana al 50% la disminución de la síntesis de colágeno no es significativa, sin embargo al estimular las células con TGF- $\beta$ 1 la síntesis de colágeno aumento con menor intensidad en las células con inhibición de SPARC, estos resultados sugieren que la inhibición de SPARC confiere resistencia a la actividad profibrogénica de TGF- $\beta$ 1.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los cambios de expresión de genes al inhibir SPARC realizamos un arreglo de genes para qPCR. Observamos, en el arreglo de genes analizados, el aumento en la expresión de varios genes involucrados en procesos de interacción células-MEC. Consistentemente, las células tratadas con ARN de interferencia para SPARC aumentaron su capacidad adhesiva al sustrato. El aumento de la adhesividad también explica, al menos en parte, la disminución de la migración. Además, se observó que el patrón de fibras de actina se alteró al inhibir la expresión de SPARC, este hecho seguramente se relaciona con el fenotipo migratorio observado en las CEH tratadas.

Si bien encontramos sobreexpresión de algunos colágenos en células tratadas con ARNi, no son aquellos que usualmente se encuentran presentes en las fibras durante la fibrogénesis hepática (Inagaki and Okazaki, 2007). Se encontró aumento en los niveles de expresión de varias metaloproteinasas al inhibir SPARC. Las metaloproteinasas son enzimas capaces de disgregar la MEC, por lo tanto el aumento en su expresión podría contribuir con los efectos antifibróticos observados al inhibir SPARC. En particular, se observó un aumento en la expresión de MMP-13; este gen merece una mención especial por su importancia en la resolución de la fibrosis. MMP-13

es una metaloproteinasa fibrolítica ampliamente estudiada en la fibrosis hepática. El desarrollo de la fibrosis se asocia con disminución MMP-13. Nosotros observamos aumento de la expresión de este gen al inhibir SPARC. De hecho, el aumento de la lisis de colágenos fibrilares (I y III) por MMP intersticiales (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) es uno de los mecanismos planteados para la resolución de la fibrosis (Arthur, 2002). Solo dos enzimas con función metaloproteinasa, MMP12 y Adamts2, disminuyeron su expresión en las células tratadas con el ARN de interferencia para SPARC; sin embargo, se reportó anteriormente que los niveles de expresión de estas dos enzimas se inducen durante el proceso de activación de las CEH tanto *in vitro* como *in vivo* (De Minicis *et al.*, 2007).

De todos los genes sobreexpresados en las células tratadas, Adamts8 fue el de mayor sobre-expresión. Esta proteína también llamada “A *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 8*” contiene un dominio metaloproteinasa, un dominio tipo desintegrina y un motivo tipo I trombospodina. Posee capacidad de interacción con múltiples proteínas y actividad endopeptidasa (Vazquez *et al.*, 1999). Considerando la importancia de TGF- $\beta$ 1 en la biología de las CEH activadas, el aumento de Adamts8 y otras metaloproteinasas puede estar relacionado con la reducción de los niveles de TGF- $\beta$ 1 secretados, ya que esta citoquina requiere de un clivaje primero intracelular y luego extracelular para adquirir su forma activa (Kisseleva and Brenner, 2008). Sin embargo, la significancia biológica del aumento de expresión de Adamts8 en el contexto de la fibrosis hepática requiere más investigación.

A pesar de lo expuesto, el resultado más interesante que surge del análisis del patrón de expresión de las CEH tratadas con ARN de interferencia para SPARC es el aumento de la expresión de caderina E junto con la significativa disminución en la expresión de caderina N. En general, la expresión de caderina N de forma conjunta a la inhibición de la expresión de caderina E está directamente relacionada con el proceso de transición epitelio-mesenquimal (Wells *et al.*, 2008). En este sentido, la relación entre la activación de las CEH y el fenómeno de transición epitelio mesenquimal ha sido desarrollado por Lim y colaboradores, quienes demostraron un cambio de la expresión de caderina E a caderina N durante la activación de las CEH tanto *in vitro* como *in vivo* (Lim *et al.*, 2007). Dado que se ha demostrado que la expresión de caderina N es un marcador de CEH activadas concluimos que la inhibición de SPARC en estas células resulta en una inhibición, al menos parcial, del proceso de activación de las CEH. Este fenómeno seguramente influya sobre la capacidad migratoria, ya que las células con un fenotipo epitelial carecen de la capacidad migratoria presentes en células mesenquimales.

En relación a estas observaciones, TGF- $\beta$ 1 posee un rol de inductor de la transición epitelial a mesenquimal, necesaria para que las CEH adquieran mayor actividad migratoria (Xu *et al.*, 2009; Gressner *et al.*, 2002). Además ha sido descrito que la expresión de caderina E antagoniza la inducción de TGF- $\beta$ 1 en CEH inhibiendo la fosforilación de Smad3 dependiente de RhoA (Cho *et al.*, 2010). En otras palabras, la inhibición de TGF- $\beta$ 1 contribuiría al cambio de fenotipo de las CEH y a su vez la expresión de caderina E podría inhibir la producción de TGF- $\beta$ 1. Los resultados obtenidos en esta tesis no nos permiten asegurar que SPARC induzca la transformación mesenquimal en forma directa o ejerza su efecto a través de TGF- $\beta$ 1.

En resumen, la inhibición de SPARC en CEH activadas tiene efectos antifibróticos mediados por la reducción en su capacidad de migración a sitios de injuria y disminución de la expresión de colágeno tipo I. Aunque resta profundizar en el tema, las deficiencias en la migración podrían explicarse parcialmente por la inducción de cambios en la transición mesenquimal-epitelial. Además, se encontró un aumento en la adhesión celular y alteraciones en el citoesqueleto de actina, que también participarían de los mecanismos que conducen a generar CEH menos activadas y, por ende, menos fibrogénicas. La sobreexpresión de varios genes involucrados en la adhesión a MEC podrían explicar los cambios en el fenotipo observado. Finalmente, parece existir una estrecha relación entre estos cambios y la reducción de la expresión de TGF- $\beta$ 1, pero para poder definir el papel de TGF- $\beta$ 1 en la inhibición de la migración resta estudiar proteínas presentes en la cascada de señales de TGF- $\beta$ 1.

### PARTE III

---

En este trabajo obtuvimos, por primera vez, evidencias concluyentes acerca del papel de SPARC en el potencial tumorigénico del HC humano. La sobreexpresión transitoria de SPARC en células de HC resultó en un cambio hacia un fenotipo tumoral menos agresivo. En resumen, el aumento de SPARC endógena en células HepG2 produjo: i) reducción en la capacidad de formar esferoides en cultivo y disminución de la proliferación independiente de sustrato; ii) disminución de la capacidad migratoria de las células en respuesta al estímulo quimiotáctico de TGF- $\beta$ 1 y en la formación de colonias; iii) una inhibición de la transición epitelio-mesenquimal (TEM) dado por un aumento de la expresión de caderina E conjuntamente con una disminución en la expresión de caderina N; iv) mayor susceptibilidad a quimioterapia basada en 5-FU; v) inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* y aumento de la supervivencia de los animales. Los efectos observados no son dependientes de una línea celular en particular ya que muchos de los resultados obtenidos fueron verificados en otras dos líneas de HC (Hep3B y Huh7).

El HC es una enfermedad compleja, generalmente es consecuencia del establecimiento de anomalías genéticas en las células tumorales que afectan distintas vías de señalización implicadas en la regulación del crecimiento celular; también es el resultado de la interacción de las células tumorales con factores provenientes del microambiente tumoral (Avila *et al.*, 2006). En este contexto, decidimos estudiar el papel de SPARC, una glicoproteína de MEC con una función regulatoria compleja asociada con cambios en la agresividad tumoral en varios cánceres de origen humanos (Podhajcer *et al.*, 2008a; Arnold and Brekken, 2009). SPARC es una proteína con funciones duales; así lo reflejan distintos trabajos científicos en donde se describen efectos contrapuestos acerca del papel de SPARC en el comportamiento tumoral. Si bien SPARC se expresa en células tumorales, también lo hace en fibroblastos y en células endoteliales del tumor. Esto hace que SPARC sea importante no solo expresada por las células tumorales sino también cuando procede del microambiente tumoral (Haber *et al.*, 2008). Aunque se ha estudiado la función de SPARC en distintos tipos de cáncer, poco se sabe de su papel en hepatocarcinogénesis. Observamos que SPARC se sobreexpresa en hígados cirróticos, entorno en el que surgen el 80-90% de los HC. A su vez, Le Bail y colaboradores reportaron su expresión en el estroma del HC (Le Bail *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en el trabajo citado sugieren que, en este tipo de tumor, SPARC endógena tiene un efecto negativo en el crecimiento tumoral.

Para estudiar los efectos de la sobreexpresión de SPARC en HC se utilizó un vector adenoviral para la transferencia de la secuencia sentido de SPARC (vector AdsSPARC). Como hemos comentado anteriormente, si bien hay muchos vectores virales utilizados en terapia génica, los adenovirus han sido ampliamente usados para la transferencia de genes al hígado y para tratar experimentalmente el HC (Wilson, 2001a; Ilan *et al.*, 1999b; Yu *et al.*, 2002a). En particular, el adenovirus tipo 5 tiene la capacidad de infectar células del parénquima hepático y provenientes del HC con alta eficiencia (Yu *et al.*, 2002a; Garcia-Banuelos *et al.*, 2002a).

Se ha reportado previamente que SPARC puede inducir la inhibición de la proliferación en células tumorales (Framson and Sage, 2004), arrestando el ciclo celular en fase G0. Los mecanismos de inhibición han sido asociados con alteraciones en la vía de señalización de factores de crecimiento, entre ellos se incluyen diversos mecanismos tales como: interacción con el receptor de PDGF (Raines *et al.*, 1992) produciendo una inhibición de MAPK (*Mitogen-Activated Protein kinase*), inactivación de CDK2 (*cyclinE-Cyclin Dependent Kinase 2*), inhibición de la ciclina A, activación de Rb (Motamed *et al.*, 2002). Los efectos antiproliferativos también se asocian a efectos indirectos en señalización de IGF (Francki *et al.*, 2003). De manera interesante, en este trabajo mostramos que la sobreexpresión de SPARC no afecta la viabilidad celular dependiente de sustrato en células de HC. Sin embargo, se observó que la sobreexpresión de SPARC por el vector AdsSPARC induce levemente la apoptosis de células HepG2, inhibe significativamente el crecimiento en esferoides de las células de HC y tiene un efecto negativo en la capacidad de las células tumorales de formar clones. Mientras que, la inhibición de SPARC utilizando una secuencia antisentido para el ARN mensajero, no afecta el crecimiento de los esferoides. Tampoco se observaron efectos significativos en el crecimiento de los esferoides al adicionar SPARC recombinante. Sugiriendo, como se comentó anteriormente, que los efectos de SPARC se deben a su propia expresión en células de HC y no a la presencia exógena de SPARC.

La migración es un paso esencial en la capacidad de invasión y diseminación de las células tumorales. En este trabajo, la sobreexpresión de SPARC inhibe la migración de las células de HC al utilizar TGF- $\beta$ 1 como quimioattractante. Si bien el mecanismo no está aclarado, existen evidencias en líneas celulares de glioma que sugieren que la capacidad migratoria depende del tipo de proteínas de MEC presentes en el microambiente tumoral (Kozyraki *et al.*, 1996). Un efecto similar se ha observado en células de cáncer pancreático donde la inhibición de SPARC endógena incrementa significativamente su capacidad migratoria (Chen *et al.*, 2010). Nuevamente, el efecto

de SPARC es dependiente del tipo celular ya que en este, y en otros trabajos, se han observado efectos contrarios en la migración. Previamente observamos que la inhibición de SPARC en CEH disminuye su capacidad migratoria. Como podemos observar, el comportamiento de SPARC en lo que respecta a cambios en la migración en células tumorales (donde depende del linaje tumoral) es muy diferente al que puede presentar en células no tumorales como hemos visto que sucede con las CEH.

Para que las células tumorales adquieran capacidad de migrar, invadir y producir metástasis deben tener lugar diferentes procesos entre los cuales la transición de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal (TEM) es clave (Thiery JP, 2002). La TEM se caracteriza por la pérdida de adhesión intercelular (cambio de la expresión de caderina E a la de caderina N), inhibición en la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratinas), sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 y adquisición de un fenotipo de tipo fibroblástico. De hecho, se ha implicado la inducción de TEM en la progresión maligna del HC (Kozyraki R, 1996; Wei Y, 2002). En este trabajo se observó que la sobreexpresión de SPARC produjo un aumento en la expresión de caderina E y una disminución de caderina N, así como una reducción en la expresión de  $\alpha$ -SMA. Los resultados sugieren una transición de un fenotipo mesenquimal a uno epitelial al sobreexpresar SPARC en células de HC (TME, transición mesenquimal-epitelial). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la actividad de MMP-2 y MMP-9, lo cual puede deberse a que las células HepG2 presentan baja frecuencia de eventos TEM como se concluye al observar la baja expresión de caderina N en esta línea celular específica. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en estudios previos en otras células como por ejemplo en melanoma, en donde el aumento de SPARC se asocia con el aumento en la expresión de caderina N y la disminución de caderina E (Sosa MS, 2007; Robert G, 2006); sin embargo, en melanoma la sobreexpresión de SPARC produce mayor agresividad tumoral. Así, el aumento en la expresión de SPARC en diferentes tipos celulares parece modular TEM o TME de forma diferencial afectando la capacidad migratoria de las células. En conclusión, los datos presentados sugieren que la sobreexpresión de SPARC en células de HC induce TME, y consecuentemente un fenotipo menos agresivo.

Se ha reportado que las células HepG2 carecen de algunas proteínas de unión intracelular, como la conexinas, aumentando su capacidad tumorigénica. Yano y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de moléculas de unión intercelular produjo menor capacidad de crecimiento independiente de sustrato conjuntamente con aumento de caderina E (Yano *et al.*,

2001). De hecho, el aumento de la expresión de caderina E resulta en menor progresión y metástasis de las líneas HepG2 y Hep3B (Kim *et al.*, 2007). En nuestro modelo, SPARC induce la expresión de caderina E; postulamos que el aumento de caderina E podría incrementar la formación de complejos de adhesión y explicar, de esta forma, la inhibición de crecimiento tumoral observado *in vivo* e *in vitro*.

El aumento de caderina E y la disminución de caderina N al sobreexpresar SPARC pueden relacionarse con lo observado en el ensayo de formación de esferoides. Los esferoides de células donde SPARC se encuentra aumentada son más compactos y densos en comparación con los controles. Este fenómeno podría ser una consecuencia directa del aumento de caderina E, sin embargo restan realizar estudios para confirmar esta hipótesis.

No existe una quimioterapia eficaz para el tratamiento del HC, por lo que puede considerarse como un tumor quimioresistente. Por otro lado, es necesario emplear dosis altas para obtener al menos cierta respuesta antitumoral, lo cual podría resultar excesivamente tóxico en el contexto de la cirrosis. Uno de los más utilizados es el 5-FU aunque en la actualidad no es considerado un fármaco de uso estándar. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes que no resulten tóxicos o nuevas estrategias que puedan sensibilizar al HC a las quimioterapias que se utilizan en la actualidad.

Basados en los datos presentados y publicados, SPARC funciona como un supresor tumoral en algunos tumores y uno de los mecanismos antitumorales subyacente es la inducción de la muerte celular por apoptosis. Por ejemplo, en cáncer de colon, SPARC induce la activación de caspasa-8 revirtiendo, la resistencia a la quimioterapia (Tang and Tai, 2007). También se observó que SPARC induce apoptosis en células de cáncer de ovario, tumor donde SPARC tiene reconocidos efectos antitumorales (Yiu *et al.*, 2001). Consistentemente con estos datos, se demostró que la sobreexpresión de SPARC disminuyó la proliferación y aumento la apoptosis de células de HC previamente tratadas con bajas concentraciones de 5-FU. Estos resultados proporcionan una prueba de concepto de como se puede revertir la resistencia a la quimioterapia en esta enfermedad incrementando la eficacia de tratamientos ya existentes, pero poco eficaces en su uso tradicional, para el HC. De esta forma, el aumento en la expresión de SPARC en HC, a través de esta herramienta de terapia génica, puede ser en el futuro una estrategia atractiva para sensibilizar el HC a la quimioterapia o para desarrollar tratamientos combinados.

Confirmando resultados previos (Lau *et al.*, 2006), se observó una marcada inhibición del crecimiento tumoral y un aumento significativo de la supervivencia al inocular animales *nude* con dos líneas de HC que sobreexpresan SPARC. Los efectos inhibidores del crecimiento tumoral tras la sobreexpresión de SPARC fueron más contundentes al utilizar la línea celular HepG2 que con Huh7; esto se puede explicar porque Huh7 es una línea más agresiva y desarrolla tumores más grandes en menor tiempo. Restan realizar estudios que nos permitan determinar el por qué de esta menor respuesta. Coincidentemente con los efectos observados *in vitro*, la inhibición de SPARC no tiene efectos en el crecimiento tumoral observado *in vivo*. Aun queda abierta la discusión de por qué SPARC es capaz de inhibir el crecimiento tumoral en ciertos tumores mientras que en otros tiene efecto contrario (Podhajcer *et al.*, 2008a). En este sentido, el linaje tumoral y/o la composición y proporción relativa de componentes del estroma tumoral pueden modular los efectos de SPARC explicando los efectos duales observados.

El momento en que se expresa SPARC también es importante y quizás pueda explicar en parte estos efectos contrarios observados en diferentes modelos tumorales. En este trabajo, SPARC se expresa en forma transitoria y esta expresión resultó suficiente para disminuir el comportamiento agresivo del HC. La inducción de caderina E y la inhibición de caderina N pueden también explicar en parte la inhibición del crecimiento tumoral por un cambio en las mismas células tumorales o al interferir con factores presentes en el microambiente tumoral. Se observó, en los tumores generados por células previamente infectadas con el vector AdsSPARC, un aumento en el número de macrófagos infiltrando el tumor. Este proceso puede ser consecuencia de mayor apoptosis *in vivo* de las células tumorales donde se sobreexpresa SPARC o puede ser un efecto directo de la sobreexpresión de SPARC en el entorno tumoral. Si bien en los estudios con esferoides no se observó aumento de la apoptosis el entorno tumoral *in vivo* puede disponer a las células a entrar en apoptosis.

Del análisis histológico de los tumores generados también surge la observación de un menor número de células de tipo fibroblástico en los tumores tratados con el vector AdsSPARC, sugiriendo que SPARC tendría un rol en la organización de la MEC y/o invasión de fibroblastos en la periferia tumoral. Por otro lado, no se observaron diferencias importantes en la angiogénesis por tinción de Von-Willebrand e inmunohistoquímica para CD31 luego de 5 días de inocular las células tumorales (datos no mostrados), sin embargo, las propiedades antiangiogénicas de SPARC han sido ampliamente descriptas en modelos de HC por otros autores.

En esta tesis doctoral nos hemos enfocado en el estudio de los efectos de SPARC endógena; sin embargo, es importante tener en cuenta la importancia de los efectos de SPARC exógena (producida por células presentes en el estroma que rodea al tumor, como fibroblastos o células endoteliales). En HC se demostró la presencia de SPARC en áreas de fibrosis en el estroma tumoral en muestras provenientes de pacientes (Le Bail *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2006). De la misma forma, en tumores pancreáticos se observó aumento de SPARC en células estrelladas pancreáticas y en fibroblastos del estroma adyacente mientras que SPARC no se observaba en las células tumorales (Infante *et al.*, 2007; Guweidhi *et al.*, 2005). Se ha observado que la expresión de SPARC en estroma se asocia a mal pronóstico en este tipo de tumor (Infante *et al.*, 2007). Coincidentemente, trabajos realizados con líneas celulares pancreáticas también demuestran que SPARC se comporta como una proteína antitumoral. Más aún, se demuestra que el medio condicionado de estas líneas celulares puede disminuir la expresión de SPARC en fibroblastos y células estrelladas pancreáticas (Chen *et al.*, 2010). Por lo tanto, queda en evidencia que la expresión de SPARC por las mismas células tumorales puede resultar antitumoral, mientras que SPARC exógena puede promover el desarrollo tumoral. Nuestros resultados coinciden con los encontrados en líneas tumorales de páncreas pero creemos importante estudiar el papel de SPARC exógena en HC en futuras investigaciones.

En resumen, SPARC se presenta como una proteína con propiedades moduladoras del comportamiento del HC y capaz de inhibir tanto el desarrollo de tumores *in vitro* como *in vivo* y de producir cambios íntimamente relacionados con una menor agresividad tumoral. Además, la sobreexpresión de SPARC es capaz de sensibilizar a las células de HC a la quimioterapia basada en 5-FU. Por todas estas razones, se propone que el aumento de la expresión de SPARC en células de HC es una estrategia potencial para el tratamiento del HC.

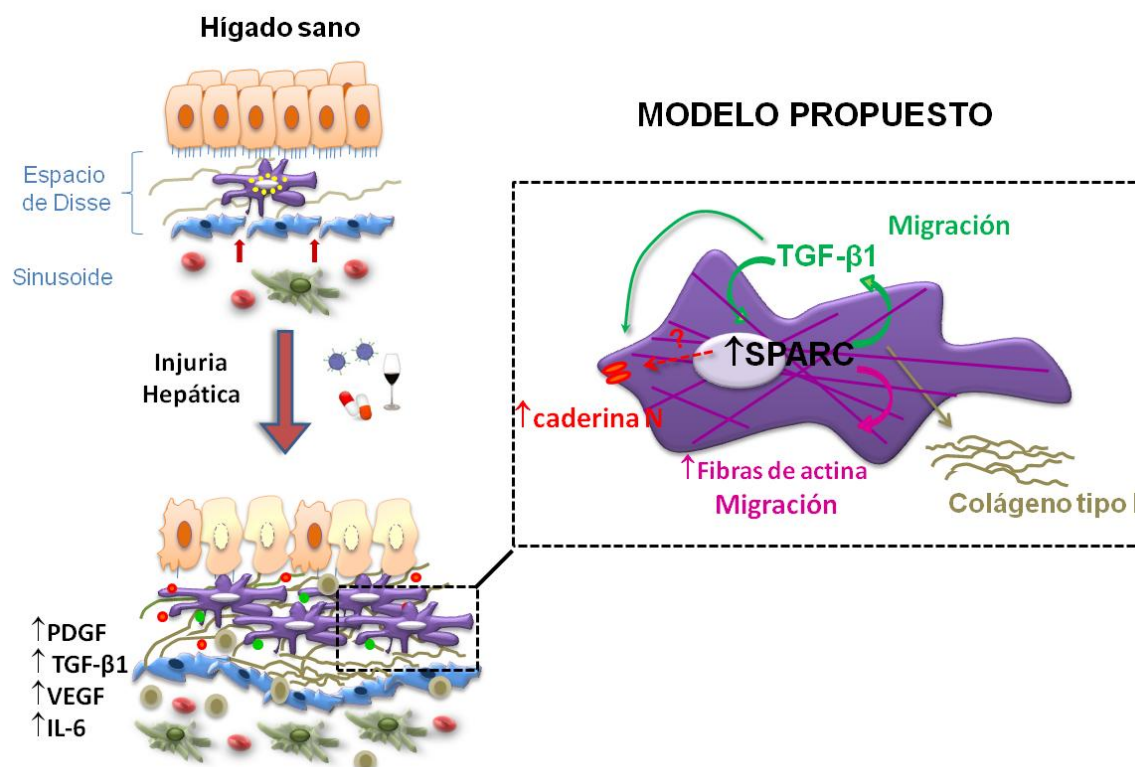
## ***CONCLUSIONES***

Sobre la base de los resultados expuestos y discutidos en esta tesis doctoral, se establecen las siguientes conclusiones en relación a SPARC y su papel en la fibrosis hepática:

- 1) Durante el proceso de fibrosis hepática se induce tempranamente la expresión de SPARC y se mantiene durante la progresión de la enfermedad.
- 2) Las células estrelladas hepáticas y, probablemente, las células endoteliales son las células responsables del aumento de la expresión de SPARC en hígados con fibrosis.
- 3) Los ratones SPARC *null* expuestos a una injuria hepática crónica profibrogénica desarrollan menor actividad necroinflamatoria y un menor grado de fibrosis hepática que los ratones salvajes.
- 4) En los modelos *in vivo* empleados, la ausencia de SPARC se asocia a disminución de los depósitos hepáticos de colágeno, inhibición de la expresión de colágeno tipo I y promueve la formación de fibras de colágeno finas y en estado inmaduro.
- 5) Los ratones SPARC *null* expuestos a agentes causantes de fibrosis (administración de tioacetamida) presentan menor activación de células estrelladas hepáticas.
- 6) Los ratones SPARC *null* tratados con tioacetamida expresan y secretan niveles significativamente menores de TGF- $\beta$ 1.
- 7) La utilización de un adenovirus recombinante con la secuencia antisentido para el ARNm de SPARC resulta una herramienta eficaz para la inhibición transitoria de la expresión de SPARC en hígados de ratas tratadas con tioacetamida.
- 8) La administración del vector AdasSPARC disminuye el desarrollo de fibrosis hepática en un modelo preventivo desarrollado en ratas expuestas al daño con tioacetamida. El tratamiento de la fibrosis se tradujo en: -disminución en el grado de desarrollo de la fibrosis, -disminución de los depósitos de colágeno, -disminución de la actividad necroinflamatoria y -disminución del número de células estrelladas hepáticas activadas.
- 9) La inhibición de SPARC en líneas establecidas de células estrelladas hepáticas aumenta su capacidad de adhesión, reduce significativamente su capacidad migratoria en respuesta a estímulos quimiotácticos, produce alteraciones en el citoesqueleto de actina y disminuye la expresión de colágeno tipo I y de TGF- $\beta$ 1.
- 10) La inhibición de SPARC disminuye la migración al menos en parte por mecanismos dependiente de TGF- $\beta$ 1.

- 11) La inhibición de SPARC induce la expresión de genes relacionados con la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular como caderina E, adamts8 y mmp-13 y disminuye la expresión de caderina N e Itgad (integrina alpha D).
- 12) El cultivo primario de células estrelladas hepáticas de rata presenta mayor adhesión y disminución de la expresión de colágeno cuando se inhibe SPARC.

Los resultados obtenidos nos permiten postular el siguiente modelo del mecanismo por el cual SPARC puede influir en el comportamiento de las CEH (**Figura 50**).



**Figura 50: Modelo propuesto del mecanismo de acción de SPARC en CEH.** Las CEH quiescentes se encuentran en el espacio de Disse constituido por una matriz basal laxa que permite el paso de solutos y factores desde el sinusoide a los hepatocitos. Luego de la injuria hepática se dispara una cascada de acontecimientos celulares y moleculares que conducen a la activación de las CEH. Las CEH proliferan y migran hacia los sitios dañados. SPARC induce la expresión y secreción de TGF- $\beta$ 1 y de forma recíproca TGF- $\beta$ 1 incrementa la expresión de SPARC. TGF- $\beta$ 1 colabora en el proceso fibrogénico. SPARC tiene efectos anti-adhesivos y promueve la migración de las CEH, en parte, vía mecanismos mediados por TGF- $\beta$ 1. Se observan cambios en el citoesqueleto de actina. Se inducen la expresión de colágeno fibrilar y aumenta la expresión de caderina N. La caderina N es características de CEH activadas. Estos cambios se traducen en alteraciones en el espacio de Disse, daño de los hepatocitos, aumento del infiltrado inflamatorio y de moléculas profibrogénicas.

En relación a SPARC y su papel en el hepatocarcinoma:

- 13) La sobreexpresión transitoria de SPARC en células de hepatocarcinoma genera un cambio fenotípico menos agresivo inhibiendo el crecimiento tumoral tanto *in vivo* como *in vitro*.
- 14) El aumento de la expresión de SPARC en células de hepatocarcinoma *in vivo* inhibe el crecimiento tumoral y aumenta significativamente la supervivencia.
- 15) La inhibición de SPARC en líneas humanas de hepatocarcinoma reduce el crecimiento independiente de sustrato, la migración celular y la capacidad de formación de colonias.
- 16) La inhibición de SPARC induce en líneas tumorales aumento de la expresión de caderina E conjuntamente con una disminución en la expresión de caderina N y  $\alpha$ -SMA, características de una transición desde un fenotipo mesenquimal hacia un fenotipo epitelial y menos agresivo.
- 17) La disminución de la expresión de SPARC confiere mayor susceptibilidad a quimioterapia basada en 5-FU, favoreciendo la apoptosis de las células tumorales.

***Los resultados alcanzados aquí nos permiten proponer a SPARC como una diana terapéutica valiosa para inhibir el proceso fibrogénico hepático y la agresividad del hepatocarcinoma.***

.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Alcolado, R., Arthur, M. J. & Iredale, J. P. (1997). Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 92(2): 103-112.
- Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., Linares, J., Serrano, S., Saez-Castillo, A. I., Sanchez, L., Pajares, R., Sanchez-Aguilera, A., Artiga, M. J., Piris, M. A. & Rodriguez-Peralto, J. L. (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 67(7): 3450-3460.
- Alvarez, M. J., Prada, F., Salvatierra, E., Bravo, A. I., Lutzky, V. P., Carbone, C., Pitossi, F. J., Chuluyan, H. E. & 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(12): 5123-5132.
- Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K. H., Stratowa, C., Schreiber, M. & Sommergruber, W. (2004). Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64(3): 844-856.
- Ambrose, A. M., De, E. F. & Rather, L. J. (1949). Toxicity of thioacetamide in rats. *J Ind Hyg Toxicol* 31(3): 158-161.
- Anderson, W. F. (2000). Gene therapy scores against cancer. *Nat Med* 6(8): 862-863.
- Anstee, Q. M. & Goldin, R. D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 87(1): 1-16.
- Anthony, P. P., Ishak, K. G., Nayak, N. C., Poulsen, H. E., Scheuer, P. J. & Sobin, L. H. (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol* 31(5): 395-414.
- Arias, M., Sauer-Lehnen, S., Treptau, J., Janoschek, N., Theuerkauf, I., Buettner, R., Gressner, A. M. & Weiskirchen, R. (2003). Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 3: 29.
- Arnold, S., Mira, E., Muneer, S., Korpanty, G., Beck, A. W., Holloway, S. E., Manes, S. & Brekken, R. A. (2008). Forced expression of MMP9 rescues the loss of angiogenesis and abrogates metastasis of pancreatic tumors triggered by the absence of host SPARC. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(7): 860-873.
- Arnold, S. A. & Brekken, R. A. (2009). SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3(3-4): 255-273.
- Arteel, G. E. (2008). New role of plasminogen activator inhibitor-1 in alcohol-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 1: S54-59.
- Arthur, M. J. (2002). Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 122(5): 1525-1528.
- Arthur, M. J., Stanley, A., Iredale, J. P., Rafferty, J. A., Hembry, R. M. & Friedman, S. L. (1992). Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J* 287 ( Pt 3): 701-707.
- Avila, M. A., Berasain, C., Sangro, B. & Prieto, J. (2006). New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25(27): 3866-3884.
- Baba, Y., Uetsuka, K., Nakayama, H. & Dot, K. (2004). Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 55(5): 325-330.

- 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., Vogel, V. & Sage, E. H. (2005). SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem* 280(43): 36483-36493.
- Barth, P. J., Moll, R. & Ramaswamy, A. (2005). Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 446(5): 532-536.
- Bassuk, J. A., Pichler, R., Rothmier, J. D., Pippen, J., Gordon, K., Meek, R. L., Bradshaw, A. D., Lombardi, D., Strandjord, T. P., Reed, M., Sage, E. H., Couser, W. G. & Johnson, R. (2000). Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney Int* 57(1): 117-128.
- Basu, A., Kligman, L. H., Samulewicz, S. J. & Howe, C. C. (2001). Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol* 2: 15.
- Bataller, R. & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2): 209-218.
- Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P. & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 7(9-10): 1346-1355.
- Beaussier, M., Wendum, D., Fouassier, L., Rey, C., Barbu, V., Lasnier, E., Lienhart, A., Scoazec, J. Y., Rosmorduc, O. & Housset, C. (2005). Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* 42(2): 257-265.
- Beck, A. H., Espinosa, I., Gilks, C. B., van de Rijn, M. & West, R. B. (2008). The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma. *Lab Invest* 88(6): 591-601.
- Bellahcene, A. & Castronovo, V. (1995). Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 146(1): 95-100.
- Benyon, R. C. & Arthur, M. J. (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21(3): 373-384.
- Benyon, R. C., Hovell, C. J., Da Gaca, M., Jones, E. H., Iredale, J. P. & Arthur, M. J. (1999). Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 30(4): 977-986.
- Bergamaschi, A., Tagliabue, E., Sorlie, T., Naume, B., Triulzi, T., Orlandi, R., Russnes, H. G., Nesland, J. M., Tammi, R., Auvinen, P., Kosma, V. M., Menard, S. & Borresen-Dale, A. L. (2008). Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 214(3): 357-367.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275(5304): 1320-1323.
- Best, C. J., Gillespie, J. W., Yi, Y., Chandramouli, G. V., Perlmutter, M. A., Gathright, Y., Erickson, H. S., Georgevich, L., Tangrea, M. A., Duray, P. H., Gonzalez, S., Velasco, A., Linehan, W. M., Matusik, R. J., Price, D. K., Figg, W. D., Emmert-Buck, M. R. & Chuaqui, R. F. (2005). Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1): 6823-6834.
- Blazewski, S., Le Bail, B., Boussarie, L., Blanc, J. F., Malaval, L., Okubo, K., Saric, J., Bioulac-Sage, P. & Rosenbaum, J. (1997a). Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *Am J Pathol* 151(3): 651-657.
- Blazewski, S., Le Bail, B., Boussarie, L., Blanc, J. F., Malaval, L., Okubo, K., Saric, J., Bioulac-Sage, P. & Rosenbaum, J. (1997b). Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *Am J Pathol* 151(3): 651-657.

- Bloomston, M., Ellison, E. C., Muscarella, P., Al-Saif, O., Martin, E. W., Melvin, W. S. & Frankel, W. L. (2007). Stromal osteonectin overexpression is associated with poor outcome in patients with ampullary cancer. *Ann Surg Oncol* 14(1): 211-217.
- Blum, H. E. (2005). Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 11(47): 7391-7400.
- Boker, K., Schwarting, G., Kaule, G., Gunzler, V. & Schmidt, E. (1991). Fibrosis of the liver in rats induced by bile duct ligation. Effects of inhibition by prolyl 4-hydroxylase. *J Hepatol* 13 Suppl 3: S35-40.
- Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R. G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Francalanci, M., Serio, M., Laffi, G., Pinzani, M., Gentilini, P. & Marra, F. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 276(13): 9945-9954.
- Borkham-Kamphorst, E., Stoll, D., Gressner, A. M. & Weiskirchen, R. (2004). Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 321(2): 413-423.
- Bornstein, P. (2000). Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol* 19(7): 555-556.
- Bosch, J. (2007). Vascular deterioration in cirrhosis: the big picture. *J Clin Gastroenterol* 41 Suppl 3: S247-253.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bradshaw, A. D., Baicu, C. F., Rentz, T. J., Van Laer, A. O., Boggs, J., Lacy, J. M. & Zile, M. R. (2009). Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation* 119(2): 269-280.
- Bradshaw, A. D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C. & Sage, E. H. (1999). Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell* 10(5): 1569-1579.
- Bradshaw, A. D., Puolakkainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J. M., Wight, T. N. & Helene Sage, E. (2003). SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* 120(6): 949-955.
- Bradshaw, A. D., Reed, M. J. & Sage, E. H. (2002). SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *J Histochem Cytochem* 50(1): 1-10.
- Bradshaw, A. D. & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107(9): 1049-1054.
- Brekken, R. A., Puolakkainen, P., Graves, D. C., Workman, G., Lubkin, S. R. & Sage, E. H. (2003). Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 111(4): 487-495.
- Brekken, R. A. & Sage, E. H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 19(7): 569-580.
- Brekken, R. A. & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 19(8): 816-827.
- Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J. A. & Bos, T. J. (2002). Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 21(46): 7077-7091.
- Brigstock, D. R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178(2): 169-175.

- Brown, T. J., Shaw, P. A., Karp, X., Huynh, M. H., Begley, H. & Ringuette, M. J. (1999). Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 75(1): 25-33.
- Bruix, J. & Sherman, M. (2005). Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42(5): 1208-1236.
- Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J. M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A. K., Christensen, E., Pagliaro, L., Colombo, M. & Rodes, J. (2001). Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 35(3): 421-430.
- Brune, K., Hong, S. M., Li, A., Yachida, S., Abe, T., Griffith, M., Yang, D., Omura, N., Eshleman, J., Canto, M., Schulick, R., Klein, A. P., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donohue, C. & Goggins, M. (2008). Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(12): 3536-3542.
- Bull Phelps, S. L., Carbon, J., Miller, A., Castro-Rivera, E., Arnold, S., Brekken, R. A. & 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(2): 180 e181-187.
- Bullinger, L., Dohner, K., Bair, E., Frohling, S., Schlenk, R. F., Tibshirani, R., Dohner, H. & Pollack, J. R. (2004). Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350(16): 1605-1616.
- Bustos, M., Beraza, N., Lasarte, J. J., Baixeras, E., Alzuguren, P., Bordet, T. & Prieto, J. (2003). Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 125(1): 192-201.
- Campo McKnight, D. A., Sosnoski, D. M., Koblinkski, J. E. & Gay, C. V. (2006). Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. *J Cell Biochem* 97(2): 288-302.
- Carlsson, J. & Acker, H. (1988). Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer* 42(5): 715-720.
- Cassiman, D., Denef, C., Desmet, V. J. & Roskams, T. (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 33(1): 148-158.
- Cassiman, D. & Roskams, T. (2002). Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 37(4): 527-535.
- Cassiman, D., van Pelt, J., De Vos, R., Van Lommel, F., Desmet, V., Yap, S. H. & Roskams, T. (1999). Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 155(6): 1831-1839.
- Catalano, O. A., Singh, A. H., Uppot, R. N., Hahn, P. F., Ferrone, C. R. & Sahani, D. V. (2008). Vascular and biliary variants in the liver: implications for liver surgery. *Radiographics* 28(2): 359-378.
- Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G. & Lollini, P. L. (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*.
- Constandinou, C., Henderson, N. & Iredale, J. P. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 117: 237-250.
- Couinaud, C. (1957). *Le Foie: Etudes Anatomiques et Chirurgicales*. New York: Masson publishing.
- Czaja, A. J. & Carpenter, H. A. (2004). Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 40(4): 646-652.
- Chandrasekhar, S., Harvey, A. K., Johnson, M. G. & Becker, G. W. (1994). Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1221(1): 7-14.

- Chang, J. F., Chen, P. J., Sze, D. Y., Reid, T., Bartlett, D., Kirn, D. H. & Liu, T. C. (2009). Oncolytic virotherapy for advanced liver tumours. *J Cell Mol Med* 13(7): 1238-1247.
- Chang, Y. S., Adnane, J., Trail, P. A., Levy, J., Henderson, A., Xue, D., Bortolon, E., Ichetovkin, M., Chen, C., McNabola, A., Wilkie, D., Carter, C. A., Taylor, I. C., Lynch, M. & Wilhelm, S. (2007). Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 59(5): 561-574.
- Che, Y., Luo, A., Wang, H., Qi, J., Guo, J. & Liu, Z. (2006). The differential expression of SPARC in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 17(6): 1027-1033.
- Cheeseman, K. H., Albano, E. F., Tomasi, A. & Slater, T. F. (1985). Biochemical studies on the metabolic activation of halogenated alkanes. *Environ Health Perspect* 64: 85-101.
- Cheetham, S., Tang, M. J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D. & Tai, I. T. (2008). SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer* 98(11): 1810-1819.
- Chen, G., Tian, X., Liu, Z., Zhou, S., Schmidt, B., Henne-Bruns, D., Bachem, M. & Kornmann, M. (2010). Inhibition of endogenous SPARC enhances pancreatic cancer cell growth: modulation by FGFR1-III isoform expression. *Br J Cancer* 102(1): 188-195.
- Chen, N., Ye, X. C., Chu, K., Navone, N. M., Sage, E. H., Yu-Lee, L. Y., Logothetis, C. J. & Lin, S. H. (2007). A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *Cancer Res* 67(14): 6544-6548.
- Chen, S. W., Zhang, X. R., Wang, C. Z., Chen, W. Z., Xie, W. F. & Chen, Y. X. (2008). RNA interference targeting the platelet-derived growth factor receptor beta subunit ameliorates experimental hepatic fibrosis in rats. *Liver Int* 28(10): 1446-1457.
- Chen, Y., Miller, C., Mosher, R., Zhao, X., Deeds, J., Morrissey, M., Bryant, B., Yang, D., Meyer, R., Cronin, F., Gostout, B. S., Smith-McCune, K. & Schlegel, R. (2003). Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* 63(8): 1927-1935.
- Chilakapati, J., Korrapati, M. C., Hill, R. A., Warbritton, A., Latendresse, J. R. & Mehendale, H. M. (2007). Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 230(2-3): 105-116.
- Chin, D., Boyle, G. M., Williams, R. M., Ferguson, K., Pandeya, N., Pedley, J., Campbell, C. M., Theile, D. R., Parsons, P. G. & Coman, W. B. (2005). Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 113(5): 789-797.
- Chlenski, A., Liu, S., Baker, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R. & 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(20): 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. & Cohn, S. L. (2002). SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62(24): 7357-7363.
- Chlenski, A., Liu, S., Guerrero, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R., Zage, P. & Cohn, S. L. (2006). SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. *Int J Cancer* 118(2): 310-316.
- Cho, I. J., Kim, Y. W., Han, C. Y., Kim, E. H., Anderson, R. A., Lee, Y. S., Lee, C. H., Hwang, S. J. & Kim, S. G. (2010). E-cadherin antagonizes transforming growth factor beta1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology* 52(6): 2053-2064.

- Dai, W. J. & Jiang, H. C. (2001). Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 7(1): 1-8.
- Dalla-Torre, C. A., Yoshimoto, M., Lee, C. H., Joshua, A. M., de Toledo, S. R., Petrilli, A. S., Andrade, J. A., Chilton-MacNeill, S., Zielenska, M. & Squire, J. A. (2006). Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer* 6: 237.
- De Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D. A. & Schwabe, R. F. (2007). Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132(5): 1937-1946.
- De, S., Chen, J., Narizhneva, N. V., Heston, W., Brainard, J., Sage, E. H. & Byzova, T. V. (2003). Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 278(40): 39044-39050.
- Delany, A. M., Kalajic, I., Bradshaw, A. D., Sage, E. H. & Canalis, E. (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144(6): 2588-2596.
- Dhanesuan, N., Sharp, J. A., Blick, T., Price, J. T. & Thompson, E. W. (2002). Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. *Breast Cancer Res Treat* 75(1): 73-85.
- Dias, N. & Stein, C. A. (2002). Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1(5): 347-355.
- DiMartino, J. F., Lacayo, N. J., Varadi, M., Li, L., Saraiya, C., Ravindranath, Y., Yu, R., Sikic, B. I., Raimondi, S. C. & Dahl, G. V. (2006). Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia* 20(3): 426-432.
- Djojoseburoto, M. W., Chin, A. C., Go, N., Schaetzlein, S., Manns, M. P., Gryaznov, S., Harley, C. B. & Rudolph, K. L. (2005). Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology* 42(5): 1127-1136.
- El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L. & Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 134(6): 1752-1763.
- El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132(7): 2557-2576.
- Eng, L. F. & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4(3): 229-237.
- Fanburg-Smith, J. C., Bratthauer, G. L. & Miettinen, M. (1999). Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskelatal osteosarcoma: a study of 28 cases. *Hum Pathol* 30(1): 32-38.
- Fassio, E., Diaz, S., Santa, C., Reig, M. E., Martinez Artola, Y., Alves de Mattos, A., Miguez, C., Galizzi, J., Zapata, R., Ridruejo, E., de Souza, F. C., Hernandez, N. & Pinchuk, L. (2010). Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol* 9(1): 63-69.
- Fassio, E., Miguez, C., Soria, S., Palazzo, F., Gadano, A., Adrover, R., Landeira, G., Fernandez, N., Garcia, D., Barbero, R., Perelstein, G., Rios, B., Isla, R., Civetta, E., Perez Ravier, R., Barzola, S., Curciarello, J., Colombato, L. A. & Jmeniltzky, A. (2009). Etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina: results of a multicenter retrospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam* 39(1): 47-52.
- Ford, R., Wang, G., Jannati, P., Adler, D., Racanelli, P., Higgins, P. J. & 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(2): 261-275.

- Framson, P. E. & Sage, E. H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 92(4): 679-690.
- Francki, A., Bradshaw, A. D., Bassuk, J. A., Howe, C. C., Couser, W. G. & Sage, E. H. (1999). SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 274(45): 32145-32152.
- Francki, A., McClure, T. D., Brekken, R. A., Motamed, K., Murri, C., Wang, T. & Sage, E. H. (2004). SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91(5): 915-925.
- Francki, A., Motamed, K., McClure, T. D., Kaya, M., Murri, C., Blake, D. J., Carbon, J. G. & Sage, E. H. (2003). SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J Cell Biochem* 88(4): 802-811.
- Frese, K. K. & Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7(9): 645-658.
- Friedman, S. L. (1993). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328(25): 1828-1835.
- Friedman, S. L. (1999). Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 19(2): 129-140.
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275(4): 2247-2250.
- Friedman, S. L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 38 Suppl 1: S38-53.
- Friedman, S. L. (2004). Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 40(5): 1041-1043.
- Friedman, S. L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134(6): 1655-1669.
- Friedman, S. L. & Bansal, M. B. (2006). Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* 43(2 Suppl 1): S82-88.
- Friedman, S. L. & Roll, F. J. (1987). Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal Biochem* 161(1): 207-218.
- Frizell, E., Liu, S. L., Abraham, A., Ozaki, I., Eghbali, M., Sage, E. H. & Zern, M. A. (1995a). Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 21(3): 847-854.
- Frizell, E., Liu, S. L., Abraham, A., Ozaki, I., Eghbali, M., Sage, E. H. & Zern, M. A. (1995b). Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 21(3): 847-854.
- Fromigue, O., Louis, K., Dayem, M., Milanini, J., Pages, G., Tartare-Deckert, S., Ponzio, G., Hofman, P., Barbry, P., Auberger, P. & Mari, B. (2003). Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 22(52): 8487-8497.
- Funk, S. E. & Sage, E. H. (1991). The Ca<sup>2+</sup>(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2648-2652.
- Funk, S. E. & Sage, E. H. (1993). Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 154(1): 53-63.
- Gao, R. & Brigstock, D. R. (2004). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 279(10): 8848-8855.
- Garcia-Banuelos, J., Siller-Lopez, F., Miranda, A., Aguilar, L. K., Aguilar-Cordova, E. & Armendariz-Borunda, J. (2002a). Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced

- with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 9(2): 127-134.
- Garcia-Banuelos, J., Siller-Lopez, F., Miranda, A., Aguilar, L. K., Aguilar-Cordova, E. & Armendariz-Borunda, J. (2002b). Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 9(2): 127-134.
- Garcia-Tsao, G., Friedman, S., Iredale, J. & Pinzani, M. (2010). Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology* 51(4): 1445-1449.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21(3): 311-335.
- Gieseg, M. A., Cody, T., Man, M. Z., Madore, S. J., Rubin, M. A. & Kaldjian, E. P. (2002). Expression profiling of human renal carcinomas with functional taxonomic analysis. *BMC Bioinformatics* 3: 26.
- Gilmour, D. T., Lyon, G. J., Carlton, M. B., Sanes, J. R., Cunningham, J. M., Anderson, J. R., Hogan, B. L., Evans, M. J. & Colledge, W. H. (1998). Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* 17(7): 1860-1870.
- Gilles, C., Bassuk, J. A., Pulyaeva, H., Sage, E. H., Foidart, J. M. & Thompson, E. W. (1998). SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 58(23): 5529-5536.
- Giudici, C., Raynal, N., Wiedemann, H., Cabral, W. A., Marini, J. C., Timpl, R., Bachinger, H. P., Farndale, R. W., Sasaki, T. & Tenni, R. (2008). Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 283(28): 19551-19560.
- Goldenberg, D., Ayes, S., Schneider, T., Pappo, O., Jurim, O., Eid, A., Fellig, Y., Dadon, T., Ariel, I., de Groot, N., Hochberg, A. & Galun, E. (2002). Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* 33(2): 113-124.
- Goldman, C. K., Kendall, R. L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G. Y., Siegal, G. P., Mao, X., Bett, A. J., Huckle, W. R., Thomas, K. A. & Curiel, D. T. (1998). Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8795-8800.
- Golembieski, W. A., Ge, S., Nelson, K., Mikkelsen, T. & Rempel, S. A. (1999). Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 17(5-6): 463-472.
- Gooden, M. D., Vernon, R. B., Bassuk, J. A. & Sage, E. H. (1999). Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 74(2): 152-167.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J. A. & Rojkind, M. (1991). Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest* 65(6): 644-653.
- Gressner, A. M. & Weiskirchen, R. (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 10(1): 76-99.
- Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. & Dooley, S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: d793-807.

- Grotendorst, G. R. (1997). Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 171-179.
- Guha, I. N., Parkes, J., Roderick, P., Chattopadhyay, D., Cross, R., Harris, S., Kaye, P., Burt, A. D., Ryder, S. D., Aithal, G. P., Day, C. P. & Rosenberg, W. M. (2008). Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 47(2): 455-460.
- Guo, L., Enzan, H., Hayashi, Y., Miyazaki, E., Jin, Y., Toi, M., Kuroda, N. & Hiroi, M. (2006). Increased iron deposition in rat liver fibrosis induced by a high-dose injection of dimethylnitrosamine. *Exp Mol Pathol* 81(3): 255-261.
- Guweidhi, A., Kleeff, J., Adwan, H., Giese, N. A., Wente, M. N., Giese, T., Buchler, M. W., Berger, M. R. & Friess, H. (2005). Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg* 242(2): 224-234.
- Guyton, A. & Hall, J. E. (2000). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: Saunders.
- Haber, C. L., Gottifredi, V., Llera, A. S., Salvatierra, E., Prada, F., Alonso, L., Sage, E. H. & Podhajcer, O. L. (2008). SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int J Cancer* 122(7): 1465-1475.
- Hall, K., Blair Zajdel, M. E. & Blair, G. E. (2010). Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J* 431(3): 321-336.
- Harrison, S. A., Torgerson, S., Hayashi, P., Ward, J. & Schenker, S. (2003). Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 98(11): 2485-2490.
- Hartley, J. L., Brown, R. M., Tybulewicz, A., Hayes, P., Wilson, D. C., Gillett, P. & McKiernan, P. (2006). Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with hepatic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43(2): 217-221.
- Hasselaar, P. & Sage, E. H. (1992). SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 49(3): 272-283.
- Hazra, S., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R. A., Krishna, V., Chatterjee, K. & Tsukamoto, H. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 279(12): 11392-11401.
- Hedvat, C. V., Comenzo, R. L., Teruya-Feldstein, J., Olshen, A. B., Ely, S. A., Osman, K., Zhang, Y., Kalakonda, N. & Nimer, S. D. (2003). Insights into extramedullary tumour cell growth revealed by expression profiling of human plasmacytomas and multiple myeloma. *Br J Haematol* 122(5): 728-744.
- Heidelbaugh, J. J. & Bruderly, M. (2006). Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician* 74(5): 756-762.
- 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. & Berns, E. M. (2008). Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. *Clin Cancer Res* 14(17): 5555-5564.
- Hernandez-Alcoceba, R., Sangro, B. & Prieto, J. (2006). Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol* 12(38): 6085-6097.
- Hernandez-Canaveral, I., Gonzalez, J., Lopez-Casillas, F. & Armendariz-Borunda, J. (2004). Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity. *J Gastroenterol Hepatol* 19(4): 380-387.
- Herrmann, J., Gressner, A. M. & Weiskirchen, R. (2007). Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11(4): 704-722.

- Hirata, K., Ogata, I., Ohta, Y. & Fujiwara, K. (1989). Hepatic sinusoidal cell destruction in the development of intravascular coagulation in acute liver failure of rats. *J Pathol* 158(2): 157-165.
- Hirose, A., Ono, M., Saibara, T., Nozaki, Y., Masuda, K., Yoshioka, A., Takahashi, M., Akisawa, N., Iwasaki, S., Oben, J. A. & Onishi, S. (2007). Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45(6): 1375-1381.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J. N. & Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nat Struct Biol* 3(1): 67-73.
- Hong, S. M., Kelly, D., Griffith, M., Omura, N., Li, A., Li, C. P., Hruban, R. H. & Goggins, M. (2008). Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 21(12): 1499-1507.
- Hong, S. Y., Lee, M. H., Kim, K. S., Jung, H. C., Roh, J. K., Hyung, W. J., Noh, S. H. & Choi, S. H. (2004). Adeno-associated virus mediated endostatin gene therapy in combination with topoisomerase inhibitor effectively controls liver tumor in mouse model. *World J Gastroenterol* 10(8): 1191-1197.
- Hu, P. F., Chen, H., Zhong, W., Lin, Y., Zhang, X., Chen, Y. X. & Xie, W. F. (2009). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PAI-1 mRNA ameliorates hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 51(1): 102-113.
- Hu, Y. B., Li, D. G. & Lu, H. M. (2007). Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats. *J Gene Med* 9(3): 217-229.
- Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2000). Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 60(24): 6868-6874.
- Hunter, A. L., Holscher, M. A. & Neal, R. A. (1977). Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 200(2): 439-448.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., Hempen, P. M., Jones, J. & Kern, S. E. (2002). The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res* 62(18): 5351-5357.
- Ikuta, Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H. & 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(22): 8079-8088.
- Ilan, Y., Prakash, R., Davidson, A., Jona, Droguett, G., Horwitz, M. S., Chowdhury, N. R. & Chowdhury, J. R. (1997). Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 99(5): 1098-1106.
- Ilan, Y., Saito, H., Thummala, N. R. & Chowdhury, N. R. (1999a). Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis* 19(1): 49-59.
- Ilan, Y., Saito, H., Thummala, N. R. & Chowdhury, N. R. (1999b). Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis* 19(1): 49-59.
- Inagaki, Y. & Okazaki, I. (2007). Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56(2): 284-292.
- Infante, J. R., Matsubayashi, H., Sato, N., Tonascia, J., Klein, A. P., Riall, T. A., Yeo, C., Iacobuzio-Donahue, C. & Goggins, M. (2007). Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 25(3): 319-325.
- Inoue, H., Matsuyama, A., Mimori, K., Ueo, H. & Mori, M. (2002). Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray. *Clin Cancer Res* 8(11): 3475-3479.

- Iorns, E., Lord, C. J., Turner, N. & Ashworth, A. (2007). Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 6(7): 556-568.
- Iredale, J. P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1): 43-54.
- Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C. & Arthur, M. J. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 102(3): 538-549.
- Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D. & Kleinman, H. K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 59(17): 4453-4457.
- Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E., Parry, S., Budroni, M., Palmieri, G., Neville, A. M., O'Hare, M. J. & Lakhani, S. R. (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64(9): 3037-3045.
- Kahn, S. L., Ronnett, B. M., Gravitt, P. E. & Gustafson, K. S. (2008). Quantitative methylation-specific PCR for the detection of aberrant DNA methylation in liquid-based Pap tests. *Cancer* 114(1): 57-64.
- Kaiser, S., Park, Y. K., Franklin, J. L., Halberg, R. B., Yu, M., Jessen, W. J., Freudenberg, J., Chen, X., Haigis, K., Jegga, A. G., Kong, S., Sakthivel, B., Xu, H., Reichling, T., Azhar, M., Boivin, G. P., Roberts, R. B., Bissahoyo, A. C., Gonzales, F., Bloom, G. C., Eschrich, S., Carter, S. L., Aronow, J. E., Kleimeyer, J., Kleimeyer, M., Ramaswamy, V., Settle, S. H., Boone, B., Levy, S., Graff, J. M., Doetschman, T., Groden, J., Dove, W. F., Threadgill, D. W., Yeatman, T. J., Coffey, R. J., Jr. & Aronow, B. J. (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol* 8(7): R131.
- Kanai, F. (2001). Transcriptional targeted gene therapy for hepatocellular carcinoma by adenovirus vector. *Mol Biotechnol* 18(3): 243-250.
- Kato, Y., Frankenre, F., Noel, A., Sakai, N., Nagashima, Y., Koshika, S., Miyazaki, K. & Foidart, J. M. (2000). High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol Oncol Res* 6(1): 24-26.
- Kato, Y., Nagashima, Y., Baba, Y., Kawano, T., Furukawa, M., Kubota, A., Yanoma, S., Imagawa-Ishiguro, Y., Satake, K., Taguchi, T., Hata, R., Mochimatsu, I., Aoki, I., Kameda, Y., Inayama, Y. & Tsukuda, M. (2005). Expression of SPARC in tongue carcinoma of stage II is associated with poor prognosis: an immunohistochemical study of 86 cases. *Int J Mol Med* 16(2): 263-268.
- Kato, Y., Sakai, N., Baba, M., Kaneko, S., Kondo, K., Kubota, Y., Yao, M., Shuin, T., Saito, S., Koshika, S., Kawase, T., Miyagi, Y., Aoki, I. & Nagashima, Y. (1998). Stimulation of motility of human renal cell carcinoma by SPARC/Osteonectin/BM-40 associated with type IV collagen. *Invasion Metastasis* 18(2): 105-114.
- Kaufmann, B., Muller, S., Hanisch, F. G., Hartmann, U., Paulsson, M., Maurer, P. & Zaucke, F. (2004). Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* 14(7): 609-619.
- Kelm, R. J., Jr. & Mann, K. G. (1991). The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J Biol Chem* 266(15): 9632-9639.

- Kesteloot, F., Desmouliere, A., Leclercq, I., Thiry, M., Arrese, J. E., Prockop, D. J., Lapiere, C. M., Nussgens, B. V. & Colige, A. (2007). ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 46(5): 1620-1631.
- Kim, S. O., Kwon, J. I., Jeong, Y. K., Kim, G. Y., Kim, N. D. & Choi, Y. H. (2007). Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(9): 2169-2176.
- Kinnman, N., Hultcrantz, R., Barbu, V., Rey, C., Wendum, D., Poupon, R. & Housset, C. (2000). PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 80(5): 697-707.
- Kinoshita, K., Iimuro, Y., Otogawa, K., Saika, S., Inagaki, Y., Nakajima, Y., Kawada, N., Fujimoto, J., Friedman, S. L. & Ikeda, K. (2007). Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 56(5): 706-714.
- Kirchhoff, F. (2008). Silencing HIV-1 In Vivo. *Cell* 134(4): 566-568.
- Kisseleva, T. & Brenner, D. A. (2008). Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(2): 109-122.
- Knittel, T., Aurisch, S., Neubauer, K., Eichhorst, S. & Ramadori, G. (1996). Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 149(2): 449-462.
- Knodell, R. G., Ishak, K. G., Black, W. C., Chen, T. S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T. W. & Wollman, J. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1(5): 431-435.
- 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., Welch, D. R. & Kleinman, H. K. (2005). Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis. *Cancer Res* 65(16): 7370-7377.
- Koteish, A. & Diehl, A. M. (2001). Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21(1): 89-104.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Brekken, R. A., Sivridis, E., Gatter, K. C., Harris, A. L. & Sage, E. H. (2003). Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res* 63(17): 5376-5380.
- Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T. & Wickham, T. J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8(5): 583-589.
- Kozyraki, R., Scoazec, J. Y., Flejou, J. F., D'Errico, A., Bedossa, P., Terris, B., Fiorentino, M., Bringuier, A. F., Grigioni, W. F. & Feldmann, G. (1996). Expression of cadherins and alpha-catenin in primary epithelial tumors of the liver. *Gastroenterology* 110(4): 1137-1149.
- Kristensen, D. B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T. & Yoshizato, K. (2000). Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32(2): 268-277.
- Kuhn, C. & Mason, R. J. (1995). Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 147(6): 1759-1769.
- Kunigal, S., Gondi, C. S., Gujrati, M., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C. & Rao, J. S. (2006). SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. *Int J Oncol* 29(6): 1349-1357.
- Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I. & Bosserhoff, A. K. (2005). Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 15(4): 305-313.

- Kupprion, C., Motamed, K. & Sage, E. H. (1998). SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273(45): 29635-29640.
- Lamireau, T., Le Bail, B., Boussarie, L., Fabre, M., Vergnes, P., Bernard, O., Gautier, F., Bioulac-Sage, P. & Rosenbaum, J. (1999). Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGFbeta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy. *J Hepatol* 31(2): 248-255.
- Lane, T. F. & Sage, E. H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8(2): 163-173.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J. P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., Ekman, P., DeMarzo, A. M., Tibshirani, R., Botstein, D., Brown, P. O., Brooks, J. D. & Pollack, J. R. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3): 811-816.
- Lau, C. P., Poon, R. T., Cheung, S. T., Yu, W. C. & Fan, S. T. (2006). SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 210(4): 459-468.
- Le Bail, B., Faouzi, S., Boussarie, L., Guirouilh, J., Blanc, J. F., Carles, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. & Rosenbaum, J. (1999). Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 189(1): 46-52.
- Ledda, F., Bravo, A. I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J. & Podhajcer, O. L. (1997a). The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 108(2): 210-214.
- Ledda, M. F., Adris, S., Bravo, A. I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J. & Podhajcer, O. L. (1997b). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 3(2): 171-176.
- Ledley, F. D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6(9): 1129-1144.
- Li, G., Li, D., Xie, Q., Shi, Y., Jiang, S. & Jin, Y. (2008). RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production. *J Gene Med* 10(9): 1039-1047.
- Li, H., Xu, G., Shang, Q., Pan, L., Shefer, S., Batta, A. K., Bollineni, J., Tint, G. S., Keller, B. T. & Salen, G. (2004). Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Metabolism* 53(7): 927-932.
- Li, X., Benjamin, I. S. & Alexander, B. (2002). Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 36(4): 488-493.
- Lieber, C. S. (1997). Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 38: 601-628.
- Lieber, C. S. (2005). Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst* 50: 7-20.
- Lien, H. C., Hsiao, Y. H., Lin, Y. S., Yao, Y. T., Juan, H. F., Kuo, W. H., Hung, M. C., Chang, K. J. & Hsieh, F. J. (2007). Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 26(57): 7859-7871.
- Lim, Y. S., Lee, H. C. & Lee, H. S. (2007). Switch of cadherin expression from E- to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol* 127(2): 149-160.
- Liotta, L. A. & Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411(6835): 375-379.

- Luo, A., Kong, J., Hu, G., Liew, C. C., Xiong, M., Wang, X., Ji, J., Wang, T., Zhi, H., Wu, M. & Liu, Z. (2004). Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 23(6): 1291-1299.
- Lussier, C., Sodek, J. & Beaulieu, J. F. (2001). Expression of SPARC/osteonectin/BM40 in the human gut: predominance in the stroma of the remodeling distal intestine. *J Cell Biochem* 81(3): 463-476.
- Llovet, J. M. (2007). Clinical and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 13(11 Suppl 2): S13-16.
- Llovet, J. M. & Bruix, J. (2008). Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 48 Suppl 1: S20-37.
- Llovet, J. M., Burroughs, A. & Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362(9399): 1907-1917.
- Llovet, J. M., Bustamante, J., Castells, A., Vilana, R., Ayuso Mdel, C., Sala, M., Bru, C., Rodes, J. & Bruix, J. (1999). Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 29(1): 62-67.
- Madoz-Gurpide, J., Lopez-Serra, P., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Sanchez, L., Lombardia, L. & Casal, J. I. (2006). Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis. *Mol Cell Proteomics* 5(8): 1471-1483.
- Maeng, H. Y., Choi, D. K., Takeuchi, M., Yamamoto, M., Tominaga, M., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Ito, T., Sakaki, Y. & Furihata, C. (2002a). Appearance of osteonectin-expressing fibroblastic cells in early rat stomach carcinogenesis and stomach tumors induced with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Jpn J Cancer Res* 93(9): 960-967.
- Maeng, H. Y., Song, S. B., Choi, D. K., Kim, K. E., Jeong, H. Y., Sakaki, Y. & Furihata, C. (2002b). Osteonectin-expressing cells in human stomach cancer and their possible clinical significance. *Cancer Lett* 184(1): 117-121.
- Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., Deveau, V. & Lotersztajn, S. (2007). Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targets* 11(3): 403-409.
- Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M. & Timpl, R. (1987). Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Lett* 218(1): 167-172.
- Mantoni, T. S., Schendel, R. R., Rodel, F., Niedobitek, G., Al-Assar, O., Masamune, A. & Brunner, T. B. (2008). Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 7(11): 1806-1815.
- Marquez-Aguirre, A., Sandoval-Rodriguez, A., Gonzalez-Cuevas, J., Bueno-Topete, M., Navarro-Partida, J., Arellano-Olivera, I., Lucano-Landeros, S. & Armendariz-Borunda, J. (2009). Adenoviral delivery of dominant-negative transforming growth factor beta type II receptor up-regulates transcriptional repressor SKI-like oncogene, decreases matrix metalloproteinase 2 in hepatic stellate cell and prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 11(3): 207-219.
- Marra, F. (2002). Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 7: d1899-1914.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Milani, S., Pastacaldi, S., Pinzani, M., Romanelli, R. G., Laffi, G. & Gentilini, P. (1998). Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 152(2): 423-430.

- Marra, F., Romanelli, R. G., Giannini, C., Failli, P., Pastacaldi, S., Arrighi, M. C., Pinzani, M., Laffi, G., Montalto, P. & Gentilini, P. (1999). Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 29(1): 140-148.
- Martinek, N., Shahab, J., Sodek, J. & Ringuette, M. (2007). Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res* 86(4): 296-305.
- Martinez, N., Camacho, F. I., Algara, P., Rodriguez, A., Dopazo, A., Ruiz-Ballesteros, E., Martin, P., Martinez-Climent, J. A., Garcia-Conde, J., Menarguez, J., Solano, F., Mollejo, M. & Piris, M. A. (2003). The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res* 63(23): 8226-8232.
- Mason, I. J., Murphy, D., Munke, M., Francke, U., Elliott, R. W. & Hogan, B. L. (1986a). Developmental and transformation-sensitive expression of the Sparc gene on mouse chromosome 11. *EMBO J* 5(8): 1831-1837.
- Mason, I. J., Taylor, A., Williams, J. G., Sage, H. & Hogan, B. L. (1986b). Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *EMBO J* 5(7): 1465-1472.
- Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Reali, U. M. & Santucci, M. (1999). Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 30(3): 339-344.
- Matar, P., Alaniz, L., Rozados, V., Aquino, J. B., Malvicini, M., Atorrasagasti, C., Gidekel, M., Silva, M., Scharovsky, O. G. & Mazzolini, G. (2009). Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci* 16: 30.
- McClung, H. M., Thomas, S. L., Osenkowski, P., Toth, M., Menon, P., Raz, A., Fridman, R. & Rempel, S. A. (2007). SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett* 419(2): 172-177.
- McCuskey, R. S., Ito, Y., Robertson, G. R., McCuskey, M. K., Perry, M. & Farrell, G. C. (2004). Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 40(2): 386-393.
- McVey, J. H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I. J. & Hogan, B. L. (1988). Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *J Biol Chem* 263(23): 11111-11116.
- Melton, A. C., Soon, R. K., Jr., Park, J. G., Martinez, L., Dehart, G. W. & Yee, H. F., Jr. (2007). Focal adhesion disassembly is an essential early event in hepatic stellate cell chemotaxis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(6): G1272-1280.
- 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. & Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436(7050): 518-524.
- Miranda-Diaz, A., Rincon, A. R., Salgado, S., Vera-Cruz, J., Galvez, J., Islas, M. C., Berumen, J., Aguilar-Cordova, E. & Armendariz-Borunda, J. (2004). Improved effects of viral gene delivery of human uPA plus biliodigestive anastomosis induce recovery from experimental biliary cirrhosis. *Mol Ther* 9(1): 30-37.
- Mitas, M., Almeida, J. S., Mikhitarian, K., Gillanders, W. E., Lewin, D. N., Spyropoulos, D. D., Hoover, L., Graham, A., Glenn, T., King, P., Cole, D. J., Hawes, R., Reed, C. E. & Hoffman, B. J. (2005). Accurate discrimination of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma using a quantitative three-tiered algorithm and multimarker real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 11(6): 2205-2214.

- Miyahara, T., Schrum, L., Rippe, R., Xiong, S., Yee, H. F., Jr., Motomura, K., Anania, F. A., Willson, T. M. & Tsukamoto, H. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 275(46): 35715-35722.
- Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P. J., Burgart, L. J. & Gores, G. J. (1999). Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 117(3): 669-677.
- Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G. & Berkowitz, R. S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* 12(9): 1895-1901.
- Motamed, K., Funk, S. E., Koyama, H., Ross, R., Raines, E. W. & 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. *J Cell Biochem* 84(4): 759-771.
- Motamed, K. & Sage, E. H. (1998). SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J Cell Biochem* 70(4): 543-552.
- Mueller, W. C. & von Deimling, A. (2009). Gene regulation by methylation. *Recent Results Cancer Res* 171: 217-239.
- Mulhbachter, J., St-Pierre, P. & Lafontaine, D. A. (2010). Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Curr Opin Pharmacol* 10(5): 551-556.
- Muller, A., Machnik, F., Zimmermann, T. & Schubert, H. (1988). Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34(4): 229-236.
- Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T. & Zabel, B. (1992). Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *J Histochem Cytochem* 40(2): 283-291.
- Murakami, M., Nagai, E., Mizumoto, K., Saimura, M., Ohuchida, K., Inadome, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Maemondo, M., Nukiwa, T. & Tanaka, M. (2005). Suppression of metastasis of human pancreatic cancer to the liver by transportal injection of recombinant adenoviral NK4 in nude mice. *Int J Cancer* 117(1): 160-165.
- Murphy-Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A. & Sage, E. H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *J Cell Biochem* 57(2): 341-350.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42(9): 3858-3863.
- Nakamura, T., Sakata, R., Ueno, T., Sata, M. & Ueno, H. (2000). Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 32(2): 247-255.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Kadoya, H., Ikeda, K. & Kaneda, K. (2002a). Expression of SPARC by activated hepatic stellate cells and its correlation with the stages of fibrogenesis in human chronic hepatitis. *Virchows Arch* 441(5): 466-474. Epub 2002 Apr 2026.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Kadoya, H., Ikeda, K. & Kaneda, K. (2002b). Expression of SPARC by activated hepatic stellate cells and its correlation with the stages of fibrogenesis in human chronic hepatitis. *Virchows Arch* 441(5): 466-474.
- Neal, R. A. & Halpert, J. (1982). Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 321-339.

- Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S. L., Koike, K. & Llovet, J. M. (2008). Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 48(5): 858-879.
- Nie, J. & Sage, E. H. (2009). SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 284(2): 1279-1290.
- Nieto, N., Dominguez-Rosales, J. A., Fontana, L., Salazar, A., Armendariz-Borunda, J., Greenwel, P. & Rojkind, M. (2001). Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1(I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 33(3): 597-607.
- Nieto, N., Friedman, S. L. & Cederbaum, A. I. (2002). Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 35(1): 62-73.
- Niki, T., Pekny, M., Hellemans, K., Bleser, P. D., Berg, K. V., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F. & Geerts, A. (1999). Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29(2): 520-527.
- Nimphius, W., Moll, R., Olbert, P., Ramaswamy, A. & Barth, P. J. (2007). CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch* 450(2): 179-185.
- Olson, E. N. & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5): 353-365.
- Oren, R., Dotan, I., Papa, M., Marravi, Y., Aeed, H., Barg, J., Zeidel, L., Bruck, R. & Halpern, Z. (1996). Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology* 24(2): 419-423.
- Otsuka, K., Yao, K. L., Wasi, S., Tung, P. S., Aubin, J. E., Sodek, J. & Termine, J. D. (1984). Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro. *J Biol Chem* 259(15): 9805-9812.
- Paley, P. J., Goff, B. A., Gown, A. M., Greer, B. E. & Sage, E. H. (2000). Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 78(3 Pt 1): 336-341.
- Palmeira, C. M. & Rolo, A. P. (2004). Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203(1-3): 1-15.
- Pan, M. R., Chang, H. C., Chuang, L. Y. & Hung, W. C. (2008). The nonsteroidal anti-inflammatory drug NS398 reactivates SPARC expression via promoter demethylation to attenuate invasiveness of lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(4): 456-462.
- Parker, B. S., Argani, P., Cook, B. P., Liangfeng, H., Chartrand, S. D., Zhang, M., Saha, S., Bardelli, A., Jiang, Y., St Martin, T. B., Nacht, M., Teicher, B. A., Klinger, K. W., Sukumar, S. & Madden, S. L. (2004). Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 64(21): 7857-7866.
- Parkin, D. M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2(9): 533-543.
- Patsenker, E., Popov, Y., Wiesner, M., Goodman, S. L. & Schuppan, D. (2007). Pharmacological inhibition of the vitronectin receptor abrogates PDGF-BB-induced hepatic stellate cell migration and activation in vitro. *J Hepatol* 46(5): 878-887.
- Pegg, A. E. & Perry, W. (1981). Alkylation of nucleic acids and metabolism of small doses of dimethylnitrosamine in the rat. *Cancer Res* 41(8): 3128-3132.
- Pen, A., Moreno, M. J., Martin, J. & Stanimirovic, D. B. (2007). Molecular markers of extracellular matrix remodeling in glioblastoma vessels: microarray study of laser-captured glioblastoma vessels. *Glia* 55(6): 559-572.

- Phan, E., Ahluwalia, A. & Tarnawski, A. S. (2007). Role of SPARC--matricellular protein in pathophysiology and tissue injury healing. Implications for gastritis and gastric ulcers. *Med Sci Monit* 13(2): RA25-30.
- Phanish, M. K., Wahab, N. A., Colville-Nash, P., Hendry, B. M. & Dockrell, M. E. (2006). The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J* 393(Pt 2): 601-607.
- Philip, P. A., Mahoney, M. R., Allmer, C., Thomas, J., Pitot, H. C., Kim, G., Donehower, R. C., Fitch, T., Picus, J. & Erlichman, C. (2005). Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 23(27): 6657-6663.
- Pichler, R. H., Hugo, C., Shankland, S. J., Reed, M. J., Bassuk, J. A., Andoh, T. F., Lombardi, D. M., Schwartz, S. M., Bennett, W. M., Alpers, C. E., Sage, E. H., Johnson, R. J. & Couser, W. G. (1996). SPARC is expressed in renal interstitial fibrosis and in renal vascular injury. *Kidney Int* 50(6): 1978-1989.
- Pinzani, M. (1999). Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 21(4): 475-490.
- Pinzani, M. (2002). PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 7: d1720-1726.
- Pinzani, M., Failli, P., Ruocco, C., Casini, A., Milani, S., Baldi, E., Giotti, A. & Gentilini, P. (1992). Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 90(2): 642-646.
- Pinzani, M. & Marra, F. (2001). Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21(3): 397-416.
- Pinzani, M., Marra, F. & Carloni, V. (1998). Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 18(1): 2-13.
- Plaa, G. L. (2000). Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 42-65.
- Podhajcer, O. L., Benedetti, L., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E. & Llera, A. S. (2008a). The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* 27(3): 523-537.
- Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E. & 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(4): 691-705.
- Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 21(3): 49-98.
- Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., Chambon, P. & Gespach, C. (1995). Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* 64(1): 70-75.
- Porte, H., Triboulet, J. P., Kotelevets, L., Carrat, F., Prevot, S., Nordlinger, B., DiGioia, Y., Wurtz, A., Comoglio, P., Gespach, C. & Chastre, E. (1998). Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Clin Cancer Res* 4(6): 1375-1382.
- Porter, D., Lahti-Domenici, J., Keshaviah, A., Bae, Y. K., Argani, P., Marks, J., Richardson, A., Cooper, A., Strausberg, R., Riggins, G. J., Schnitt, S., Gabrielson, E., Gelman, R. & Polyak, K. (2003). Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* 1(5): 362-375.
- Porter, P. L., Sage, E. H., Lane, T. F., Funk, S. E. & Gown, A. M. (1995). Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 43(8): 791-800.

- Porter, W. R., Gudzinowicz, M. J. & Neal, R. A. (1979). Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 208(3): 386-391.
- Porth (Ed) (2009). *Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. Editorial Panamericana.
- Prada, F., Benedetti, L. G., Bravo, A. I., Alvarez, M. J., Carbone, C. & Podhajcer, O. L. (2007). SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol* 127(11): 2618-2628.
- Prenzel, K. L., Warnecke-Eberz, U., Xi, H., Brabender, J., Baldus, S. E., Bollschweiler, E., Gutschow, C. A., Holscher, A. H. & Schneider, P. M. (2006). Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA in pancreatic cancer compared to cancer of the papilla of Vater. *Oncol Rep* 15(5): 1397-1401.
- Prieto, J., Qian, C., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mazzolini, G., Sangro, B. & Kramer, M. G. (2004). Gene therapy of liver diseases. *Expert Opin Biol Ther* 4(7): 1073-1091.
- Prosser, C. C., Yen, R. D. & Wu, J. (2006). Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 12(4): 509-515.
- Puolakkainen, P. A., Brekken, R. A., Muneer, S. & 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(4): 215-224.
- Purohit, V. & Brenner, D. A. (2006). Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology* 43(4): 872-878.
- Raines, E. W., Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Ross, R. & Sage, E. H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(4): 1281-1285.
- Rappaport, A. M. (1958). The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 130(4): 673-689.
- Rasanen, K. & Vaheri, A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 316(17): 2713-2722.
- Reed, M. J., Vernon, R. B., Abrass, I. B. & Sage, E. H. (1994). TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol* 158(1): 169-179.
- Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Fisher, J. L., Maile, M. & Nakeff, A. (2001). SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *J Neurooncol* 53(2): 149-160.
- Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Ge, S., Lemke, N., Elisevich, K., Mikkelsen, T. & Gutierrez, J. A. (1998). SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(12): 1112-1121.
- Rentz, T. J., Poobalarahi, F., Bornstein, P., Sage, E. H. & Bradshaw, A. D. (2007). SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 282(30): 22062-22071.
- Reynaert, H., Thompson, M. G., Thomas, T. & Geerts, A. (2002). Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 50(4): 571-581.
- Rich, J. N., Hans, C., Jones, B., Iversen, E. S., McLendon, R. E., Rasheed, B. K., Dobra, A., Dressman, H. K., Bigner, D. D., Nevins, J. R. & West, M. (2005). Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res* 65(10): 4051-4058.

- Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C. T., Bigner, D. D., Counter, C. M. & 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(18): 15951-15957.
- Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatie, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R. & Tartare-Deckert, S. (2006). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66(15): 7516-7523.
- Rodriguez-Jimenez, F. J., Caldes, T., Iniesta, P., Vidart, J. A., Garcia-Asenjo, J. L. & Benito, M. (2007). Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma. *Oncol Rep* 17(6): 1301-1307.
- Rojkind, M. (1999). Role of metalloproteinases in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 23(5): 934-939.
- Romberg, R. W., Werness, P. G., Lollar, P., Riggs, B. L. & Mann, K. G. (1985). Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* 260(5): 2728-2736.
- Ross, M. E., Mahfouz, R., Onciu, M., Liu, H. C., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Pounds, S., Cheng, C., Ma, J., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., Girtman, K., Williams, W. K., Raimondi, S. C., Liang, D. C., Shih, L. Y., Pui, C. H. & Downing, J. R. (2004). Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 104(12): 3679-3687.
- Rumpler, G., Becker, B., Hafner, C., McClelland, M., Stolz, W., Landthaler, M., Schmitt, R., Bosserhoff, A. & 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(6): 761-771.
- Rygaard, J. & Povlsen, C. O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77(4): 758-760.
- Ryu, B., Jones, J., Hollingsworth, M. A., Hruban, R. H. & Kern, S. E. (2001). Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res* 61(5): 1833-1838.
- Sage, E. H., Bassuk, J. A., Yost, J. C., Folkman, M. J. & Lane, T. F. (1995). Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca(2+)-binding EF-hand sequence. *J Cell Biochem* 57(1): 127-140.
- Sage, E. H. & Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* 266(23): 14831-14834.
- Sage, H., Johnson, C. & Bornstein, P. (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 259(6): 3993-4007.
- Sage, H., Pritzl, P. & Bornstein, P. (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* 1(6): 427-442.
- Sahai, A., Malladi, P., Melin-Aldana, H., Green, R. M. & Whittington, P. F. (2004). Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(1): G264-273.
- Said, N. & Motamed, K. (2005). Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis. *Am J Pathol* 167(6): 1739-1752.
- Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D. & Motamed, K. (2007). Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 5(10): 1015-1030.

- Saile, B. & Ramadori, G. (2007). Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. *Z Gastroenterol* 45(1): 77-86.
- Sakai, N., Baba, M., Nagasima, Y., Kato, Y., Hirai, K., Kondo, K., Kobayashi, K., Yoshida, M., Kaneko, S., Kishida, T., Kawakami, S., Hosaka, M., Inayama, Y. & Yao, M. (2001). SPARC expression in primary human renal cell carcinoma: upregulation of SPARC in sarcomatoid renal carcinoma. *Hum Pathol* 32(10): 1064-1070.
- Salgado, S., Garcia, J., Vera, J., Siller, F., Bueno, M., Miranda, A., Segura, A., Grijalva, G., Segura, J., Orozco, H., Hernandez-Pando, R., Fafutis, M., Aguilar, L. K., Aguilar-Cordova, E. & Armendariz-Borunda, J. (2000). Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2(6): 545-551.
- Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Rumio, C., Brekken, R. A., Chiodoni, C. & Colombo, M. P. (2008). Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 68(21): 9050-9059.
- Sangaletti, S., Gioiosa, L., Guiducci, C., Rotta, G., Rescigno, M., Stoppacciaro, A., Chiodoni, C. & Colombo, M. P. (2005). Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J Cell Sci* 118(Pt 16): 3685-3694.
- Sansom, O. J., Mansergh, F. C., Evans, M. J., Wilkins, J. A. & Clarke, A. R. (2007). Deficiency of SPARC suppresses intestinal tumorigenesis in APCMin/+ mice. *Gut* 56(10): 1410-1414.
- Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68(4): 989-997.
- Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G. & Timpl, R. (1997). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* 272(14): 9237-9243.
- Sasaki, T., Hohenester, E., Gohring, W. & 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. *EMBO J* 17(6): 1625-1634.
- Sato, N., Fukushima, N., Maehara, N., Matsubayashi, H., Koopmann, J., Su, G. H., Hruban, R. H. & Goggins, M. (2003). SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 22(32): 5021-5030.
- Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., Takayama, T. & Niitsu, Y. (2008). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol* 26(4): 431-442.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R. J., Wu, Y., Koopmans, S. C., Langston, C., Graham, F. L., Beaudet, A. L. & Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18(2): 180-183.
- Schiemann, B. J., Neil, J. R. & Schiemann, W. P. (2003). SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* 14(10): 3977-3988.
- Schoemaker, M. H., Rots, M. G., Beljaars, L., Ypma, A. Y., Jansen, P. L., Poelstra, K., Moshage, H. & Haisma, H. J. (2008). PDGF-receptor beta-targeted adenovirus redirects gene transfer from hepatocytes to activated stellate cells. *Mol Pharm* 5(3): 399-406.

- Schultz, C., Lemke, N., Ge, S., Golembieski, W. A. & Rempel, S. A. (2002). Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res* 62(21): 6270-6277.
- Schulz, A., Loreth, B., Battmann, A., Knoblauch, B., Stahl, U., Pollex, U. & Bohle, R. M. (1998). [Bone matrix production in osteosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 82: 144-153.
- Schwabe, R. F., Bataller, R. & Brenner, D. A. (2003). Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(5): G949-958.
- Schwarzbauer, J. E. & Spencer, C. S. (1993). The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Mol Biol Cell* 4(9): 941-952.
- Seno, T., Harada, H., Kohno, S., Teraoka, M., Inoue, A. & Ohnishi, T. (2009). Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas. *Int J Oncol* 34(3): 707-715.
- Senties-Gomez, M. D., Galvez-Gastelum, F. J., Meza-Garcia, E. & Armendariz-Borunda, J. (2005). [Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta]. *Gac Med Mex* 141(4): 315-322.
- Shi, Q., Bao, S., Maxwell, J. A., Reese, E. D., Friedman, H. S., Bigner, D. D., Wang, X. F. & Rich, J. N. (2004). Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* 279(50): 52200-52209.
- Shi, Q., Bao, S., Song, L., Wu, Q., Bigner, D. D., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. (2007). Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 26(28): 4084-4094.
- Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H. & Kato, Y. (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 174(2): 194-205.
- Shiba, H., Uchida, Y., Kamihagi, K., Sakata, M., Fujita, T., Nakamura, S., Takemoto, T., Kato, Y. & Kurihara, H. (2001). Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* 80(7): 1653-1659.
- Shiga, A., Shirota, K., Ikeda, T. & Nomura, Y. (1997). Morphological and immunohistochemical studies on porcine serum-induced rat liver fibrosis. *J Vet Med Sci* 59(3): 159-167.
- Shim, M. S. & Kwon, Y. J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J* 277(23): 4814-4827.
- Shu, S. Y., Ju, G. & Fan, L. Z. (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85(2): 169-171.
- Siddiq, F., Sarkar, F. H., Wali, A., Pass, H. I. & Lonardo, F. (2004). Increased osteonectin expression is associated with malignant transformation and tumor associated fibrosis in the lung. *Lung Cancer* 45(2): 197-205.
- Siller-Lopez, F., Sandoval, A., Salgado, S., Salazar, A., Bueno, M., Garcia, J., Vera, J., Galvez, J., Hernandez, I., Ramos, M., Aguilar-Cordova, E. & Armendariz-Borunda, J. (2004). Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 126(4): 1122-1133; discussion 1949.

- Smit, D. J., Gardiner, B. B. & Sturm, R. A. (2007). Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 121(12): 2653-2660.
- Socha, M. J., Manhiani, M., Said, N., Imig, J. D. & Motamed, K. (2007). Secreted protein acidic and rich in cysteine deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in angiotensin hypertension. *Am J Pathol* 171(4): 1104-1112.
- Socha, M. J., Said, N., Dai, Y., Kwong, J., Ramalingam, P., Trieu, V., Desai, N., Mok, S. C. & Motamed, K. (2009). Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 11(2): 126-135.
- Sokol, R. J., Winklhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W. & McKim, J. M., Jr. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109(4): 1249-1256.
- Son, G., Hines, I. N., Lindquist, J., Schrum, L. W. & Rippe, R. A. (2009). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis. *Hepatology* 50(5): 1512-1523.
- Sosa, M. S., Girotti, M. R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J. A., Gallango, S. J., Albar, J. P., Podhajcer, O. L. & 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(22): 4123-4134.
- Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., Lieber, A. & Kiviat, N. (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(1): 114-123.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M. & Sodek, J. (1983). Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219(4590): 1329-1331.
- St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289(5482): 1197-1202.
- Stenner, D. D., Romberg, R. W., Tracy, R. P., Katzmann, J. A., Riggs, B. L. & Mann, K. G. (1984). Monoclonal antibodies to native noncollagenous bone-specific proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(9): 2868-2872.
- Strandjord, T. P., Madtes, D. K., Weiss, D. J. & Sage, E. H. (1999). Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): L628-635.
- Sullivan, D. E., Dash, S., Du, H., Hiramatsu, N., Aydin, F., Kolls, J., Blanchard, J., Baskin, G. & Gerber, M. A. (1997). Liver-directed gene transfer in non-human primates. *Hum Gene Ther* 8(10): 1195-1206.
- Suskind, D. L. & Muench, M. O. (2004). Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 40(2): 261-268.
- Suzuki, M., Hao, C., Takahashi, T., Shigematsu, H., Shivapurkar, N., Sathyanarayana, U. G., Iizasa, T., Fujisawa, T., Hiroshima, K. & Gazdar, A. F. (2005). Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers. *Br J Cancer* 92(5): 942-948.
- Sweeney, S. M., Orgel, J. P., Fertala, A., McAuliffe, J. D., Turner, K. R., Di Lullo, G. A., Chen, S., Antipova, O., Perumal, S., Ala-Kokko, L., Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., Marini, J. C. & San Antonio, J. D. (2008). Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem* 283(30): 21187-21197.

- Taghizadeh, F., Tang, M. J. & Tai, I. T. (2007). Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine-induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy-resistant colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 6(1): 309-317.
- Tai, I. T., Dai, M., Owen, D. A. & Chen, L. B. (2005). Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest* 115(6): 1492-1502.
- Tai, I. T. & Tang, M. J. (2008). SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 11(6): 231-246.
- Takano, T., Hasegawa, Y., Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Yoshida, H., Kuma, K., Hayashi, N., Nakamori, S. & Amino, N. (2002). Quantitative analysis of osteonectin mRNA in thyroid carcinomas. *Endocr J* 49(4): 511-516.
- Takeno, A., Takemasa, I., Doki, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Matsubara, K. & Monden, M. (2008). Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer* 99(8): 1307-1315.
- Tang, M. J. & Tai, I. T. (2007). A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem* 282(47): 34457-34467.
- Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L. & Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26(1 Pt 1): 99-105.
- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. & Crawford, J. M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30(6): 1425-1433.
- Theret, N., Lehti, K., Musso, O. & Clement, B. (1999). MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30(2): 462-468.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-454.
- Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-142.
- Thomas, R., True, L. D., Bassuk, J. A., Lange, P. H. & Vessella, R. L. (2000). Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 6(3): 1140-1149.
- Tome, S. & Lucey, M. R. (2004). Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19(7): 707-714.
- Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E. & Fujimoto, J. (1999). Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5(2): 226-230.
- Uemura, M., Swenson, E. S., Gaca, M. D., Giordano, F. J., Reiss, M. & Wells, R. G. (2005). Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 16(9): 4214-4224.
- Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M. & Iruela-Arispe, M. L. (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 274(33): 23349-23357.
- Volmer, M. W., Radacz, Y., Hahn, S. A., Klein-Scory, S., Stuhler, K., Zapatka, M., Schmiegel, W., Meyer, H. E. & Schwarte-Waldhoff, I. (2004). Tumor suppressor Smad4 mediates downregulation of the anti-adhesive invasion-promoting matricellular protein SPARC:

- Landscaping activity of Smad4 as revealed by a "secretome" analysis. *Proteomics* 4(5): 1324-1334.
- Vyas, S. K., Leyland, H., Gentry, J. & Arthur, M. J. (1995). Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* 109(3): 889-898.
- Waddington, S. N., McVey, J. H., Bhella, D., Parker, A. L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S. M., Greig, J. A., Denby, L., Custers, J., Morita, T., Francischetti, I. M., Monteiro, R. Q., Barouch, D. H., van Rooijen, N., Napoli, C., Havenga, M. J., Nicklin, S. A. & Baker, A. H. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132(3): 397-409.
- Waehler, R., Russell, S. J. & Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 8(8): 573-587.
- Wallace, K., Burt, A. D. & Wright, M. C. (2008). Liver fibrosis. *Biochem J* 411(1): 1-18.
- Wang, C. S., Lin, K. H., Chen, S. L., Chan, Y. F. & Hsueh, S. (2004). Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer* 91(11): 1924-1930.
- Wang, J. C., Lai, S., Guo, X., Zhang, X., de Crombrughe, B., Sonnylal, S., Arnett, F. C. & Zhou, X. (2010). Attenuation of fibrosis in vitro and in vivo with SPARC siRNA. *Arthritis Res Ther* 12(2): R60.
- Wasi, S., Otsuka, K., Yao, K. L., Tung, P. S., Aubin, J. E., Sodek, J. & Termine, J. D. (1984). An osteonectinlike protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 62(6): 470-478.
- Watkins, G., Douglas-Jones, A., Bryce, R., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. (2005). Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72(4): 267-272.
- Wells, A., Yates, C. & Shepard, C. R. (2008). E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 25(6): 621-628.
- Wewer, U. M., Albrechtsen, R., Fisher, L. W., Young, M. F. & Termine, J. D. (1988). Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation of basement membrane. *Am J Pathol* 132(2): 345-355.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheres, D. A. & Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73(2): 309-319.
- Wiese, A. H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., Ruger, R. & Werner, M. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev* 31(4): 282-295.
- Wilson, J. M. (2001a). Adenovirus-mediated gene transfer to liver. *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 205-209.
- Wilson, J. M. (2001b). Adenovirus-mediated gene transfer to liver. *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 205-209.
- Winwood, P. J., Schuppan, D., Iredale, J. P., Kawser, C. A., Docherty, A. J. & Arthur, M. J. (1995). Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* 22(1): 304-315.
- Woelfle, U., Cloos, J., Sauter, G., Riethdorf, L., Janicke, F., van Diest, P., Brakenhoff, R. & Pantel, K. (2003). Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63(18): 5679-5684.
- Woessner, J. F., Jr. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.

- Wrana, J. L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K. L., Domenicucci, C. & Sodek, J. (1988). Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106(3): 915-924.
- Wrana, J. L., Overall, C. M. & Sodek, J. (1991). Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *Eur J Biochem* 197(2): 519-528.
- Wu, R. X., Laser, M., Han, H., Varadarajulu, J., Schuh, K., Hallhuber, M., Hu, K., Ertl, G., Hauck, C. R. & Ritter, O. (2006). Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression. *J Mol Med* 84(3): 241-252.
- Xu, G. F., Li, P. T., Wang, X. Y., Jia, X., Tian, D. L., Jiang, L. D. & Yang, J. X. (2004). Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 10(24): 3621-3627.
- Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19(2): 156-172.
- Xu, L., Hui, A. Y., Albanis, E., Arthur, M. J., O'Byrne, S. M., Blaner, W. S., Mukherjee, P., Friedman, S. L. & Eng, F. J. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54(1): 142-151.
- Xue, L. Y., Hu, N., Song, Y. M., Zou, S. M., Shou, J. Z., Qian, L. X., Ren, L. Q., Lin, D. M., Tong, T., He, Z. G., Zhan, Q. M., Taylor, P. R. & Lu, N. (2006). Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 6: 296.
- Yamanaka, M., Kanda, K., Li, N. C., Fukumori, T., Oka, N., Kanayama, H. O. & Kagawa, S. (2001). Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol* 166(6): 2495-2499.
- Yamashita, K., Upadhyay, S., Mimori, K., Inoue, H. & Mori, M. (2003). Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer* 97(10): 2412-2419.
- Yan, Q. & Sage, E. H. (1999). SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 47(12): 1495-1506.
- Yang, C., Zeisberg, M., Mosterman, B., Sudhakar, A., Yerramalla, U., Holthaus, K., Xu, L., Eng, F., Afdhal, N. & Kalluri, R. (2003). Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 124(1): 147-159.
- Yang, E., Kang, H. J., Koh, K. H., Rhee, H., Kim, N. K. & Kim, H. (2007). Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 121(3): 567-575.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E. & Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4407-4411.
- Yano, T., Hernandez-Blazquez, F. J., Omori, Y. & Yamasaki, H. (2001). Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis* 22(10): 1593-1600.
- Yata, Y., Gotwals, P., Kotliansky, V. & Rockey, D. C. (2002). Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-beta soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 35(5): 1022-1030.
- Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S. & Mok, S. C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 159(2): 609-622.

- Yokohama, S., Yoneda, M., Haneda, M., Okamoto, S., Okada, M., Aso, K., Hasegawa, T., Tokusashi, Y., Miyokawa, N. & Nakamura, K. (2004). Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 40(5): 1222-1225.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U. P., Gomez, D. E., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Thorgeirsson, S. S. & Fukui, H. (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 32(6): 1248-1254.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H. & Fukui, H. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 36(4 Pt 1): 850-860.
- Young, B. A., Wang, P. & Goldblum, S. E. (1998). The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 251(1): 320-327.
- Yu, Q., Que, L. G. & Rockey, D. C. (2002a). Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal cells in normal and injured liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(3): G565-572.
- Yu, Q., Que, L. G. & Rockey, D. C. (2002b). Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal cells in normal and injured liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(3): G565-572.
- Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H. L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S. P. & Johnson, P. H. (2001). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 61(13): 5168-5178.
- Zhang, W. W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 6(2): 113-138.
- Zhou, X., Tan, F. K., Guo, X. & Arnett, F. C. (2006). Attenuation of collagen production with small interfering RNA of SPARC in cultured fibroblasts from the skin of patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 54(8): 2626-2631.
- Zhou, X., Tan, F. K., Guo, X., Wallis, D., Milewicz, D. M., Xue, S. & Arnett, F. C. (2005). Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum* 52(1): 257-261.
- Zhu, N. L., Wang, J. & Tsukamoto, H. (2010). The Necdin-Wnt pathway causes epigenetic peroxisome proliferator-activated receptor gamma repression in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 285(40): 30463-30471.