



Universidad de Valladolid



MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

# **MODULACIÓN DE LA ADHESIVIDAD DE CÉLULAS DE ASTROCITOMA HUMANO A DISTINTAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR**

**AUTORA:** NEREA GARCÍA ARIAS  
**TUTORA:** MARIA LUISA NIETO CALLEJO

**SEPTIEMBRE 2015**

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>24</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>29</b>

## ABREVIATURAS

ADAM = desintegrina y metaloproteína

C = control

Col = colágeno

DMEN = medio Eagle modificado de Dulbecco

FCS = suero de ternera fetal

FITC = isotiocianato de fluoresceína

FN = fibronectina

GAG = glicosaminoglicanos

GBM = glioblastoma multiforme

H = Hora

HSPGs= proteoglicanos de heparán sulfato

L = laminina

LOX = lisil oxidasa

LPA = ácido lipofosfatídico

MEC = matriz extracelular

Min = minuto

o/n = over night

PE = ficoeritrina

PFA= paraformaldehido

PG = proteoglicanos

SNC = sistema nervioso central

sPLA2-IIA = fosfolipasa A2 secretada del tipo IIA

TH = trombina

## INTRODUCCIÓN

Los astrocitomas son un grupo de neoplasias intracraneales primarias, se originan a partir de las células que conforman la estructura cerebral normal del sistema nervioso central (SNC), aparecen en el parénquima cerebral y rara vez producen metástasis a otros tejidos. Constituyen aproximadamente un 80% de los tumores neuroepiteliales (1). La Organización Mundial de la Salud los clasifica en 4 grados según sus características fisiológicas (2):

- **Grado I:** Astrocitoma de bajo grado, son poco frecuentes y cursan con un excelente pronóstico después de su extirpación.
- **Grado II:** Astrocitoma propiamente dicho, que junto con el grado I constituyen aproximadamente un 6% de todos los tumores de cerebro reportados.
- **Grado III:** Astrocitoma anaplásico, un tumor difuso, infiltrante caracterizado por anaplasia dispersa y elevado potencial proliferativo, por lo general aparecen de un astrocitoma de bajo grado aunque pueden ser diagnosticados sin un precursor. Igualmente, tienen un potencial intrínseco de progresar a un glioblastoma maligno.
- **Grado IV:** Glioblastoma multiforme, crece principalmente en los hemisferios cerebrales y tiende a ser el tumor más agresivo, clínicamente, entre los astrocitomas. La supervivencia de pacientes con glioblastoma multiforme se extiende a unos 12 meses con tratamiento quirúrgico agresivo junto con radio y quimioterapia. Es posible que un astrocitoma que inicialmente fue de bajo grado recurra a una forma más agresiva y extensa.

La célula predominante en este tipo de tumor deriva de astrocitos que se han vuelto inmortales. Los astrocitos constituyen la red conectiva del cerebro y la médula espinal y forman un tejido cicatricial cuando el SNC sufre daños. Son las células gliales más abundantes y necesarios para mantener el microambiente que permite el correcto funcionamiento. Se clasifican en dos grupos: protoplasmáticos y fibrosos (3). El astrocitoma comienza cuando los astrocitos sanos cambian, crecen sin control y forman una masa.

La supervivencia de organismos eucariotas requiere de interacciones balanceadas entre las células y la matriz extracelular (MEC), pero las células tumorales malignas desobedecen las restricciones sobre la división celular e invaden lugares que estarían reservados para otras células u otros componentes del tejido, llegando a diseminarse a sitios distantes del foco primario originando focos metastáticos (4).

Un factor clave en el control de la progresión tumoral está relacionado con el crítico equilibrio entre la formación/degradación de la MEC así como con la interacción entre las células tumorales y los componentes de la MEC. Estos procesos son modulados por moléculas del microentorno tumoral, como factores de crecimiento y/o mediadores de la inflamación (proteicos y/o lipídicos), entre otros (4).

En la transformación maligna, la “célula neoplásica” acumula una serie de alteraciones en las principales vías bioquímicas, para adquirir potencial de invasividad y metástasis (5). La estimulación por factores de crecimiento, las interacciones alteradas entre las células con componentes de la MEC, y el aumento de la vascularización, van a ser procesos cruciales para la proliferación celular.

El crecimiento tumoral está asociado a la invasión del tejido circundante, produciéndose la destrucción y colonización del mismo. Las células tumorales se unen a las glicoproteínas de la MEC a través de receptores presentes en su superficie. Una vez unidas, las células tumorales secretan enzimas proteolíticas que degradan los componentes de la matriz. Los cambios patológicos en la composición de la MEC, debido a un incremento en la síntesis de algún componente específico o a un incremento en la degradación selectiva de otros preexistentes por acción de proteasas, causa alteraciones en la distribución, composición y función de la matriz. Estas alteraciones en la MEC están asociadas a una modificación de las interacciones célula-matriz extracelular, lo que facilita la capacidad de migración celular.

Una característica que presentan los gliomas es su gran capacidad para migrar e invadir el parénquima cerebral sano, dando lugar a tumores con bordes difusos, difíciles de resear quirúrgicamente (6). Los componentes que participan en los procesos de migración e invasión en los gliomas son variados. Así, se ha observado la participación de proteínas de MEC, como la laminina (7) y de moléculas de superficie, como las integrinas (8).

El mecanismo de adhesión celular es un proceso muy importante para la génesis, el mantenimiento de la estructura tridimensional y el correcto funcionamiento de los tejidos (9). Las entidades bioquímicas que median dicho mecanismo son complejos multiproteicos formados por tres tipos de macromoléculas: los receptores de adhesión, las moléculas de la MEC y las proteínas formadoras de la placa de adhesión (9).

## **1.- Matriz extracelular**

La matriz extracelular (MEC) es una asociación compleja de distintos tipos de macromoléculas, cada una de ellas con una función especializada: proteínas estructurales (colágeno y elastina), glicosaminoglucanos, proteoglicanos (como sindecanos), glicoproteínas (fibronectina, laminina y tenascina, mediadoras de la adhesión celular), proteasas (como MMPs y ADAMs) y proteínas matricelulares (como lisil oxidasa) (10).

La MEC proporciona una estructura estable alrededor de las células y actúa como soporte para su crecimiento. Además influye en los procesos de adhesión, en la motilidad, en la proliferación celular, y en la regulación de funciones metabólicas, entre otros. Actúa como reservorio de moléculas con actividad biológica: (i) algunos factores de crecimiento y citoquinas están unidos a los proteoglicanos de la matriz y de la superficie celular; y (ii) algunas proteasas y sus inhibidores se asocian con componentes de la matriz (11).

La MEC cerebral no es un sistema de sostenimiento estático y los astrocitos son capaces de modular la expresión de sus receptores de adhesión en función del ambiente (8).

## **2.- Proteínas mediadoras de la interacción célula-MEC**

La función de las proteínas del espacio extracelular está ligada a su interacción con el componente celular del tejido. Las células interaccionan con la MEC mediante proteínas transmembrana, principalmente las integrinas. Es también importante decir que existen otras proteínas receptoras de adhesión con conexión tanto con otras integrinas como con proteínas de la placa de adhesión, los sindecanos (12).

### **➤ Integrinas**

Son una familia de glicoproteínas de la superficie celular y los principales receptores por los cuales las células se unen a diversas proteínas de la MEC (colágeno, laminina, fibronectina o vitronectina) (13). Se podría decir que actúan como un vínculo de unión entre la matriz extracelular y los elementos estructurales internos de la célula.

Todas las integrinas son heterodímeros  $\alpha\beta$ . El tamaño de la subunidad  $\alpha$  varía entre 120 y 180kd y se asocia no covalentemente con la subunidad  $\beta$  (14). Ambas subunidades son glicoproteínas transmembrana con un gran dominio globular NH<sub>2</sub>- extracelular. Cada subunidad contiene un dominio transmembrana delgado y una cola citoplasmática relativamente pequeña de

menos de 60 aminoácidos, a excepción de la integrina  $\beta 4$  la cual presenta un dominio citoplasmático de más de 60 aminoácidos (4).

En vertebrados se han caracterizado 14 subunidades  $\alpha$  y 8, o más, subunidades  $\beta$ , las cuales se asocian en distintas condiciones formando más de 20 integrinas distintas (15). En astrocitomas, existe una expresión diferencial de integrinas entre los astrocitos normales ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 4$ ) y los neoplásicos ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ ) (16).

Las uniones  $\alpha/\beta$  determinan la asociación de un ligando específico al heterodímero. Algunas integrinas, como la  $\alpha 5\beta 1$ , el receptor clásico de la fibronectina, interactúan únicamente con una proteína de la MEC, pero lo más común es que un único receptor reconozca diversas proteínas de la MEC. En algunos casos dos integrinas que comparten el mismo ligando reconocen regiones distintas de la molécula, como es el caso de los receptores de fibronectina  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  y/o los receptores de la laminina  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$ . También hay casos de dos integrinas que se unen a la misma región de la proteína y presentan funciones distintas en la célula. Esto sugiere que el dominio citoplasmático de las integrinas contiene secuencias altamente divergentes (17).

Muchos de los miembros de la familia de las integrinas reconocen un motivo de Arg-Gly-Asp (RGD) en sus ligandos. Este reconocimiento del receptor por su ligando es el que otorga la especificidad y la alta afinidad (17).

Un rasgo interesante de la señalización mediada por estas integrinas es que se trata de un proceso bidireccional, desde el exterior al interior de la célula y viceversa. La interacción de la integrina con su ligando provoca diversos cambios conformacionales en la propia integrina. Esta interacción se produce en el dominio extracelular y conduce a la separación de los dominios citoplasmáticos los cuales contactarán con dominios citoplasmáticos de diversas moléculas del citoesqueleto y/o con moléculas traductoras de señales. Dicha sucesión de respuestas es la llamada señalización "outside-in". Por otro lado, la separación del dominio de interacción citoplasmático de las proteínas promueve la unión del dominio extracelular con sus ligandos, lo cual se trataría de una señalización "inside-out". Es, por lo tanto, la interacción entre estas dos señalizaciones la que regula diversos comportamientos fisiológicos de la célula. Ante situaciones patológicas, como el cáncer, dicha sincronización se encuentra alterada y en muchos casos ausente (4).

Las moléculas de adhesión participan en gran variedad de eventos de transducción de señales. Las integrinas, en concreto, están implicadas en muchas vías bioquímicas de fosforilación de proteínas y de generación de segundos mensajeros citoplasmáticos (18).

Se han llegado a clasificar hasta 32 eventos de señalización que dependen de: (i) el estado de las integrinas que se agregan, (ii) la ocupación de esas integrinas, (iii) la fosforilación de tirosinas citoplasmáticas y (iv) la integridad de la actina del citoesqueleto (19). Aunque estos eventos podrían resumirse en dos: aquellas señales que controlan procesos citoplasmáticos locales y señales que están relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular, es decir, aquellas que tienen su influencia en la regulación del ciclo celular y la transcripción de genes (20). Las principales moléculas de transducción de señales que se acumulan como consecuencia de la agregación de integrinas simples son: RhoA, c-Src, Rac1, Ras, Raf, MEK, ERK, JNK, GAP (21). Se podría decir que la señalización dependiente de la adhesión es importante en el desarrollo de tejidos, ya que señales localizadas en la MEC son necesarias para el control de los patrones de morfogénesis, así como para la integración de éstos a la diferenciación y el crecimiento celular; una coordinación que es esencial para lograr los complicados patrones de células en los tejidos (20).

#### ➤ **Sindecanos**

Son una familia de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) presentes en la superficie celular que actúan como receptores transmembrana (22) y que participan en la regulación de diversos procesos celulares que van desde las cascadas de coagulación, señalización de factores de crecimiento, unión y actividad de lipasas, adhesión de células a la MEC y consecuente organización del citoesqueleto, a la infección de células por microorganismos (24). Son moléculas complejas, con núcleos de proteínas específicos a los cuales se unen un número variable de cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Esas cadenas pueden ser de dos tipos, de heparán sulfato o de condroitín sulfato. La presencia de cadenas de condroitín sulfato en el ectodominio y cerca de la membrana plasmática podría afectar la habilidad de estas moléculas para asociarse a otros receptores transmembrana (23), es decir, el hecho de que sitios de unión a proteoglicanos (PG) existan cerca de integrinas y de otras moléculas de adhesión de la superficie celular, sugiere que el reconocimiento celular de la MEC implica la formación de complejos que incluyen tanto PG como integrinas (26).

Esta familia está constituida por los Sindecán-1, -2 (fibroglicano), -3 (N-Syndecan), y -4 (25).

La tumorigénesis se asocia con una serie de procesos en los que está presente la participación de los sindecanos. Estudios previos han demostrado que su expresión está aumentada en gliomas en comparación con el tejido cerebral normal. En concreto, los niveles de expresión de sindecanos en astrocitos derivados de tumores cerebrales primarios podría estar correlacionada con la progresión de dichos tumores (27) (28).

Por otro lado, los ADAMs (*desintegrina y metaloproteinasa*) comprenden una amplia familia de proteínas multidominio que participan en el proceso de adhesividad celular y presentan actividad metaloproteasa (29). En su estructura muestran una organización de dominios compleja que consiste en una secuencia señalizadora, un dominio metaloproteinasa, un dominio tipo desintegrina, una región rica en cisteína, un dominio tipo receptor del factor de crecimiento epidérmico, una región transmembrana y un dominio citoplasmático (10).

Se encuentran bastante relacionados con los sindecanos, ya que existen estudios que relacionan al rADAM12-cys con el sindecano-4, los cuales llevan a cabo una señalización que promueve proliferación celular y formación de fibras de estrés y donde también participan la PKC $\alpha$  e integrinas  $\beta$ 1 (29). Por otro lado, ADAM17 es un regulador importante de las funciones de los sindecanos en epitelios inflamados, ya que una inhibición del mismo se ha visto que bloquea la liberación de los sindecanos-1 y -4 solubles (30).

### **3.- Hipótesis y objetivos**

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que las células de astrocitoma humano 1321N1 expresan receptores funcionales para factores como trombina (Th) y ácido lisofosfatídico (LPA), los cuales se comportan como potentes mitógenos. Además, la proteína inflamatoria sPLA2-IIA también es capaz de promover el crecimiento de estas células tumorales y de activar vías de señalización intracelular asociadas a esta señal proliferativa. La hipótesis de trabajo que nos planteamos es que la presencia de estos factores/proteínas mitogénicas podría ser también crucial en la modulación de la capacidad adhesiva e invasiva de los astrocitomas.

Por lo tanto, debido a que en los procesos de invasión y metástasis se producen interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular, se planteó la realización de estudios encaminados a determinar los efectos de diversos estímulos mitogénicos, sobre el comportamiento de células de astrocitoma en relación con su capacidad adhesiva e invasiva y se fijaron los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio, en células de astrocitoma humano 1321N1, de la influencia de alguno de los componentes de la MEC (laminina, fibronectina y colágeno) en procesos de adhesión.
- 2.- Estudio, en células de astrocitoma humano 1321N1, de la acción de estímulos mitogénicos sobre adhesión a diferentes componentes de la MEC (laminina, fibronectina y colágeno).

3.- Estudio, en células de astrocitoma humano 1321N1, de la acción de estímulos mitogénicos sobre la expresión de proteínas mediadoras de la interacción célula-MEC y célula-célula: sindecanos (1 y 4), integrinas ( $\alpha_v\beta_5$ ,  $\beta_1$ ), moléculas de adhesión (ICAM-1)

4.- Estudio, en células de astrocitoma humano 1321N1, de la acción de estímulos mitogénicos sobre la expresión de proteínas implicadas en el remodelado de la MEC: proteínas matricelulares (lisis oxidasa)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.- Línea celular y condiciones de cultivo**

El modelo celular utilizado en este estudio fue la línea celular de astrocitoma humano 1321N1. Estas células son adherentes y crecen en monocapa en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa (1 g/L) y suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina; en un incubador con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C. Los experimentos se realizaron cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-85%, momento en el que el medio de crecimiento se cambió por DMEM completo sin suero. Tras 18-24 h de incubación, las células alcanzaron el estado de quiescencia y fue cuando se procedió a su estimulación con los diferentes agonistas.

*Material inductor de la adhesividad celular:* las células fueron estimuladas a 37°C durante los tiempos indicados con diferentes agonistas: 1  $\mu$ g/ml de fosfolipasa A2 secretada del tipo IIA (sPLA2-IIA); 0,5 UI/ml de trombina (Th); 2  $\mu$ M de ácido lipofosfatídico (LPA) y/o 0,4  $\mu$ M de factor de crecimiento epidérmico (EGF)

### **2.- Estudio de adhesión celular a distintas proteínas de MEC**

Con el fin de estudiar la influencia de la MEC en el comportamiento de las células 1321N1, las placas de cultivo de 96 pocillos se recubrieron con distintas proteínas de MEC: fibronectina (FN), laminina (L) y colágeno (Col). Se utilizaron: 1  $\mu$ g/pocillo de FN, 10  $\mu$ g/pocillo de L y 10  $\mu$ g/pocillo de Col. Las placas se trataron durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se lavaron tres veces con PBS. Como control se utilizaron pocillos sin recubrir.

Las células 1321N1 quiescentes, en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, se estimularon durante 24 h a 37°C con 1 µg/ml de sPLA2-IIA; 0,5 UI/ml de Th; o 2 µM de LPA. Pasado ese tiempo, las células se despegaron y se depositaron en la placa de 96 pocillos saturada con las distintas proteínas de MEC, donde se llevo a cabo el ensayo de adhesión, a una concentración de unas 40.000 células/pocillo. La placa se incubó durante 30 min a 4°C, seguido de un periodo de 2 horas a 37°C. Con el fin de eliminar las células no adheridas, tras la aspiración del medio de cultivo, se realizo un lavado con PBS. Las células adheridas se fijaron con paraformaldehido (PFA) al 4% (100 µl/pocillo) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el PFA, las células se tiñeron con cristal violeta al 10% (100 µl/pocillo), durante 5 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS se añadió 100 µl de ácido acético al 10% para solubilizar el colorante y así poder determinar la absorbancia a 570nm.

*Ensayos de adhesión celular en presencia del estímulo:* En algunos experimentos, la suspensión celular se reestimuló en las placas donde se realizó el ensayo de adhesión, con el estímulo usado inicialmente: 1 µg/ml de sPLA2-IIA; 0,5 UI/ml de Th; o 2 µM de LPA.

### **3.- Inmunodetección de proteínas celulares mediante citometría de flujo**

#### **3.1- Inmunodetección de proteínas de la superficie celular**

Las células 1321N1, en frascos de 25cm<sup>2</sup> (5 x 10<sup>6</sup> células/frasco), se incubaron a 37°C con 1 µg/ml de sPLA2-IIA; 0,5 UI/ml de Th; 2 µM de LPA o 0,4 µM de EGF. Tras la estimulación durante los tiempos indicados, las células se recogieron y se lavaron con PBS-1% BSA (p/v) a 4°C. A continuación, se fijaron con PFA durante 10 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS, las células se resuspendieron en PBS-1% BSA (p/v) y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 45 min a 4°C. Se utilizó una dilución 1:100 del anticuerpo anti-sindecán-1 (DL-101), anti-sindecán-4 (5G9), anti-LOX (ab31238) y anti-CD29-FITC (P4611); una dilución 2:10 del anticuerpo anti-ICAM-PE (HA58) y una dilución 3:100 del anticuerpo anti-αVβ5-PE (P1F5). Tras un lavado con PBS-1% BSA, cuando fue preciso, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente: anti-mouse IgG conjugado con FITC (1:1000) o anti-rabbit IgG conjugado con FITC (1:1000), durante 30 minutos a 4°C y a oscuras. Tras los lavados con PBS-1% BSA, las células se analizaron en un citómetro de flujo. Se utilizó un anticuerpo inespecífico como control de isotipo.

## 4.- Microscopía de fluorescencia

### 4.1.- Estudios de tinción nuclear sindecan-1 y sindecan 4

Las células se depositaron en cristales de 12 mm de diámetro tratados con Polyisina a una concentración de 10000 células/cristal. Tras la estimulación con 1 µg/ml de sPLA2-IIA y con 0,5 UI/ml de Th durante 24 h. y 30 min. a 37°C, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 4% (p/v) PFA durante 10 min. a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con 1µg/100µL de anti-sindecan-1 (DL-101) y con 1 µg/100 µL de anti-sindecan-4 (5G9) durante 20 min. Tras dos lavados de 5 min con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con FITC (1:1000). Las células se tiñeron también con DAPI, marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en Adenina y Timina en secuencias de ADN, durante 5 minutos. Todo el proceso se realizó a oscuras y a temperatura ambiente. Finalmente, tras tres lavados con PBS, los cristales se montaron, con la cara tratada hacia abajo, en portas y haciendo uso de la solución de Gervatol. Se dejaron secar en oscuridad durante 24 horas y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (x40).

## 5.-Presentación de los resultados

Los gráficos de barras reflejan los valores medios de los datos obtenidos  $\pm$  la desviación estándar, en aquellos casos en los cuales el número de experimentos lo permite (n=3). Se usó el programa *Graphpad Prism versión 4.0* utilizando el test de análisis de la varianza (ANOVA) y un posterior análisis mediante la prueba de Bonferroni de comparaciones múltiples. Los valores de  $p < 0,5$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

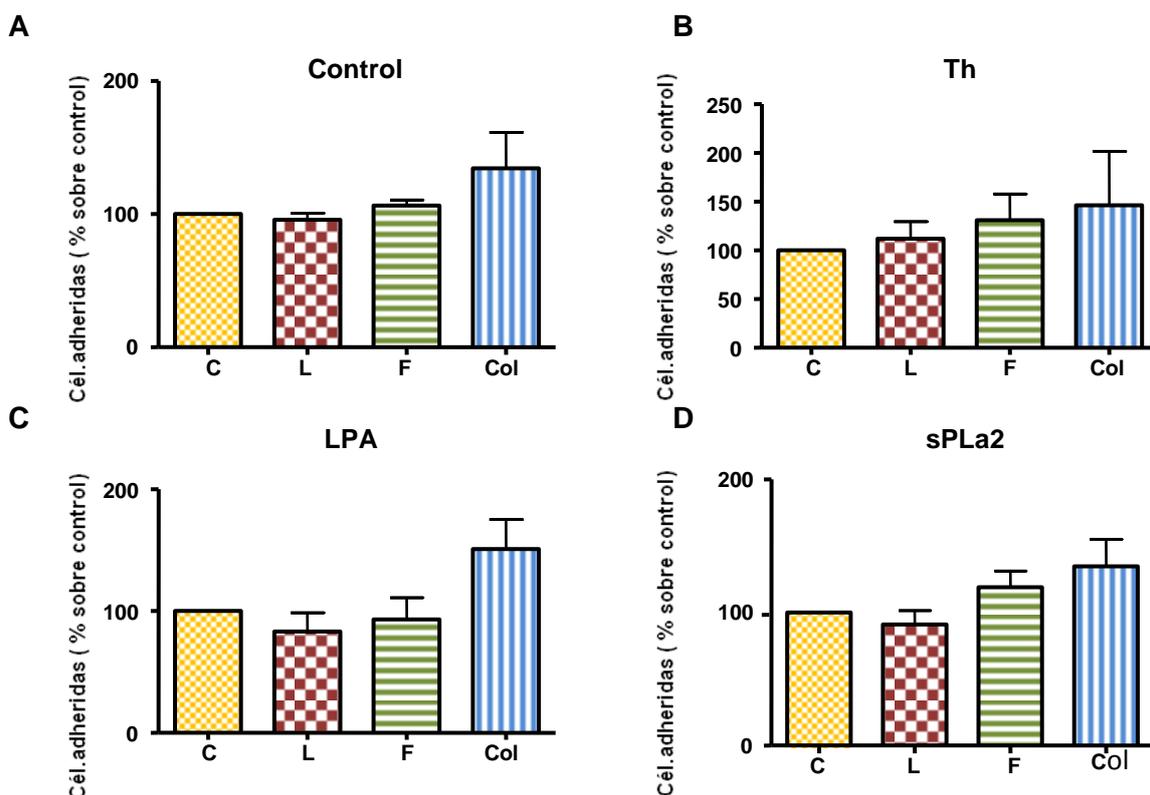
Estudios previos demuestran que el crecimiento de células adherentes *in vitro* no solo requiere de factores de crecimiento, sino también de una superficie sólida tapizada con proteínas de la MEC como colágeno, fibronectina o laminina, siendo las integrinas receptores de adhesión claves en este proceso (31).

Así, este estudio se centra en el análisis de la adhesividad de células de astrocitoma humano, tratadas con distintos estímulos mitogénicos, a diferentes proteínas de la MEC y la influencia de éstas en dicho proceso; así como en el

análisis de la expresión de proteínas mediadoras de la interacción célula-MEC y célula-célula y de proteínas implicadas en el remodelado de la MEC.

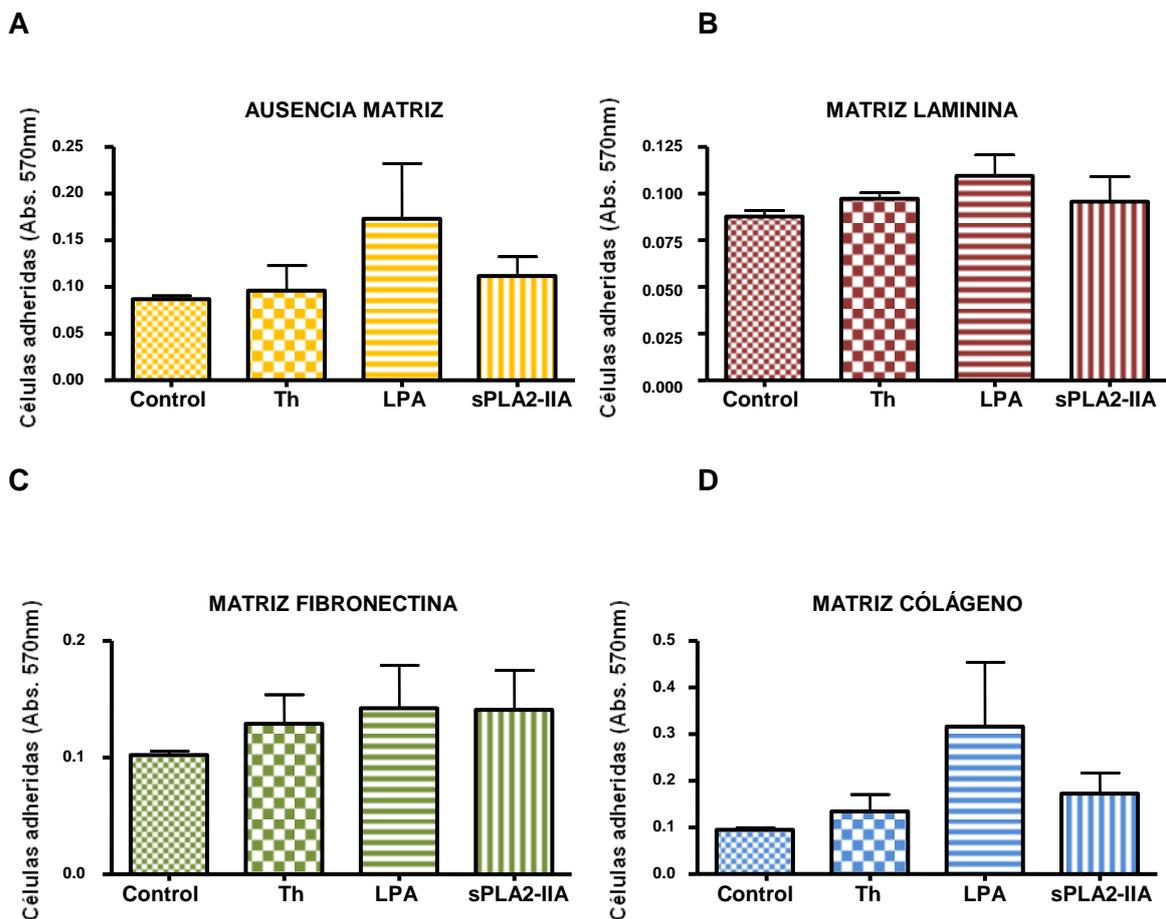
### 1.- Adhesividad a distintas proteínas de matriz extracelular de las células de astrocitoma humano 1321N1

Se ha estudiado la capacidad que presentan las células 1321N1 de interactuar con diferentes proteínas de MEC como FN, L o Col (Figura 1). El número de células adheridas a una superficie no tratada con proteínas de MEC, (C), se utilizó como valor de referencia “control de adhesión”. En la fig. 1A, se muestra que cuando las células se siembran sobre FN, L o COL no se produce ningún incremento significativo de la adhesión celular, con respecto a su siembra sobre una superficie no tapizada, C. Además, el tratamiento de las células con agonistas como Th, LPA, o sPLA2-IIA durante las 24 h previas al ensayo de adhesión tampoco indujo cambios significativos en su capacidad adhesiva (Fig. 1B, C y D). Hay que señalar no obstante, que cuando las células se siembran sobre una matriz de colágeno, si se produjo un ligero incremento en su capacidad adhesiva, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo.



**Figura 1.** Adhesión de células 1321N1 a proteínas de MEC. Las células 1321N1 sin estimular (A) o estimuladas durante 24 h con 0,5 UI/ml de Th (B), 2  $\mu$ M de LPA (C) o 1  $\mu$ g/ml de sPLA2-IIA (D), se sembraron sobre diferentes proteínas de MEC como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Las células adheridas se determinaron a las 2 h. Los valores representan el % de células adheridas sobre diferentes proteínas de MEC con respecto a las células adheridas en ausencia de matriz. C, control sin matriz; L, laminina; F, fibronectina; Col, colágeno. N=3 en duplicado.

En la Figura 2 se compara el efecto de los diferentes agonistas mitogénicos (sPLA2-IIA, Th y LPA) sobre la capacidad adhesiva de las células en una matriz determinada. En la fig. 2A, se muestra que en ausencia de MEC, el tratamiento con ninguno de los agonistas, Th, LPA o sP, causó incrementos significativo en la capacidad adhesiva de las células con respecto a las células no tratadas. Sorprendentemente, tampoco observamos diferencias significativas entre los diferentes estímulos cuando el ensayo de adhesión se realizó en presencia de superficies tratadas con L, FN o Col (Fig. 2B, C y D). Hay que señalar, no obstante, que sí se observó cierta tendencia a una mayor adhesión cuando las células son tratadas con los diferentes agonistas, en relación con células control sin estimular, no llegando en ningún caso a encontrarse diferencias significativas. En el caso de células estimuladas con LPA y sembradas sobre una superficie sin tratar o sobre una matriz de colágeno parece que dicha tendencia es mayor, aunque la dispersión en los datos obtenidos nos hace pensar que el número de repeticiones de los experimentos debería ser mayor.

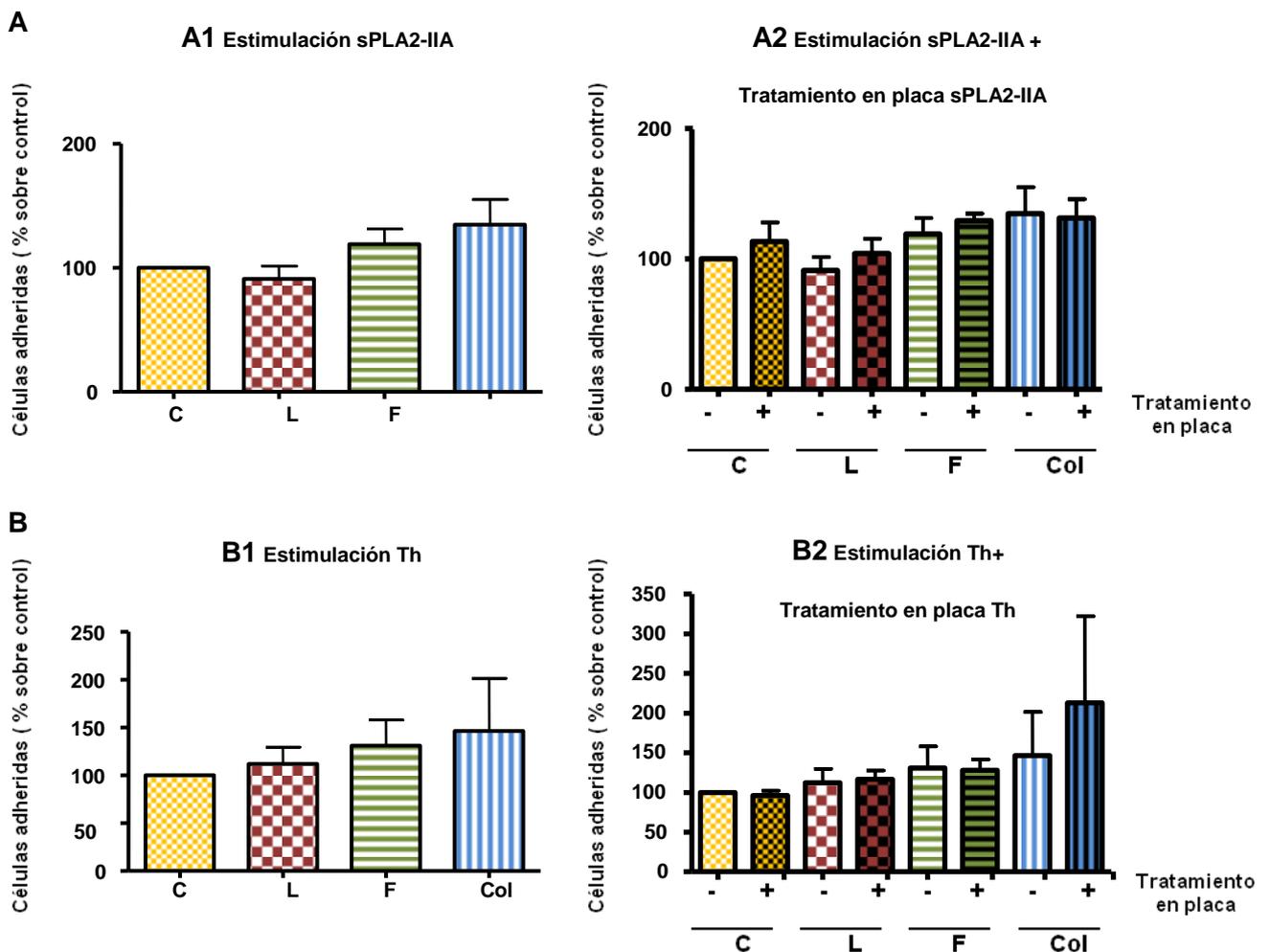


**Figura 2.** Efecto de la estimulación de células 1321N1 sobre la capacidad adhesiva a distintas proteínas de MEC. Las células 1321N1 se estimularon durante 24 h con los estímulos indicados, y a continuación fueron sembradas sobre una superficie sin tapizar (A), o sobre una superficie tapizada con laminina (B), fibronectina (C) o colágeno (D). Las células adheridas se determinaron a las 2 h. Los valores representan la fluorescencia emitida por las células sin estimular adheridas a cada matriz con respecto a las células estimuladas con los agonistas Th, LPA y sPLA2-IIA. N=3 en duplicado

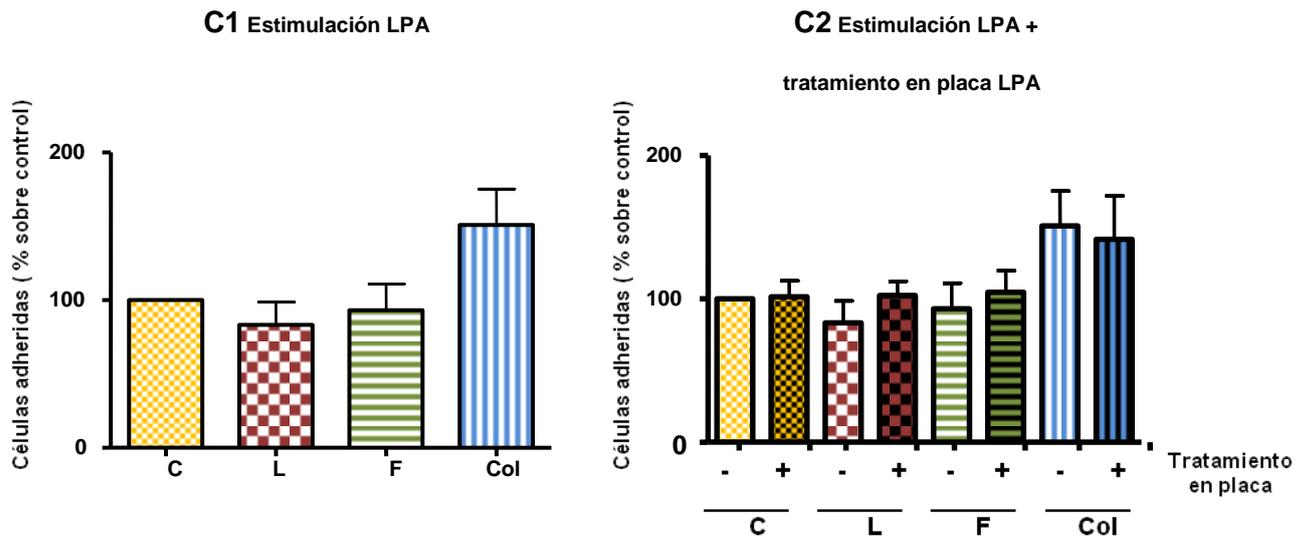
Por último, también evaluamos si la presencia continua del estímulo durante el periodo de adhesión producía algún efecto sobre la capacidad adhesiva de las células 1321N1 (Figura 3). El número de células adheridas a una superficie no tratada con proteínas de MEC, (C), será utilizado como valor de referencia “control de adhesión”. Las figuras 3 A1, B1, C1 Y D1 comparan la capacidad adhesiva, sobre las diferentes matrices, de las células tratadas con el agonista indicado durante las 24 h previas al ensayo de adhesión. Las figuras 3 A2, B2, C2 Y D2 comparan la capacidad adhesiva, sobre las diferentes matrices, de las células tratadas con el agonista indicado durante las 24 h previas al ensayo de adhesión y durante el mismo (2 h).

Se observó, que el tratamiento continuado con Th, LPA, o sPLA2-IIA durante el ensayo de adhesión no indujo cambios significativos en las propiedades adhesivas de las células (Fig. 3 A2, B2 y C2). Hay que señalar, no obstante, que en el caso de la Th sí que se observa una mayor adhesión de células al colágeno, no llegando a ser esa diferencia significativa.

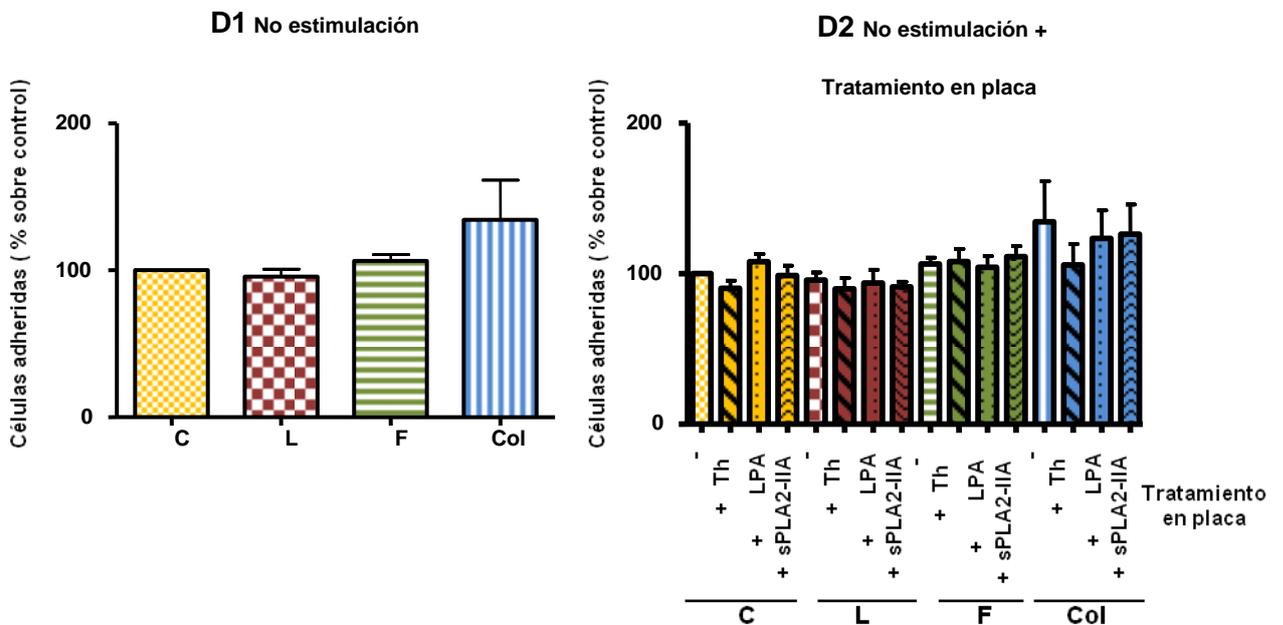
Finalmente, en la fig. 3D, se muestra que la estimulación con los agonistas únicamente durante el ensayo de adhesión (no tratamiento previo), tampoco produjo ningún cambio significativo de la capacidad adhesiva de las células, independientemente de la matriz utilizada.



C



D



**Figura 3.** Adhesión de células 1321N1 a diferentes proteínas de MEC. Las células 1321N1, estimuladas durante 24h con los distintos agonistas, se sembraron sobre diferentes proteínas de MEC como se detalla en el apartado de materiales y métodos y en ese instante se reestimularon con 1µg/ml de sPLA2-IIA (A), 0,5 UI/ml de Th (B) o 2 µM de LPA (C). También se realizó una estimulación en placa sobre células sembradas sin previa estimulación durante 24h. (D). Las células adheridas se determinaron a las 2 h. Los valores representan el % de células adheridas sobre diferentes proteínas de MEC con respecto a las células adheridas en ausencia de matriz. C, control sin matriz; L, laminina; F, fibronectina; Col, colágeno. N=3 en duplicado

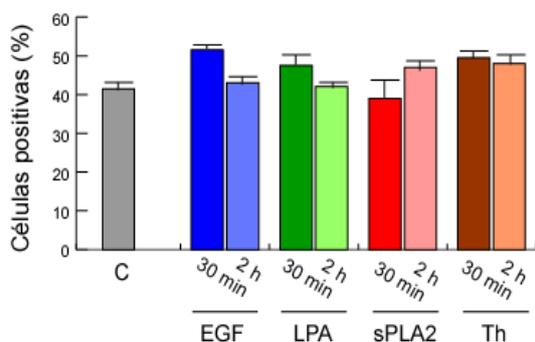
## 2.- Expresión de sindecan-1 y sindecan-4 en la línea de astrocitoma humano 1321N1

Los sindecanos participan en un amplio rango de procesos biológicos, y sus cadenas GAG les permiten unirse a proteínas de la MEC. Por ello se procedió a estudiar la expresión de sindecan-1 (Figura 4) y sindecan-4 (Figura 5) en las células 1321N1 y su modulación por diferentes agonistas.

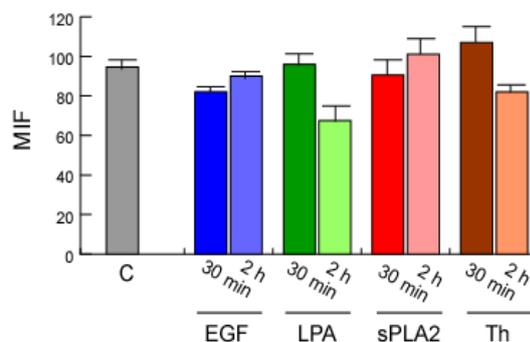
Mediante citometría de flujo y con el uso de anticuerpos específicos, observamos que las células de astrocitoma expresan basalmente sindecan-1 y sindecan-4. El tratamiento durante 30 min, 2 h y 24 h con los diferentes agonistas no modificó sus niveles de expresión (Fig. 4 y 5).

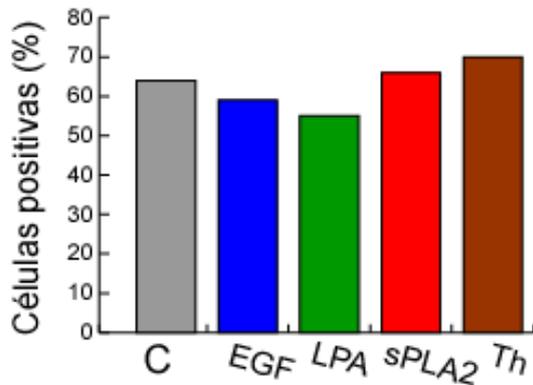
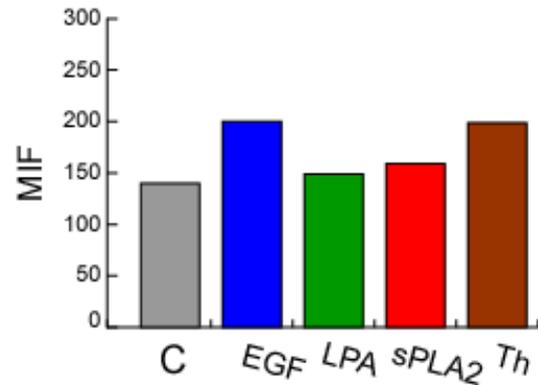
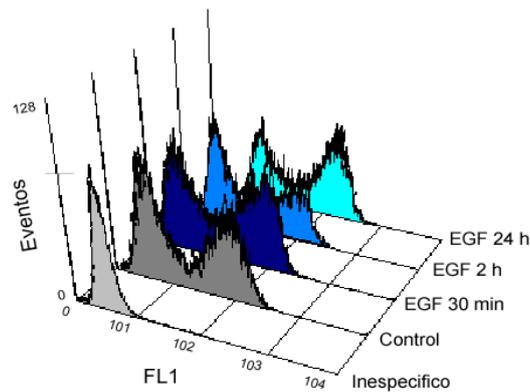
En el caso del sindecan-1, las figuras 4A y B muestran el % de células positivas para ésta proteína y los valores de intensidad de fluorescencia media (MIF, Median Fluorescent Intensity), respectivamente. La estimulación de las células 1321N1 con los agonistas indicados durante 30 min y 2 h no produjo ningún cambio significativo de estos parámetros, con respecto a las células sin tratar (n=3). Las figuras 4C y D muestran que el % de células positivas y los valores MIF, respectivamente, tampoco fue modificada tras la estimulación con los agonistas durante 24 h. Los datos de 24 h se presentan por separado debido a que este experimento sólo se pudo llevar a cabo una vez. La figura 4E es un histograma representativo generado en el análisis de citometría de flujo, donde se muestra la intensidad de fluorescencia en la células 1321N1 en las condiciones experimentales indicadas. Los mismos estudios se llevaron a cabo para el sindecan-4 (Fig.5).

**A**

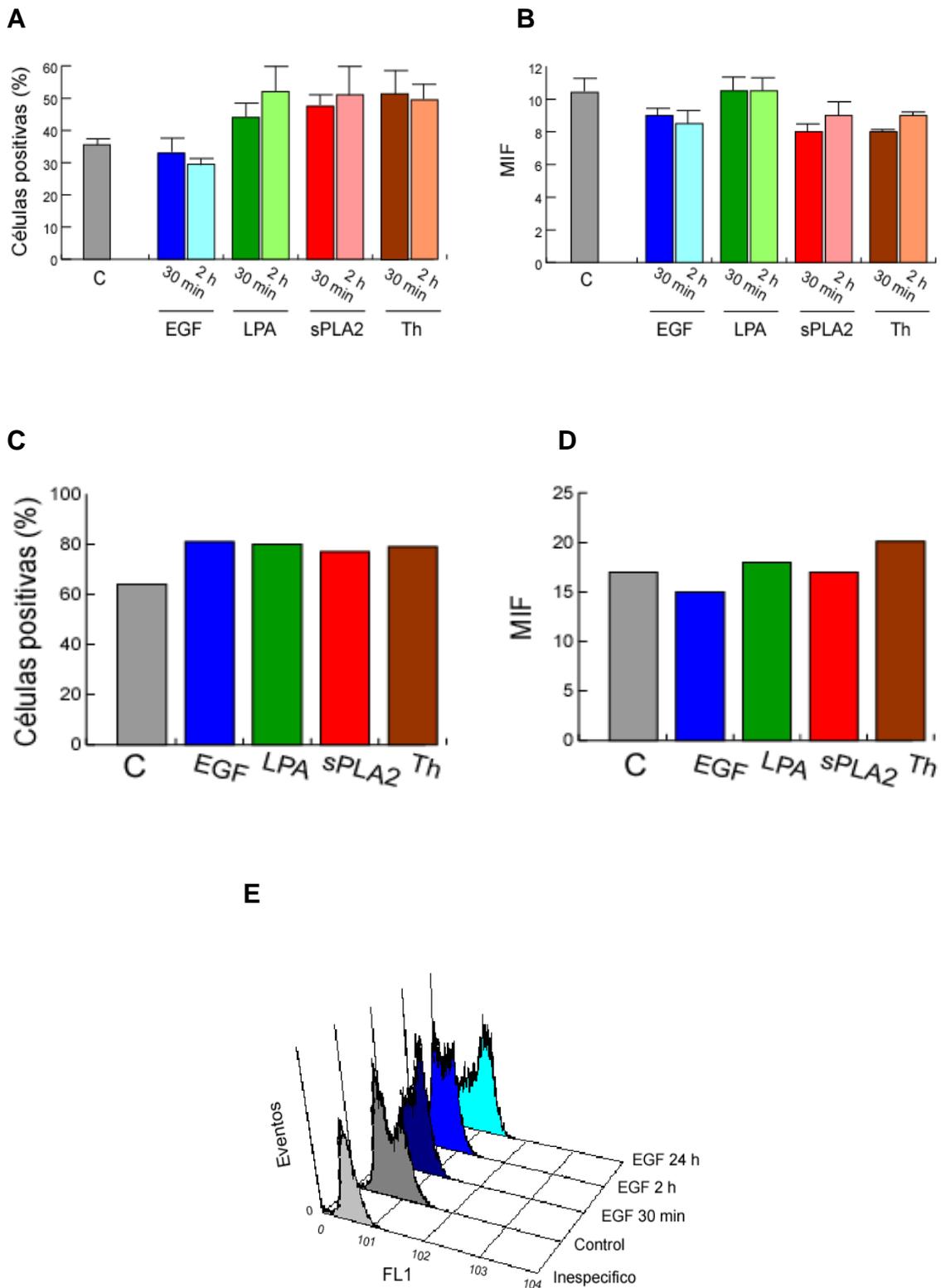


**B**



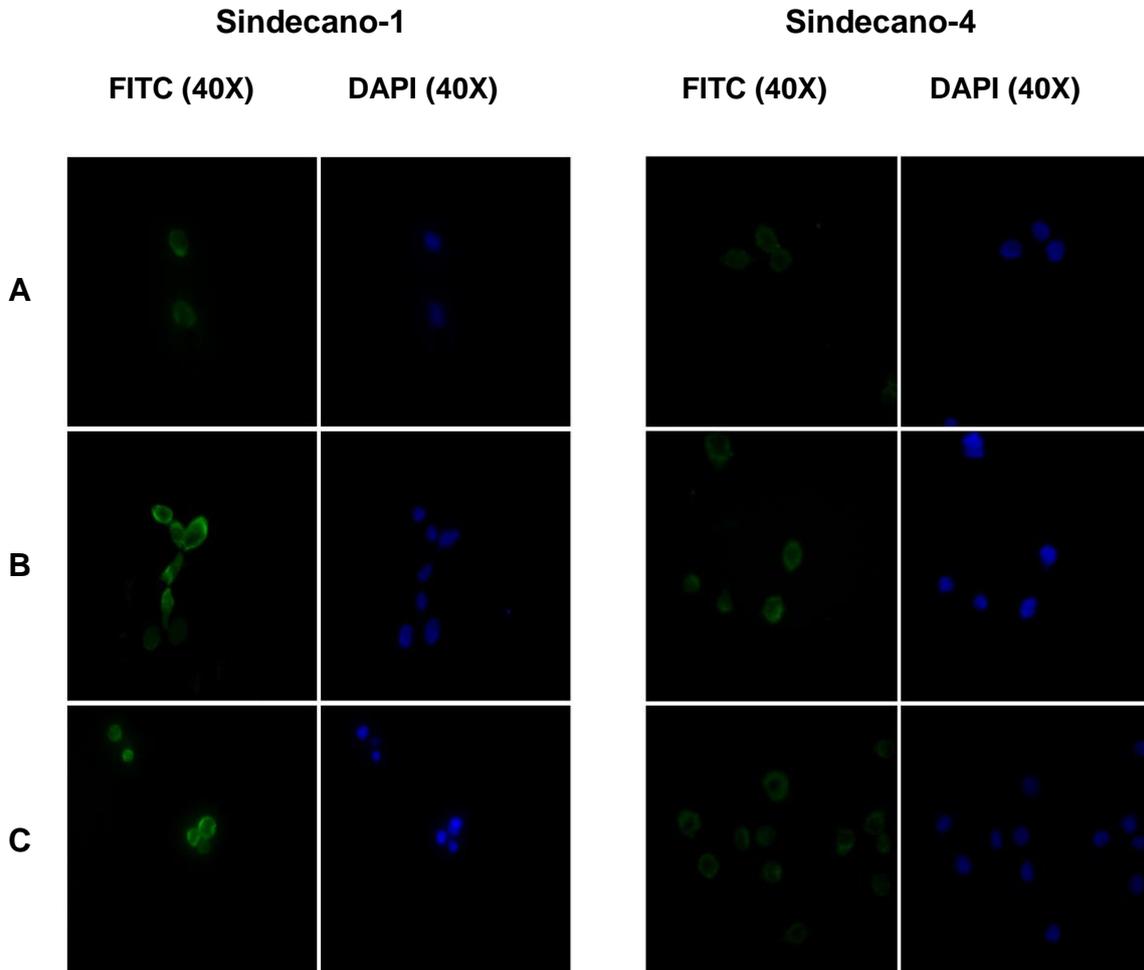
**C****D****E**

**Figura 4.** Expresión del proteoglicano sindecano-1 en la línea de astrocitoma humano 1321N1. Representación del % de células positivas (A) y de la intensidad de fluorescencia media (MIF) (B), de células control y células estimuladas durante 30 min y 2 h con los agonistas EGF, LPA, sPLA2-IIA y Th. Representación de los resultados con una estimulación a largo plazo, 24 h, con los mismos agonistas (C y D). Histograma representativo, para para el agonista EGF, de la fluorescencia del pico vs al número de eventos a todos los tiempos (E). El pico gris claro representa el control inespecífico. El pico gris oscuro corresponde a células control sin estimular y los picos azules a células estimuladas con EGF a tres tiempos diferentes. Las células se marcaron con un anticuerpo específico frente a sindecano-1, como se describe en el apartado de materiales y métodos y la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo. N=3.



**Figura 5.** Expresión del proteoglicano syndecano-4 en la línea de astrocitoma humano 1321N1. Representación del % de células positivas (A) y de la intensidad de fluorescencia media (MIF) (B), de células control y células estimuladas durante 30 min y 2 h con los agonistas EGF, LPA, sPLA2-IIA y Th. Representación de los resultados con una estimulación a largo plazo, 24 h, con los mismos agonistas (C y D). Histograma representativo, para el agonista EGF, de la fluorescencia del pico vs al número de eventos a todos los tiempos (E). El pico gris claro representa el control inespecífico. El pico gris oscuro corresponde a células control sin estimular y los picos azules a células estimuladas con EGF a tres tiempos diferentes. Las células se marcaron con un anticuerpo específico frente a syndecan-1, como se describe en el apartado de materiales y métodos y la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo. N=3.

Para completar este estudio mediante microscopía de fluorescencia se obtuvieron, como se describe en el apartado de materiales y métodos, algunas imágenes representativas de la expresión de sindecano-1 y sindecano-4 (Fig.6) en células estimuladas con sPLA2-IIA y Th. Se realizó también tinción de las células con DAPI.



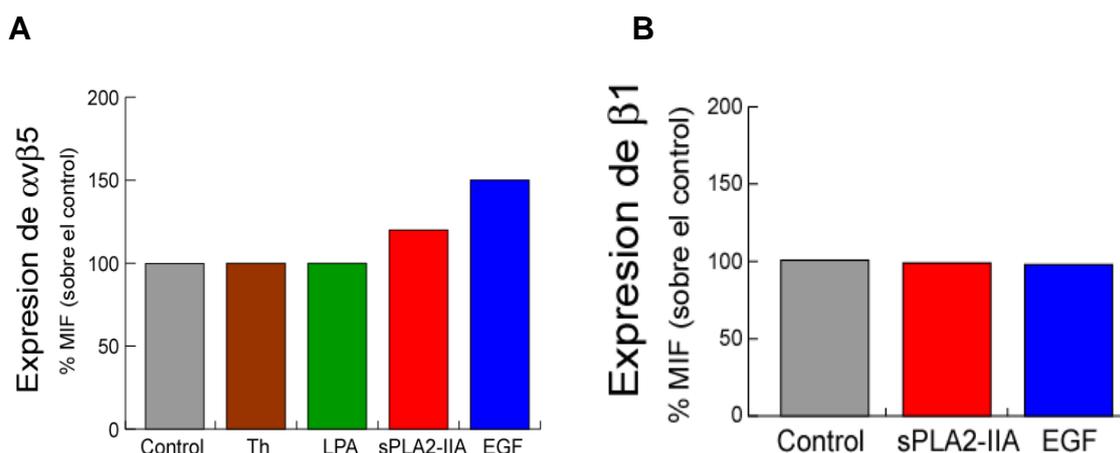
**Figura 6.** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de sindecano-1 y sindecano-4 en la línea de astrocitoma humano 1321N1. Las células 1321N1 sin estimular (A) o estimuladas durante 24 h con 1µg/ml de sPLA2-IIA (B) o 0,5 UI/ml de Th (D), se sembraron sobre cristales tratados con polyisina, como se detalla en el apartado de materiales y métodos, y se marcaron con un anticuerpo específico frente al sindecano-1 o sindecano-4, seguido del anticuerpo secundario correspondiente conjugado a FITC. La fluorescencia emitida por las células se visualizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (x40). Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes y para todos los casos aparece la fluorescencia emitida por las células cuando estas son teñidas con el colorante DAPI para visualizar los núcleos.

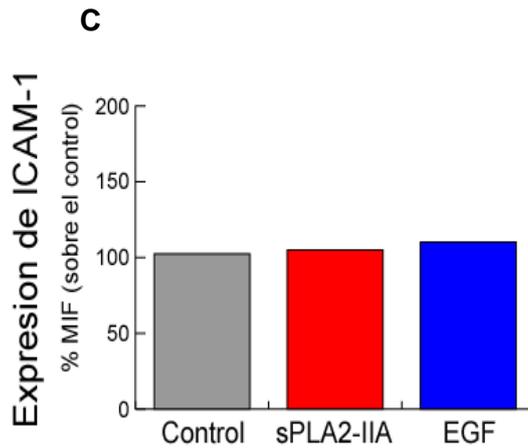
### 3.- Expresión de integrinas y moléculas de adhesión en la línea de astrocitoma humano 1321N1

Debido a que las integrinas son los principales receptores de adhesión, se propuso estudiar la expresión de las integrinas  $\alpha\beta5$  y  $\beta1$  en las células 1321N1 y su modulación por diferentes agonistas (Fig. 7).

Mediante citometría de flujo y con el uso de anticuerpos específicos, observamos que las células de astrocitoma expresan basalmente  $\alpha\beta5$  y  $\beta1$  y que debido al efecto de los agonistas sus expresiones no se ven modificadas (Fig. 8A y 8B). Esto se estudió analizando los valores de intensidad de fluorescencia media (MIF). El tratamiento durante 24 h con los agonistas Th y LPA no modificó los niveles de expresión  $\alpha\beta5$ , mientras que la sPLA2-IIA y el EGF provocaron un ligero aumento en la expresión de este marcador. No observamos cambios en los niveles de expresión de la integrina  $\beta1$  tras la estimulación con la sPLA2-IIA y el EGF

En este punto también se estudió la expresión de la proteína de adhesión ICAM 1 y su modulación por distintos agonistas (Fig. 8C) y se observó que estas células ya muestran una expresión basal de dicha proteína y que la estimulación con los agonistas sPLA2-IIA y EGF no modificó tampoco dicha expresión.



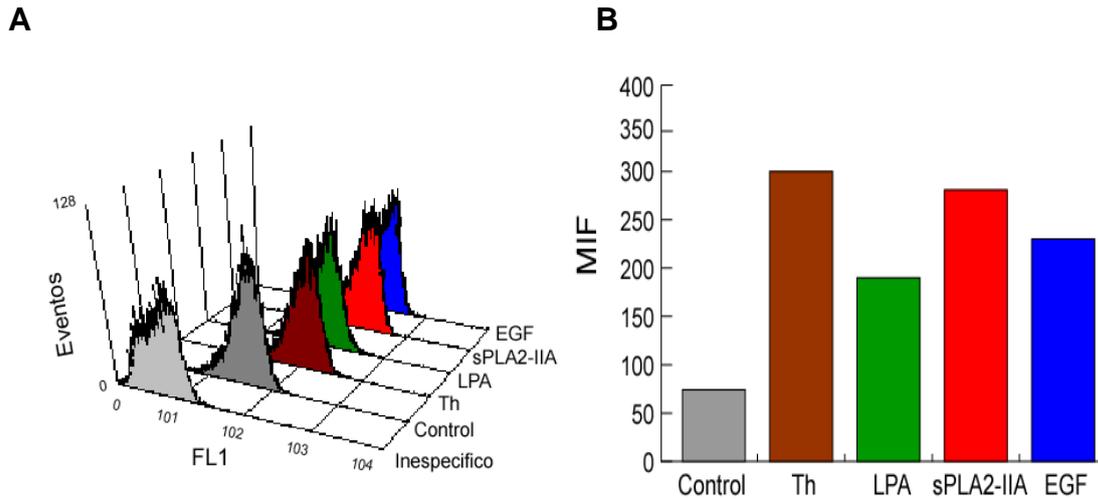


**Figura 7.** Expresión de las integrinas  $\alpha V\beta 5$  y  $\beta 1$  y de la proteína de adhesión ICAM 1 en la línea de astrocitoma humano 1321N1. Representación de los valores de intensidad de fluorescencia media en células control y células estimuladas con distintos agonistas para el estudio de la expresión de  $\alpha V\beta 5$  (A),  $\beta 1$  (B) e ICAM 1 (C). Las células se marcaron con un anticuerpo específico frente a las distintas proteínas analizadas como se describe en el apartado de materiales y métodos y la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo.

#### **4.- Expresión de proteínas matricelulares, como LOX-1, en la línea de astrocitoma humano 1321N1**

Por último, estudiamos la expresión en las células 1321N1 de proteínas matricelulares como la lisil oxidasa-1 (LOX-1) que regula el entrecruzamiento de las fibras de colágeno en la MEC.

Mediante citometría de flujo y con el uso de un anticuerpo específico, observamos que las células de astrocitoma expresan basalmente la proteína LOX-1, y que tras el tratamiento durante 24 h con los diferentes agonistas su expresión aumenta (fig.8). Siendo el aumento más llamativo cuando el agonista usado es la Th o la sPLA2-IIA.



**Figura 8.** Expresión de la proteína matricelular LOX-1 en la línea de astrocitoma humano 1321N1. (A) Histograma representativo, obtenido mediante citometría de flujo: fluorescencia vs al número de eventos, de células control y células estimuladas durante 24h con Th, LPA, sPLA2-IIA y EGF. (B) Representación de los valores de intensidad de fluorescencia media, (MIF), para cada uno de los casos. Las células se marcaron con un anticuerpo específico frente a LOX-1, como se describe en el apartado de materiales y métodos y la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo. N=2.

## DISCUSIÓN

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas la adhesión celular a la MEC juega un papel clave en la inducción de diversas actividades biológicas como son la migración-invasión, la supervivencia-apoptosis y la proliferación celular (4).

Los tumores humanos están normalmente rodeados por una matriz con alta concentración de colágeno, lo que lleva a un incremento en la tensión exógena de la matriz (32), que se refleja en unos efectos dramáticos en la señalización intracelular, en los procesos de adhesión y en la contractibilidad celular. También se ve alterada la actividad de RhoA, el citoesqueleto de actina, el foco de adhesión, los contactos célula-célula, la polaridad del tejido y el ritmo de crecimiento (33).

El astrocitoma es el tumor primario más común en el cerebro. El grado de glioblastoma es el que presenta peor pronóstico y una supervivencia media post-operación menor a los dos años (34). Las células presentan unos potenciales de invasión y proliferación altos y por ello, muchos estudios se han centrado en dilucidar los mecanismos moleculares de la adhesión en este tipo de tumor. Se sabe que las células de astrocitoma muestran preferentemente una adhesión a proteínas de la MEC específicas (35). También, se ha implicado a la laminina, por ejemplo, en gran cantidad de fenotipos migratorios de células de glioma (36), siendo el sustrato más efectivo para la adhesión y

migración de células de astrocitoma (35). Por ello, hemos realizado estudios encaminados a determinar los efectos de diversos estímulos mitogénicos sobre la adhesión de células 1321N1 a proteínas de la MEC, en concreto a tres proteínas clave de esta matriz: fibronectina, laminina y colágeno. Y también hemos querido conocer la influencia de éstas sobre las células. En general, nuestros datos no muestran diferencias significativas entre la capacidad adhesiva de células control, sin estimular, y la de células tratadas a distintos tiempos con los diferentes agonistas seleccionados.

Tampoco encontramos diferencias en las propiedades adhesivas entre células sembradas sobre una superficie sin tapizar con respecto a la siembra de células sobre superficies que contenían proteínas de MEC, sugiriendo que no hay una influencia de éstas sobre nuestras células.

A pesar de no encontrarse diferencias significativas en casi ninguno de los casos analizados si que se observa, en alguno de los tratamientos, mayor tendencia a la adhesión; como, por ejemplo, cuando las células son sembradas sobre una superficie tapizada con colágeno y en general, como respuesta de estas células a los agonistas usados. Si que se podría decir que el tratamiento de células con LPA induce un aumento significativo de la adhesión a fibronectina en estas células.

Estos resultados contradicen algunos estudios de la literatura, donde se han descrito respuestas significativas de células de astrocitoma a los estímulos utilizados (42), (43), (44). Por ello, para poder concluir definitivamente que el comportamiento adhesivo de células 1321N1 no se altera debido a su interacción con proteínas concretas de la MEC, ni tampoco como consecuencia del tratamiento con los agonistas seleccionados, creemos que estos estudios deben ser replanteados modificando y afinando condiciones experimentales.

Por otra parte, muchos ligandos de la MEC contienen dominios de unión tanto a integrinas como a proteoglicanos, lo que sugiere que estos dos tipos de receptores de adhesión funcionan en consonancia para estimular la reorganización del citoesqueleto, la migración, etc.; Por ello, se procedió al estudio de la expresión de los proteoglicanos sindecano-1 y sindecano-4 en células de astrocitoma tras la estimulación con diversos agonistas.

El mecanismo por el cual los sindecanos pueden actuar como co-receptores junto con las integrinas no está claro, se piensa que es su dominio extracelular a través de sus cadenas de heparán sulfato quien interviene. Así se activarán los dominios conservados transmembrana y citoplasmático a través de los cuales cascadas de señalización de adhesión mediadas por sindecanos pueden alterar o amplificar vías de señalización mediadas por integrinas (26).

La tumorigénesis se asocia con una serie de procesos en los que está presente la participación de los sindecanos. Estudios previos han demostrado

que la expresión de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) está aumentada en gliomas en comparación con el tejido cerebral normal. La expresión de HSPGs en astrocitos derivados de tumores cerebrales primarios podría estar correlacionada con la progresión de dichos tumores (27) (28).

En el caso del sindecano-1 hay estudios que muestran que su función está alterada en cáncer, pudiendo encontrarse tanto “Up-regulated” como “Down-regulated”. Su dominio extracelular tiene 5 sitios donde las cadenas GAG pueden unirse: tres hacia el extremo N-terminal y dos cerca de la membrana plasmática (37).

Por su parte el sindecano-4 es esencial para la remodelación patológica. Hay estudios centrados en su expresión y pérdida durante daño cardíaco, que muestran un incremento en la expresión del mismo correlacionada con la aparición de citoquinas inflamatorias y una pérdida del ectodominio provocada por TNFalpha, IL-1beta y LPS (38).

Nos planteamos el estudio de estos sindecanos a distintos tiempos para así poder ver tanto una posible inducción de la proteína, tiempos largos, como una posible pérdida del ectodominio, tiempos cortos, debido a la acción de metaloproteasas, como ya hemos descrito; ya que los estímulos usados activan dichas metaloproteasas. Nuestros resultados muestran que a ninguno de los tiempos se aprecian diferencias significativas en la expresión de estos sindecanos en células estimuladas con respecto a las células control, encontrándose expresados ya basalmente ambos sindecanos en estas células.

Además, para completar el estudio se realizó un análisis de la expresión de ciertas proteínas claves en la modulación del proceso de adhesión celular.

En primer lugar, y debido a que las integrinas con los principales receptores de adhesión de las células, se quiso comprobar la variación de la expresión de dos de ellas, en concreto de la integrina  $\alpha V\beta 5$  y de la subfamilia  $\beta 1$ , como consecuencia del tratamiento de las células con los agonistas seleccionados. Se sabe que las integrinas  $\alpha v$ , y en concreto la integrina  $\alpha V\beta 5$ , son expresadas en vivo por astrocitos y que dicha expresión se encuentra “up-regulated” en ciertas enfermedades neurológicas (39).

También se sabe que diversos miembros de la subfamilia de integrinas  $\beta 1$  se expresan en astrocitos. Proteínas de la MEC como la fibronectina o la laminina establecen su unión a las células a través de esta subfamilia (14).

En segundo lugar, se estudió la expresión de la molécula de adhesión I-CAM, ya que se une a las integrinas del tipo CD11a/CD18 o CD11b/CD18 y, además, es ligando de la integrina LFA-1 (receptor presente en todos los leucocitos), del fibrinógeno y del ligando 1 de macrófagos (Mac-1) (40). Estas tres proteínas se expresan generalmente en las células endoteliales y los leucocitos, y se unen a

ICAM-1 para facilitar la trans migración de leucocitos a través de endotelios vasculares en procesos tales como la extravasación y la respuesta inflamatoria. Como resultado de estas características de unión, ICAM-1 clásicamente se ha considerado molécula de adhesión intercelular.

Nuestros resultados muestran que la expresión de ninguna de estas tres moléculas varía como consecuencia del tratamiento de las células con los distintos agonistas. Como se trata de estudios preliminares, aún incompletos, habría que repetir los mismos para poder concluir que no hay diferencias significativas en la expresión como consecuencia de la estimulación celular con dichos agonistas.

Por último, se estudió la expresión de la proteína matricelular lisil oxidasa 1 (LOX-1). LOX-1 se encuentra frecuentemente expresada en altos niveles en algunos tumores, lo que conduce a un aumento en la rigidez del estroma. Esta expresión localizada proporciona una oportunidad para atacar proteínas de tumores invasivos (41). En este caso, sí se ha visto significativamente aumentada la expresión de esta molécula en células 1321N1 cuando éstas eran estimuladas con Th, LPA, sPLA2-IIA y EGF durante 24h., lo que nos permite concluir que estos agonistas pueden modificar las características de adhesividad de células tumorales a través de la modulación de la proteína matricelular LOX-1.

En resumen, con este estudio hemos querido dar un paso más en la clarificación de los efectos de diversos estímulos mitogénicos sobre el comportamiento de células de astrocitoma y su capacidad adhesiva e invasiva. Al no encontrarse diferencias significativas en los parámetros analizados como consecuencia de la estimulación de las células con los distintos agonistas, creemos que es necesario la revisión de todo el proceso y la repetición de algunos experimentos reconsiderando las condiciones experimentales empleadas. Así, nos planteamos modificar tanto las dosis de los compuestos usados, como los tiempos de estimulación fijados.

## **CONCLUSIONES**

Los estudios in vitro de interacción de las células 1321N1 con componentes de la matriz extracelular permiten concluir que:

-El comportamiento de las células 1321N1 no se altera tras su interacción con componentes individuales de la MEC (colágeno de tipo 1, laminina y fibronectina). En presencia de estos sustratos no se incrementa la capacidad adhesiva de las células. La estimulación celular tampoco promueve la adhesividad celular frente a ninguno de los ligandos de la MEC estudiados.

Los estudios in vitro de expresión de proteínas de superficie en las células 1321N1 permiten concluir que:

-Las células 1321N1 expresan constitutivamente proteínas que participan en las interacciones célula-MEC y célula-célula, que no se ven afectadas tras la estimulación celular

-Las células 1321N1 expresan constitutivamente proteínas matricelulares que participan en el entrecruzamiento y la estabilidad de las fibras de colágeno, como LOX, y la estimulación celular da lugar a un aumento de su expresión.

### **Futuros estudios deberán contemplar:**

- 1.- Revisar los procedimientos técnicos del ensayo de adhesión.
- 2.- Realizar cinéticas de adhesión: Puede ser que 2 horas no sea un tiempo óptimo para estos estudios en nuestro sistema celular.
- 3.- Realizar ensayos de adhesión empleando diferentes concentraciones de las proteínas de MEC: puede ser que las dosis elegidas no den señales óptimas para nuestras condiciones experimentales
- 4.- Realizar un estudio completo de expresión de las diferentes integrinas en las células 1321N1
- 5.- Medir actividad LOX en el medio de cultivo celular, en las diferentes condiciones de tratamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dorland, W. (2007). *Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia: PA: Saunders.
- 2.- Laczko, R., Szauter, K., Jansen, M., Hollosi, P., Muranyi, M., Molnar, J., . . . Csiszar, k. (2007). Active lysil oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33, 631-643.
- 3.- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, j. (2013). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129.
- 4.- Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S., & Chatterjee, A. (2013). Integrins and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*, 7:3, 251-261.
- 5.- Harisi, R., & Jeney, A. (2015). Extracellular matrix as target for antitumor therapy. *Onco Targets and Therapy*, 1387-1398.
- 6.- Aмосa, M., & Pascual, D. (2012). *Neurología y neurocirugía* (Vol. 91(4)). Madrid: CTO Editorial.
- 7.- Fukushima, Y., Ohnishi, T., Arita, N., Hayakawa, T., & Sekiguchi, K. (1998).  $\alpha\beta 1$ -mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. *International Journal of Cancer*, 76, 63-72.
- 8.- Werner, P., Inge, B., Detlef, S., & Roggendorf, W. (1993). Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *American Journal of Pathology*, 143, 154-163.
- 9.- Aplin, A., Howe, A., Alahari, S., & Juliano, R. (1998). Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacological Reviews*, 50, 197-263.
- 10.- Cascales Angosto, M., & Álvarez-Gómez, J. Á. (2012). Metaloproteasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 76(1), 59-84.
- 11.- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular. *Journal of Pathology*, 200, 423-428.
- 12.- Zaidel-bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyenger, R., & Geiger, B. (2007). Funcional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol.*, 9(8), 858-867.
- 13.- Schwartz, M. A. (1993). Signaling by Integrins: Implications for Tumorigenesis. *Cancer Research*, 53, 1503-1506.
- 14.- Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- 15.- Humphries, M. J. (2000). Integrin Structure. *Biochemical Society*, 28, 311-340.

- 16.- Geiger, B., & Yamada, K. M. (2011). Modular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-21.
- 17.- Juliano, R. L., & Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 120, 577-585.
- 18.- Clark, E., & Brugge, J. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 233-239.
- 19.- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O., Gutkind, J. S., Burdello, P. D., Akiyama, S. K., & Yamada, K. M. (1995). Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *The Journal of Cell Biology*, 131, 791-805.
- 20.- Gumbiner, B. M. (1996). Cell Adhesion: The molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*, 84, 345-357.
- 21.- Chen, Q., Kinchln, M. S., & Lins, T. H. (1994). Integrin-mediated Cell Adhesion Activates Mitogen-activated Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26602-26605.
- 22.- Kwon, M.-J., Jang, B., Youn Yi, J., Han, I.-O., & Oh, E. S. (2012). Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEEBS Letters*, 586, 2207-221.
- 23.- Rapraeger, A. C. (2000). Syndecan-regulated Receptor Signaling. *The Journal of Cell Biology*, 149, 995-997.
- 24.- Woods, A. (2001). Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *The journal of Clinical Investigation*, 107, 935-941.
- 25.- Watanabe, A., Mabuchi, T., Satoh, E., Furuya, K., Zhang, L., Maeda, S., & Naganuma, H. (2006). Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kB in upregulation of syndecan-1 expression. *Journal of Neuro-Oncology*, 77, 25-32.
- 26.- Beauvais, D. M., & Rapraeger, A. C. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- 27.- Roberts, D. D. (1996). Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin- 1. *The FASEB Journal*, 1183-1191.
- 28.- Steck, P. A., Moser, R. P., Bruner, J. M., Liang, L., Freidman, A. N., Hwang, T.-L., & Yung, W. K. (1989). Altered Expression and Distribution of Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Gliomas. *Cancer Research*, 49, 2096-2103.
- 29.- Thodeti, C. K., Albrechtsen, R., Grauslund, M., Asmar, M., Larsson, C., Tadaka, Y., . . . Wewer, U. M. (2003). ADAM12/Syndecan-4 Signaling Promotes beta1 Integrin-dependent Cell Spreading through Protein Kinase Calpha and RhoA. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 9576-9584.
- 30.- Pruessmeyer, J., Martin, C., Hess, F. M., Schwarz, N., Schmidt, S., Kogel, T., . . . Ludwig, A. (2010). A Disintegrin and Metalloproteinase 17 (ADAM17) Mediates

Inflammation-induced Shedding of Syndecan-1 and -4 by Lung Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 555-564.

- 31.- Ingber, D. E. (1990). Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Cell Biology*, 87, 3579-3583.
- 32.- Nelson, C. M., & Bissell, M. J. (2006). Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 22, 287-309.
- 33.- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., . . . Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8, 241-254.
- 34.- Liang, Q., Ma, C., Zhao, Y., Gao, G., & Ma, J. (2013). Inhibition of STAT3 Reduces Astrocytoma Cell Invasion and Constitutive Activation of STAT3 Predicts Poor Prognosis in Human Astrocytoma. *Plos One*, 8.
- 35.- Giese, A., Rief, M. D., Loo, M. A., & Berens, M. E. (1994). Determinants of Human Astrocytoma Migration. *Cancer Research*, 54, 3897-3904.
- 36.- Friedlander, D. R., Zagzag, D., Shiff, B., Cohen, H., Allen, J. C., Kelly, P. J., & Grumet, M. (1996). Migration of Brain Tumor Cells on Extracellular Matrix Proteins in Vitro Correlates with Tumor Type and Grade and Involves  $\alpha$ V, and  $\beta$ 1 Integrins. *Cancer Research*, 56, 1939-1947.
- 37.- Stepp, M. A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., & Pajoohesh-Ganji, A. (2015). Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Advances in Wound Care*, 4, 235-248.
- 38.- Strand, M. E., Herum, K. M., Rana, Z. A., Skrbic, B., Askevold, E. T., Dahl, C. P., . . . Lunde, I. G. (2013). Innate immune signaling induces expression and shedding of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 in cardiac fibroblast and myocytes, affecting inflammation in the pressure-overloaded heart. *The FEBS Journal*, 280, 2228-2247.
- 39.- Milner, R., Huang, X., Wu, J., Nishimura, S., Pytela, R., Sheppard, D., & French-Constant, C. (1999). Distinct roles for astrocyte  $\alpha$ v $\beta$ 5 and  $\alpha$ v $\beta$ 8 integrins in adhesion and migration. *Journal of Cell Science*, 112, 4271-4279.
- 40.- Rothlein, R., Dustin, M., Marlin, S., & Springer, T. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *Journal Immunology*, 1270-1274.
- 41.- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., . . . Hendrix, M. J. (2002). A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion. *Cancer Research*, 62, 4478-4483.
- 42.- Sayyah, J., Bartakova, A., Nogal, N., Quilliam, L. A., & Stupack, D. G. (2014). The Ras-related Protein, Rap1A, Mediates Thrombin-stimulated, Integrin-dependent Glioblastoma Cell Proliferation and Tumor Growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 17689-17698.

- 43.- Kreps, D. M., Whirrlie, S. M., Hoffman, J. M., & Toews, M. L. (1993). Lysophosphatidic acid mimics serum-induced sensitization of cyclic AMP accumulation. *The FASEB Journal*, 1376-1380.
- 44.- Hernández, M., Martín, R., García-Cubillas, M. D., Maeso-Hernández, P., & Nieto, M. (2010). Secreted PLA2 induces proliferation in astrocytoma through the EGF receptor another inflammation-cancer link. *Neuro-Oncology*.