



Escuela de
Bio y Nanotecnologías
EByN_UNSAM

MICROAMBIENTE TUMORAL: EL ROL DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA

Tesis presentada por la Lic. Daiana L. Vitale
para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología
de la Universidad Nacional de San Martín

Directora de tesis: Dra. Laura D. Alaniz

Año: 2022



C I T N O B A

Durante la realización del presente trabajo de tesis se publicaron dos trabajos de investigación en revistas referentes del área de estudio y de impacto internacional. A su vez se publicó un protocolo experimental desarrollado y aplicado durante el trabajo y se recibió un premio destacado en el área:

-Initial Identification of UDP-Glucose Dehydrogenase as a Prognostic Marker in Breast Cancer Patients, Which Facilitates Epirubicin Resistance and Regulates Hyaluronan Synthesis in MDA-MB-231 Cells. DAIANA L. VITALE, ILARIA CAON, ARIANNA PARNIGONI, INA SEVIC, FIORELLA M. SPINELLI, ANTONELLA ICARDI, ALBERTO PASSI, DAVIDE VIGETTI, LAURA ALANIZ. *Biomolecules* 2021, 11, 246. <https://doi.org/10.3390/biom11020246>.

-Co-treatment of tumor cells with hyaluronan plus doxorubicin affects endothelial cell behavior independently of VEGF expression. VITALE DL, SPINELLI FM, DEL DAGO D, ICARDI A, DEMARCHI G, CAON I, GARCÍA M, BOLONTRADE MF, PASSI A, CRISTINA C, ALANIZ L. *Oncotarget* 2018, 9(93). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26379>.

-Determination of cell-surface hyaluronan through flow cytometry. VITALE, D. L.; SPINELLI, F. M.; ALANIZ, L. *The Extracellular Matrix: Methods and Protocols*. Springer p111 - 116. ISBN 978-1-4939-9133-4.

-Premio Bienal “FUNDACIÓN FLORENCIO FIORINI - Liga Argentina de Lucha contra el Cáncer (L.A.L.C.E.C.)” en Investigación Básica en Cáncer Humano y Experimental – 2019 (distinción).

AGRADECIMIENTOS

Al *Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA)* de la UNNOBA por brindarme el espacio para poder llevar a cabo esta tesis y acompañarme durante este camino. A todo su personal, los que pasaron y los que aún están, por la ayuda diaria brindada.

A *Laura Alaniz*, directora de esta tesis, por haberme abierto las puertas de su laboratorio muchos años atrás, confiando en mí desde que me conoció para iniciar su grupo de trabajo. Por apoyarme incondicionalmente en cada paso dado para cumplir este proyecto y ayudarme a crecer como profesional y persona. Por estar presente en cada momento difícil y decisivo de mi carrera, y por enseñarme la importancia del trabajo en equipo.

A cada uno de mis compañeros de equipo y amigos que la vida me presentó durante este camino, con quienes el trabajo diario en el laboratorio no hubiera sido el mismo:

Fio, con quién compartí mi trabajo desde el inicio, por su enorme alegría contagiosa y todos los momentos compartidos juntas.

Mica, Anto, Ina, Ale y Pao por brindarme su amistad, por ayudarme diariamente, por aprender y divertirnos juntos, y por el aguante durante el último camino recorrido en esta tesis, poniendo su oído cada vez que los necesité.

A mis *compañeros de otros laboratorios del CIBA*, por estar siempre dispuestos a ayudarme y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A toda *mi familia*, especialmente *abuelos, tíos y primos* por estar presentes en cada momento. Por preguntarme ¿cómo venís con la tesis?, y escuchar mi respuesta con amor aún sin entender demasiado. Por acortar kilómetros y abrazarme a la distancia cuando más lo necesite.

A mi amor, *Gaspar*, por su amor y apoyo diario e incondicional, por escucharme y bancarme en este camino y aliviarme en cada decisión o momento difícil. Por ayudarme a cumplir mis metas celebrándolas juntos. A toda su familia por recibirme con mucho cariño y apoyarme en todos estos años.

A mis papás, *Fabián y Graciela*, compañeros de vida incondicionales que guían mi camino para caminar con confianza y firmeza. Por enseñarme a crecer, a confiar en mí para afrontar miedos y aceptar también derrotas y tristezas. Sin ustedes no sería quien soy.

A mi estrella en el cielo.

RESUMEN

El desarrollo de resistencia a drogas durante la quimioterapia es una de las principales causas de recurrencia y mortalidad en cáncer. Las células tumorales modifican su microambiente (MAT) favoreciendo su crecimiento y diseminación, donde la matriz extracelular (MEC) induce señales intra e intercelulares anormales que modulan el comportamiento tumoral. El ácido hialurónico (AH) es el principal glicosaminoglicano que conforma dicha matriz. Su síntesis se incrementa durante el desarrollo tumoral y predominan las formas de bajo peso molecular (BPM), alterando mecanismos como la angiogénesis y la resistencia a drogas. El objetivo del trabajo fue analizar el rol del AH como modulador de la respuesta a drogas usadas en esquemas de quimioterapia. Específicamente, se buscó modificar el entorno tumoral con la adición de AH de BPM, o por alteración de su síntesis endógena durante el tratamiento con doxorubicina (DOX) y epirubicina (EPI) en distintos modelos tumorales.

Un MAT con alta proporción de AH de BPM activó señales de sobrevida y progresión tumoral que afectaron la eficacia del tratamiento con DOX en modelos de linfoma T y adenocarcinoma mamario. Se observó también un efecto adicional sobre la angiogénesis y la remodelación de la MEC de cada tumor. El tratamiento con AH de BPM y DOX sobre las células tumorales activó señales pro-angiogénicas que aumentaron la migración de células endoteliales y la formación de vasos in vitro e in vivo. Este efecto fue independiente de la modulación de la secreción del VEGF, pero podría guardar relación con un aumento en la expresión de FGF-2 y de vías de señalización relacionadas. Por otro lado, la combinación de AH de BPM y DOX aumentó la secreción de AH endógeno en el modelo de linfoma T, resultado que no se observó en las células de adenocarcinoma mamario. Estos resultados indicarían que el rol modulador del AH sobre el tratamiento antitumoral sería diferencial considerando el origen y el entorno en el cual se desarrolla cada tipo de neoplasia.

Por otro lado, estudiamos el rol de la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (UGDH) sintetiza el ácido-UDP-glucurónico, precursor necesario para la síntesis del AH y reacciones de inactivación de drogas como la EPI. Al silenciar la expresión de UGDH durante el tratamiento con EPI, las células de adenocarcinoma mamario acumularon más EPI en su interior, sin embargo, los niveles de apoptosis no se modificaron. Estos resultados estuvieron en concordancia con un aumento en la migración, angiogénesis y autofagia, mecanismos relacionados con fenotipos tumorales agresivos y la resistencia a drogas. Además, en tales condiciones, las células tumorales mostraron un aumento en su matriz pericelular principalmente compuesta por AH, asociado a con un desbalance entre la expresión de las enzimas que sintetizan y degradan el AH. Este trabajo presenta clara evidencia que un estroma tumoral adverso dado por la alteración de los niveles de AH, no solo afecta a las propias células tumorales, sino que puede modular el comportamiento de las células endoteliales asociadas y alterar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos. Por lo tanto, modular la acumulación de AH en la MEC tumoral, utilizando fármacos que alteren su metabolismo, resultaría clave para evadir los mecanismos de “resistencia estromal” que a su vez promueven el desarrollo de resistencia a drogas y, así incrementar la eficacia de los tratamientos antitumorales.

ABREVIATURAS

4-MU: 4-metilumbeliferona
AH de APM: ácido hialurónico de alto peso molecular
AH de BPM: ácido hialurónico de bajo peso molecular
AH: ácido hialurónico
CEs: células endoteliales
CET: células endoteliales tumorales
CsA: ciclosporina A
CSC: células madre tumorales
DOX: doxorubicina
EGFR: receptor de factores de crecimiento epidérmico
EPI: epirubicina
FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos 2
GAGs: glicosaminoglicanos
HABP: proteína de unión a ácido hialurónico
HAS: ácido hialurónico sintasa
HIF1a: factor inducible por hipoxia 1a
HYAL: hialuronidasa
IL: interleuquina
LDH: lactato deshidrogenasa
MFI: intensidad media de fluorescencia
MAT: microambiente tumoral
MEC: matriz extracelular
oAH: oligómeros de ácido hialurónico
PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa
RE: receptor de estrógeno
ROS: especies reactivas del oxígeno
RP: receptor de progesterona
SFB: suero fetal bovino
UDP: uridina difosfato
UDP-GlcNAc: UDP-N-acetil-D-glucosamina
UDP-GlcUA: ácido-UDP-glucurónico
UGT2B7: UDP-glucuronosiltransferasa 2B7
VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	2
1. CÁNCER	2
1.1. Definición y epidemiología.....	2
1.2. Tratamientos antineoplásicos: ANTRACICLINAS.....	3
1.2.1. Mecanismos de acción.....	4
1.2.2. Doxorubicina	5
1.2.3. Epirubicina.....	5
2. MICROAMBIENTE TUMORAL	6
2.1. Componentes celulares del microambiente tumoral	8
2.1.1. Células endoteliales	8
2.2. Matriz extracelular tumoral.....	10
2.2.1. Ácido hialurónico	11
2.2.1.1. Metabolismo del ácido hialurónico.....	13
2.2.1.2. Receptores de ácido hialurónico.....	18
2.2.1.3. Modulación de señales en el microambiente tumoral a través del AH y CD44	19
2.2.1.4. Efecto del AH sobre la angiogénesis tumoral, la resistencia a drogas y el metabolismo de las células tumorales	22
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
1. HIPÓTESIS	31
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo general.....	31
2.2. Objetivos específicos	32
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. REACTIVOS GENERALES	34
1.1. Ácido hialurónico.....	34
1.2. Antraciclinas.....	34
1.3. Anticuerpos y reactivos.....	34
1.4. Líneas celulares	35
2. CÁLCULO DE IC ₅₀	35
3. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA CUMPLIR EL PRIMER Y SEGUNDO OBJETIVO PROPUESTOS	36

3.1. Análisis de expresión de CD44 y capacidad de unión a AH	36
3.2. Tratamientos con AH de BPM y DOX	36
3.3. Ensayo de detección de acumulación intracelular de antraciclinas	37
3.4. Ensayo de detección de apoptosis con Anexina-V	38
3.5. Ensayo de formación de tumorosferas	38
3.6. Extracción de proteínas y Western Blot	38
3.7. Ensayo de cierre de herida sobre células endoteliales	39
3.8. Ensayo de formación de tubos de células endoteliales.....	40
3.9. ELISA	41
3.10. Ensayo de exclusión de partículas	41
3.11. Ensayo tipo ELISA para la detección de AH soluble	41
3.12. Experimentos <i>in vivo</i>	42
3.12.1. Tinción con hematoxilina y eosina	44
3.12.2. Tinción con GSL-I para detección de células endoteliales.....	44
3.12.3. RT-qPCR.....	44
3.13. Análisis estadístico	45
4. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA CUMPLIR EL TERCER OBJETIVO PROPUESTO	45
4.1. Análisis bibliográfico y bioinformático: expresión de UGDH en TCGA y análisis de sobrevida	45
4.2. Silenciamiento del ARNm de UGDH y tratamiento con EPI	46
4.3. Ensayo de viabilidad	47
4.4. Ensayo de citotoxicidad	47
4.5. Ensayo de detección de acumulación intracelular de antraciclinas	48
4.6. Ensayo de detección de apoptosis con Anexina-V	48
4.7. Procesamiento de conjuntos de datos provenientes de microarrays	48
4.8. RT-qPCR a partir de muestras celulares.....	49
4.9. Extractos de Proteínas y Western Blot.....	49
4.10. Ensayo de migración celular por cierre de herida	50
4.11. ELISA	50
4.12. Ensayo de exclusión de partículas	50
4.13. Ensayo tipo ELISA para la detección de AH soluble	51
4.14. Microscopía confocal para la localización subcelular de LC3.....	51
4.15. Obtención de muestras de pacientes oncológicos.....	51
4.15.1. Extracción de ARN de tejidos y RT-qPCR.....	52
4.16. Análisis <i>in silico</i> de interacción de proteínas.....	52
4.17. Análisis estadístico	53
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	56

SECCIÓN 1: EFECTO DEL AH de BPM SOBRE LA RESPUESTA A DOX Y LA RESISTENCIA A DROGAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	56
1.1. <i>Efecto del AH exógeno de BPM en líneas celulares tumorales de diferente etiología sobre la respuesta a DOX</i>	56
1.1.1. Análisis de expresión de CD44 y capacidad de unión a AH	56
1.1.2. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la acumulación de DOX, la expresión de transportadores ABC y la muerte celular.....	58
1.1.3. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la modulación de la proliferación celular y vías de señalización moduladas por AH.....	63
1.1.4. Modulación del comportamiento de células endoteliales en respuesta al tratamiento con AH de BPM y DOX.....	66
1.1.5. Efecto del tratamiento con <i>AH de BPM y DOX sobre la expresión de factores angiogénicos</i>	71
1.1.6. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la MEC tumoral endógena	73
1.2. <i>Efecto del tratamiento combinado de AH de BPM y DOX en modelos tumorales in vivo</i>	75
1.2.1. Efecto del tratamiento combinado con AH de BPM y DOX sobre la angiogénesis tumoral ..	75
1.2.2. Efecto del tratamiento combinado con AH de BPM y DOX sobre la modulación de diferentes vías de señalización implicadas en la progresión tumoral	78
SECCIÓN 2: EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE LA SÍNTESIS DE AH ENDÓGENO SOBRE LA RESPUESTA A EPIRRUBICINA	80
2.1. Expresión de UGDH y genes asociados con el metabolismo de AH, la angiogénesis y la expulsión de drogas en pacientes con cáncer de mama	81
2.2. Análisis de la expresión de UGDH y la sobrevivencia celular después del silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.....	84
2.3. Efecto del silenciamiento de la enzima UGDH sobre la acumulación intracelular de EPI	87
2.4. Modulación de la expresión de genes transportadores de eflujo de drogas ABC y su inactivación después del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI.....	89
2.5. Efectos del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI sobre la angiogénesis tumoral, la proliferación celular y la migración	90
2.6. El efecto del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI en la autofagia.....	92
2.8. Modulación del metabolismo de AH: un equilibrio entre HASs y HYALs.....	96
2.9. Análisis de enriquecimiento funcional para proteínas relacionadas con UGDH.....	97
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	101
SECCIÓN 1: EFECTO DEL AH DE BPM SOBRE LA RESPUESTA A DOX Y LA RESISTENCIA A DROGAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	101
SECCIÓN 2: EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE LA SÍNTESIS DE AH ENDÓGENO SOBRE LA RESPUESTA A EPIRRUBICINA	114
CONCLUSIÓN FINAL	125
BIBLIOGRAFÍA	126
ANEXO	140

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Antraciclinas: estructura y metabolismo	3
Figura 2. Mecanismos de progresión tumoral	7
Figura 3. El microambiente tumoral	8
Figura 4. Estructura del ácido hialurónico	12
Figura 5. El metabolismo del AH y el microambiente tumoral	13
Figura 6. Síntesis del AH	14
Figura 7. Rutas biosintéticas de UDP-GlcA y UDP-GlcNAc	16
Figura 8. Mecanismos de degradación de AH	17
Figura 9. Principales cascadas de señalización mediadas por AH y sus receptores	19
Figura 10. Interacción AH-CD44	20
Figura 11. Angiogénesis tumoral	23
Figura 12. Principales mecanismos de desarrollo de resistencia a multidrogas	25
Figura 13. Autofagia en cáncer	27
Figura 14. Reprogramación metabólica en células tumorales: efecto Warburg	29
Figura 15. Diseño experimental para evaluar <i>in vitro</i> el efecto del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX en líneas celulares tumorales de diferentes etiologías	37
Figura 16. Ensayo de formación de tumorosferas	39
Figura 17. Ensayo de exclusión de partículas	42
Figura 18. Diseño experimental para evaluar <i>in vivo</i> el efecto del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX	43
Figura 19. Esquema metodológico propuesto para evaluar el efecto de la alteración de la síntesis de AH sobre el desarrollo de resistencia a EPI	47
Figura 20. Análisis de la expresión de CD44 y la capacidad de unión a AH en líneas celulares EL4, K12 y MDA-MB-231	57
Figura 21. Cálculo de la concentración de doxorubicina (DOX) inhibitoria del 50% de la sobrevida celular (IC50)	59
Figura 22. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la muerte celular	60
Figura 23. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la muerte celular en un modelo tridimensional de cultivo celular de células MDA-MB-231	62

Figura 24. Efecto del AH de BPM sobre la expresión y funcionalidad de bombas de expulsión dependientes de ATP (ABC) implicadas en la expulsión de DOX	64
Figura 25. Efecto del AH de BPM y el tratamiento con DOX sobre la modulación de la expresión de β -catenina y p-Akt	65
Figura 26. Modulación de la migración de células endoteliales en respuesta al tratamiento con AH de BPM y DOX	68
Figura 27. Ensayo de formación de tubos sobre células endoteliales	70
Figura 28. Análisis de la expresión de factores pro-angiogénicos en respuesta al tratamiento combinado con AH de BPM y DOX	72
Figura 29. Evaluación de las variaciones de la MEC tumoral como consecuencia del tratamiento con AH de BPM y DOX en las células EL4 y MDA-MB-231	74
Figura 30. Angiogénesis en modelo <i>in vivo</i> de linfoma T y adenocarcinoma mamario	77
Figura 31. Modulación de la expresión génica en modelo <i>in vivo</i> de linfoma T y adenocarcinoma mamario	79
Figura 32. Análisis TCGA de la expresión de UGDH en diferentes tipos de cáncer y sobrevida de pacientes.	82
Figura 33. Análisis de la expresión de UGDH en pacientes con cáncer de mama.	83
Figura 34. Cálculo de la concentración de epirrubicina (EPI) inhibitoria del 50% de la sobrevida celular (IC50)	84
Figura 35. Análisis de las células tumorales MDA-MB-231 tras silenciamiento del gen UGDH y el tratamiento con EPI	86
Figura 36. Evaluación de la respuesta tumoral a EPI en células MDA-MB-231 bajo el silenciamiento de UGDH	88
Figura 37. Evaluación de la respuesta angiogénica, proliferación y migración celular tras el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI	91
Figura 38. Análisis de la autofagia como mecanismo implicado en la resistencia a EPI	94
Figura 39. Evaluación de alteraciones en la MEC como consecuencia del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI	96
Figura 40. La compleja red de genes involucrados en la resistencia a drogas, el metabolismo del AH y la angiogénesis	98
Figura 41. Resumen de los resultados obtenidos bajo el tratamiento tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con AH de BPM y DOX	113
Figura 42. Resumen de los resultados obtenidos bajo el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI en contexto de adenocarcinoma mamario.	124
Tabla I. Efectos farmacológicos de las antraciclinas	5
Tabla II. Secuencias de cebadores y sondas empleadas para la detección de ARNm por RT-qPCR	54

Figura anexo I. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la apoptosis en diferentes subpoblaciones de un modelo tridimensional de cultivo.	140
Figura anexo II. Modulación de la migración de células endoteliales. Efecto directo observado sobre controles residuales de AH de BPM y DOX.	141
Figura anexo III. Ensayo tipo ELISA para determinar la concentración de AH en sobrenadantes. Análisis de controles residuales con ambas dosis de AH de BPM.	142



INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

1.1. Definición y epidemiología

El cáncer es una enfermedad que se origina como consecuencia del crecimiento celular anormal y descontrolado, el cual puede originarse en numerosas partes del cuerpo humano. El tumor en formación es capaz de invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del organismo. El advenimiento de la genómica del cáncer ha permitido la validación de perfiles moleculares que han llevado a la reclasificación de la enfermedad, permitiendo dilucidar mecanismos de progresión o resistencia al tratamiento, la heterogeneidad entre tumores primarios y metastásicos y los cambios moleculares asociados, lo que ha conducido al desarrollo de terapias dirigidas exitosas. Sin embargo, a pesar de los notables avances, existe una brecha entre los resultados preclínicos y la obtención de terapias efectivas debido, principalmente, al desarrollo de mecanismos de resistencia a los tratamientos con fármacos.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de muerte poblacional a nivel mundial. Para 2040 se estima un 40% de aumento de muerte por cáncer a nivel mundial respecto del 2020 (sin tener en cuenta el impacto de la pandemia por COVID-19), y de ese porcentaje, el 64% se dará en países de medios ingresos y el 95% en países de bajos ingresos. Para estos países se prevé un aumento de incidencia acompañado de un aumento de la mortalidad por la falta de recursos disponibles para tratar la enfermedad. Respecto a la situación del cáncer en los países de Latinoamérica, el cáncer es la segunda causa de muerte poblacional, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en mujeres, y el cáncer de colón unos de los tumores más frecuentes encontrados en adultos de ambos sexos (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es). La situación es más compleja para los cánceres pediátricos/adolescentes, en particular el osteosarcoma, que representa el 3% a 5% de los tumores en este sector de la población. Los datos indican que, a igual incidencia en comparación con Europa, la tasa de supervivencia a 5 años para la República Argentina es de casi la mitad (https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1), lo cual hace pensar que es urgente buscar alternativas terapéuticas para esta población tan vulnerable en nuestra región.

Por esta razón, el estudio de marcadores o factores biológicos que favorezcan la progresión de la enfermedad y las posibles fallas al tratamiento es de suma importancia en el desarrollo de terapias antitumorales eficaces. Varias de las nuevas terapias están dirigidas a bloquear el crecimiento tumoral mediante la modulación de su entorno o microambiente formado por distintos tipos celulares, factores solubles y moléculas como se describe en la siguiente sección.

1.2. Tratamientos antineoplásicos: ANTRACICLINAS

Las antraciclinas se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos más efectivos utilizados para distintos tipos de cáncer. Estos fármacos conforman una familia de moléculas con capacidad citotóxica extraídas de *Streptomyces spp.*, entre las cuales se encuentran: *daunorrubicina*, *doxorrubicina (DOX)*, *epirrubicina (EPI)*, *idarubicina*, entre otras (Figura 1A). Dentro de los principales tipos de cáncer para los que se utilizan las antraciclinas como tratamiento quimioterapéutico se encuentran el cáncer de mama, pulmón, colon, osteosarcoma, cáncer de vejiga, así como también tumores hematológicos como linfomas y leucemias, entre otros ¹.

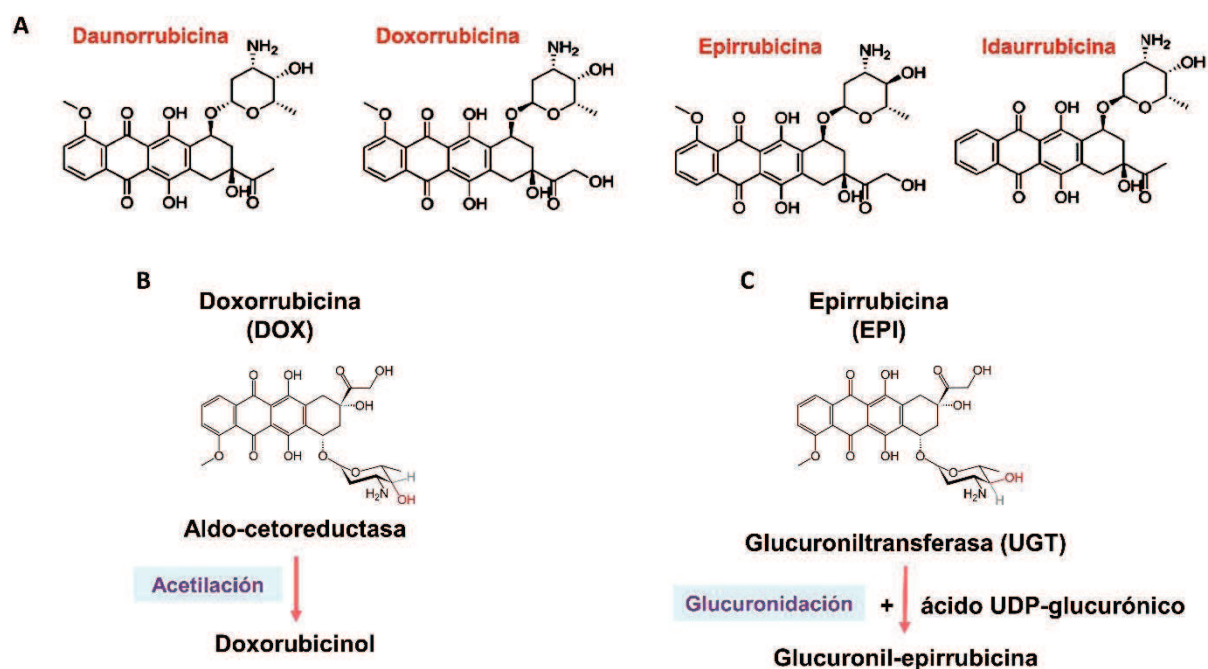


Figura 1. Antraciclinas: estructura y metabolismo. (A) Las antraciclinas son fármacos citotóxicos extraídos de *Streptomyces spp.*, dentro de los cuales se encuentran la daunorrubicina, doxorrubicina (DOX), epirrubicina (EPI) e idarubicina. Los distintos fármacos presentan diferencias en su estructura química, lo que modifica su efectividad y toxicidad. Particularmente, la EPI es un derivado de la DOX obtenido por epimerización axial a ecuatorial del grupo hidroxilo en el resto daunosamina. (B) Debido a esa diferencia estructural, la DOX y la EPI presentan mecanismos de metabolización independientes. La DOX es principalmente metabolizada por aldocetoreductasas, para obtener doxorubicinol. La EPI es conjugada a una molécula de UDP-GlcUA por acción de la glucuroniltransferasa 2B7. Figura modificada de Tripaydonis et al., *Pediatric Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Mechanisms, Pharmacogenomics, and Pluripotent Stem-Cell Modeling, Clinical pharmacology and therapeutics*, 2019.

Químicamente, todas las antraciclinas constan de una estructura de aglicona tetracíclica de cuatro cadenas de ciclohexano junto con un amino-azúcar (daunosamina) (*Figura 1A*). Las primeras antraciclinas identificadas fueron la daunorrubicina y la DOX, las cuales se aislaron a principios de la década de 1960 y siguen siendo de uso clínico generalizado en la actualidad. Sin embargo, debido a su alta toxicidad, los investigadores desarrollaron posteriormente los distintos análogos a estos fármacos, como la EPI, a fin de mejorar la actividad antitumoral y reducir su toxicidad ². Generalmente, la principal vía de administración de estos fármacos es a través de inyección o por infusión intravenosa. Si bien las antraciclinas se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos más utilizados para el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas, su potencial terapéutico está limitado por su extenso perfil de eventos adversos que generan alta toxicidad en tejidos sanos como el tejido cardíaco, y por el desarrollo de resistencia del tumor ^{3,4}.

1.2.1. Mecanismos de acción

La efectividad que presentan las antraciclinas para tratar distintos tipos de tumores se debe a que sus mecanismos de acción abarcan diversos procesos celulares que incluyen: el intercalado en el ADN, la formación de radicales libres, la peroxidación de lípidos, los efectos directos sobre la membrana y las interacciones enzimáticas (*Tabla 1*). A continuación, se detallan los principales mecanismos de acción:

- I. *Intercalado en el ADN*: Las antraciclinas tienen un resto cromóforo con características apolares que presenta una función intercalante entre pares de bases nitrogenadas adyacentes del ADN cuando se localiza en el núcleo de la célula. Esto genera en consecuencia la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, lo que tiene como consecuencia el bloqueo del ciclo celular ⁵.
- II. *Interacción e inhibición de la enzima topoisomerasa II*: Las antraciclinas pueden unirse a la topoisomerasa II encargada de resolver los problemas de superenrollamiento del ADN. El complejo formado por la antraciclina, el ADN y la topoisomerasa II impide el ligado de las roturas de doble cadena del ADN. Este hecho promueve la detención del crecimiento celular y la muerte celular programada por apoptosis ⁶.
- III. *Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)*: Las reacciones de óxido-reducción generan ROS, las cuales en exceso generan estrés oxidativo, daño en el ADN y peroxidación de lípidos que desencadenan la apoptosis celular ⁷. Durante el tratamiento con antraciclinas, parte de la droga se dirige a las mitocondrias, donde

interactúa directamente con la cadena de transporte de electrones mitocondrial, hecho que genera la formación de las ROS. Este mecanismo de acción es la principal causa de la toxicidad provocada por las antraciclinas en tejidos sanos ⁸.

Tabla I. Efectos farmacológicos de las antraciclinas

1. Principales mecanismos de acción

- Intercalado de ADN
- Inhibición de la topoisomerasa II
- Generación de radicales libres de oxígeno

2. Mecanismos de acción secundarios

- Inhibición de:
 - topoisomerasa I
 - fosforilación oxidativa mitocondrial
 - ADN y ARN polimerasas
 - enzimas de reparación del ADN
 - ADN helicasas
 - Alteración de la membrana plasmática
-

1.2.2. Doxorrubicina

La DOX es un antibiótico citotóxico derivado de la bacteria *Streptomyces peucetius* ampliamente utilizado como agente quimioterapéutico. Comúnmente, la DOX es utilizada en el tratamiento de tumores sólidos tanto en pacientes adultos como pediátricos, incluyendo el tratamiento de sarcomas de tejidos blandos y huesos, cánceres de mama, ovario, vejiga, pulmón, colon y tiroides. También se usa para tratar distintos tipos de leucemias y linfomas lo que amplía aún más su campo de aplicación. Su principal vía de metabolización es la formación de doxorrubicinol, un alcohol secundario con actividad antineoplásica, el cual se obtiene mediante la reducción de dos electrones de la DOX, reacción catalizada por enzimas aldocetoreductasas dependientes de NADPH (*Figura 1B*)¹. Estas reductasas están presentes en la mayoría de las células humanas, pero particularmente se encuentran en los eritrocitos, el hígado y los riñones. Si bien no está claramente establecido, el doxorrubicinol también podría ser responsable de los efectos cardiotóxicos del fármaco ^{9,10}.

1.2.3. Epirubicina

La EPI, también conocida como 4'-epidoxorrubicina, es una antraciclina derivada de la DOX por epimerización axial a ecuatorial del grupo hidroxilo de la daunosamina (*Figura 1B*).

Si bien se puede utilizar como tratamiento para diversos tipos de tumores, la EPI es uno de los fármacos más empleados contra el cáncer de mama hormona-resistente y como terapia adyuvante para el tratamiento de metástasis ¹¹.

En concordancia con otras antraciclinas, los principales efectos adversos de la EPI son la toxicidad hematológica aguda y la toxicidad cardíaca acumulativa. Sin embargo, estos efectos son menos severos en comparación con dosis equimolares de DOX ². Esto se debe principalmente a un mecanismo de metabolización diferente al de la DOX. La EPI se metaboliza e inactiva ampliamente en el hígado, a través de su glucuronidación catalizada por la UDP-glucuronosiltransferasa 2B7 (UGT2B7), la cual adiciona una molécula de ácido-UDP-glucurónico (UDP-GlcUA) a la EPI para formar glucuronil-epirrubicina ¹². Por otro lado, la EPI se puede metabolizar en una primera reacción a epirrubicinol de forma análoga a lo que sucede con la DOX, para luego ser glucuronidada por la UGT2B7. Estas moléculas glucuronidadas producto del metabolismo de la EPI no presentan actividad citotóxica tan alta como la observada en otros metabolitos de las antraciclinas. Por lo tanto, esta metabolización puede resultar en una mejor tolerancia cardíaca de la EPI, lo que lo hace favorable su utilización sobre otras antraciclinas ².

2. MICROAMBIENTE TUMORAL

En las últimas décadas se han logrado notorios avances en la comprensión de la biología tumoral. Los tumores ya no deben entenderse desde la simplicidad de las características propias de sus células, sino que debe abarcar las interacciones del propio tumor con diferentes células y factores atraídos hacia su entorno para brindar un análisis integral de los mecanismos involucrados en el desarrollo tumoral, tal como fue descrito por Hananan y Weinberg ¹³ (*Figura 2*).

Durante el desarrollo tumoral, las células tumorales pueden modificar el entorno tisular en el cual proliferan, lo que permite la formación de un microambiente tumoral (MAT) favorable a su establecimiento y crecimiento y a su potencial metastásico ¹⁴. El MAT está formado por componentes celulares, que son las células asociadas que rodean al tumor y cumplen un rol activo en su establecimiento y diseminación; y a su vez por componentes denominados acelulares, dentro de los que se incluyen factores de crecimiento, citoquinas y otros componentes de la matriz extracelular (MEC) (*Figura 3*). La activación de señales específicas asociadas al crecimiento tumoral es capaz de inducir la reprogramación de las células circundantes al tumor en desarrollo, como células endoteliales (CEs), fibroblastos,

y células del sistema inmune como macrófagos, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés: Natural Killer), linfocitos T, entre otros. Las células del sistema inmune contribuyen funcionalmente al crecimiento y progresión tumoral principalmente durante el proceso de evasión de la respuesta inmune. Esto ocurre a través de la liberación de factores solubles mediadores de respuestas inmunosupresoras y con características pro-angiogénicas como citoquinas y quemoquinas, enzimas degradantes de la MEC, especies reactivas del oxígeno y otras moléculas bio-activas ¹⁴.

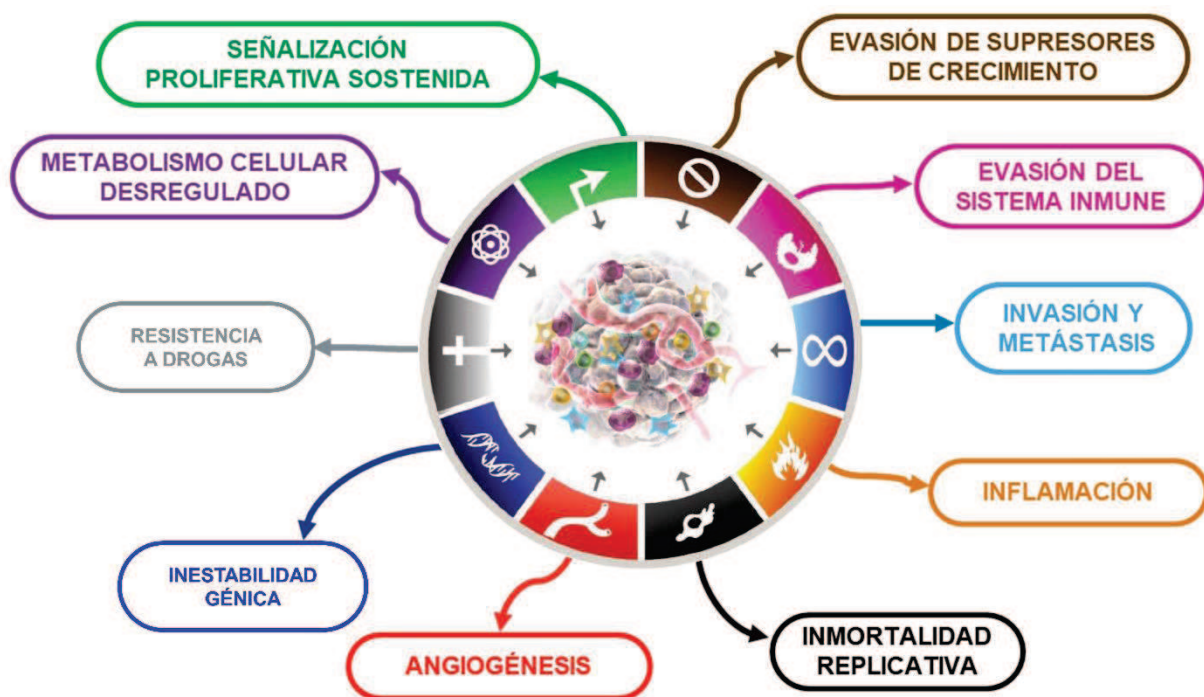


Figura 2. Mecanismos de progresión tumoral. Los “Hallmarks of Cancer” se propusieron como un conjunto de capacidades funcionales adquiridas por las células a medida que pasan a los estados de crecimiento neoplásico. Más específicamente, procesos celulares que son cruciales para su capacidad de formar tumores malignos. Figura modificada de Hananan y Weinberg. *The hallmarks of cancer, Cell, 2011* - Hananan. *Hallmarks of Cancer: New Dimensions, AACR J, 2022*.

Por otro lado, ciertas alteraciones de la MEC promueven señales celulares anormales que pueden desencadenar una proliferación celular desregulada, la reorganización del citoesqueleto, un aumento en la capacidad de migración celular e incluso la modulación del sistema inmune ¹⁵. Dentro de estos componentes acelulares del MAT se encuentran diversos elementos de la MEC los cuales presentan una expresión y organización desregulada en el estroma tumoral ¹⁶.

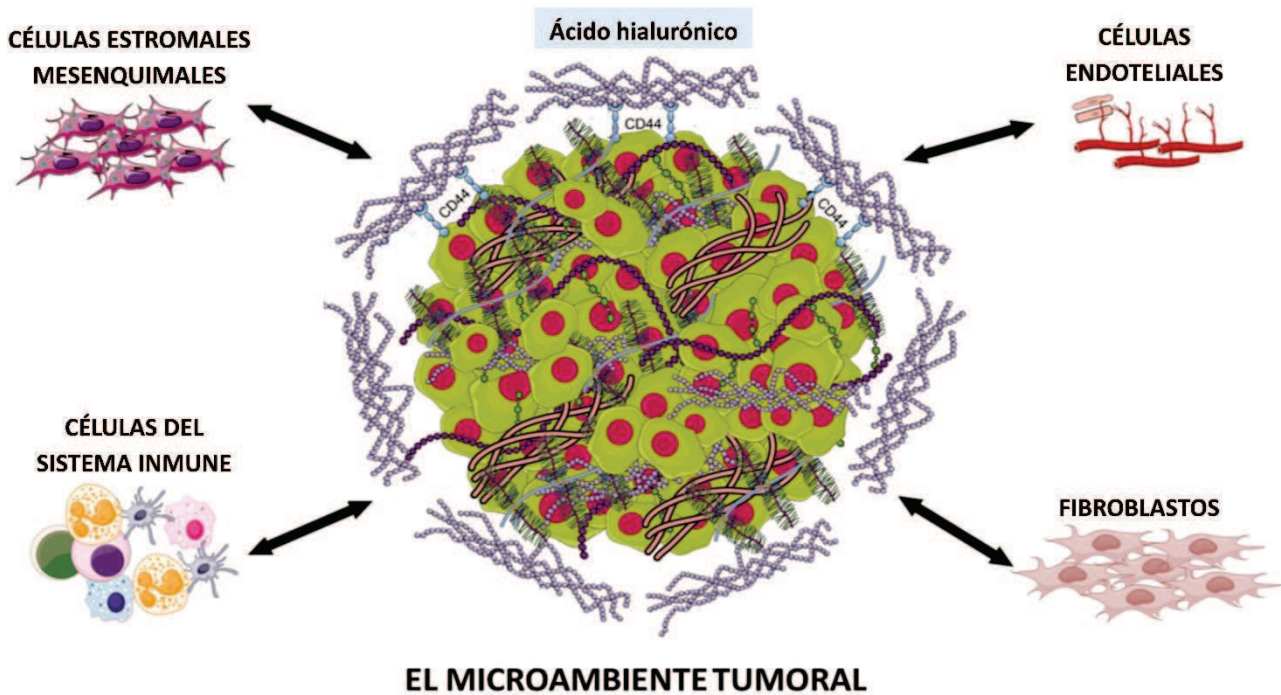


Figura 3. El microambiente tumoral. El microambiente tumoral está compuesto por células no tumorales que rodean al tumor y que en muchos casos contribuyen al crecimiento y mantenimiento del mismo, como células endoteliales, fibroblastos, células estromales mesenquimales y células inmunológicas infiltrantes. Además, contiene componentes acelulares, como es el caso del AH, un componente abundante de la MEC que recluta y activa a las células estromales para contribuir al desarrollo tumoral. Figura adaptada de *Sevic et al., The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma, Hepatocellular Carcinoma, 2019.*

2.1. Componentes celulares del microambiente tumoral

Como se mencionó anteriormente y se muestra en la *Figura 3*, en el MAT se encuentran diferentes células no tumorales que rodean al tumor y que en muchos casos contribuyen al crecimiento y mantenimiento del mismo. En esta sección se describirán a las CE asociadas a tumor, sobre las cuales se estudiará en la presente tesis.

2.1.1. Células endoteliales

El desarrollo de los vasos sanguíneos implica la generación de nuevas CE y su posterior organización en estructuras tubulares (vasculogénesis), además de la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes (angiogénesis) ¹⁷. Los tumores en crecimiento necesitan una gran cantidad de nutrientes y oxígeno así como también necesitan eliminar los restos metabólicos y dióxido de carbono ¹⁷. Para esto, se genera la neo-vasculatura asociada al tumor mediante el proceso de *angiogénesis tumoral*. Sin

embargo, a diferencia del proceso que ocurre en condiciones fisiológicas, la angiogénesis tumoral se encuentra activa continuamente, provocando la formación de nuevos vasos sanguíneos aberrantes que ayudan a mantener el crecimiento del tumor. Se ha demostrado que diversas señales oncogénicas estimulan la sobre-expresión de distintos factores angiogénicos como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), entre otros ^{18,19}. Esto lleva a un desequilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras de la angiogénesis, lo que produce en consecuencia la activación crónica de este proceso. Debido a este hecho, se han estudiado diferencialmente a las poblaciones de CEs asociadas a tumores o células endoteliales tumorales (CET) respecto de las CEs normales, ya que presentan fenotipos anormales y constituyen una población heterogénea dentro del MAT la cual puede favorecer la progresión de la enfermedad más allá de la implicancia en la angiogénesis ²⁰. Particularmente, se ha determinado que las CET no sufren senescencia ni apoptosis a través la activación de vías de supervivencia celular, procesos que si suceden en CEs normales ²¹. Otro hecho interesante resalta la presencia de anomalías cromosomales en las CET de distintos tipos de tumores, las cuales se encuentran relacionadas con el desarrollo de resistencia a la quimioterapia ²⁰ y radioterapia ²² en estas células asociadas. En este sentido, se ha observado el desarrollo de resistencia a vincristina en CET derivadas de carcinoma renal ²¹, y a 5-fluorouracilo y DOX en carcinoma hepatocelular ^{23,24}.

Otro de los mecanismos por los cuales las CET adquieren resistencia a los fármacos empleados es la sobre-expresión de bombas de expulsión de drogas dependientes de ATP situadas en la membrana plasmática, tales como ABCB1, lo cual ha demostrado ser responsable de la resistencia a paclitaxel mediada por VEGF en hepatocarcinoma ²⁴. Las CET también podrían promover activamente la metástasis de las células tumorales, debido a que estas células asociadas al tumor secretan citoquinas y factores como interleuquina 6 (IL6), VEGF y FGF-2 al propio MAT, los cuales contribuyen a las etapas tempranas de la metástasis. En relación con la MEC, las CET presentan un pequeño PG rico en leucina llamado biglicano, el cual facilita la migración de las células tumorales a través de la activación de distintas vías de señalización ²⁵. Estos antecedentes y más reportes contribuyen a la elucidación de la compleja biología de las CET en el MAT, lo cual proporcionaría un nuevo objetivo para la terapia y el diagnóstico contra el cáncer, puntos que se desarrollarán durante la tesis.

2.2. Matriz extracelular tumoral

Además de las células que rodean al tumor, el MAT contiene componentes acelulares que forman lo que conocemos como *MEC tumoral*, característica del tipo de tejido donde se desarrolla el tumor. La MEC es una red compleja de proteínas fibrosas extracelulares (colágeno, elastina), proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) y glicoproteínas que forman agregados supramoleculares por enlaces intermoleculares entre ellos. Además de su composición bioquímica, la MEC también se caracteriza por parámetros biofísicos característicos, tales como la densidad molecular, rigidez/resistencia y tensión, lo que la vuelve muy versátil y capaz de someterse a remodelaciones constantes como las que suceden durante la progresión tumoral ²⁶.

Esta compleja red tridimensional se puede clasificar en dos tipos principales, los cuales varían en sus propiedades físico-químicas y su localización: *matriz intersticial* y *matriz pericelular*. Las matrices intersticiales rodean principalmente a distintas células y tejidos, mientras que las matrices pericelulares están en estrecho contacto con las células ²⁷. La MEC intersticial se encuentra normalmente en los grandes espacios intercelulares del tejido conectivo, y consiste en una red de fibrillas de colágeno, elastina, PGs, GAGs como el AH, minerales y agua en combinación con numerosos factores de crecimiento y citoquinas ^{27,28}. Estos componentes interactúan entre sí creando una red tridimensional dinámica y compleja, donde las células circundantes interactúan con los componentes de la MEC mediante receptores de superficie celular específicos, PGs, entre otros ²⁷. Por otro lado, la matriz pericelular se encuentra en la interfase entre el parénquima y el tejido conectivo, proporcionando el anclaje de las células y delimitando el estroma de otros tejidos ²⁹. Dentro de este tipo de matriz se encuentran las membranas o láminas basales, constituidas por un polímero de laminina que proporciona sitios de adhesión para las células epiteliales y una red de colágeno tipo IV que estabiliza la estructura general de dicha lámina. Ambas redes interactúan con otros componentes de la matriz como GAGs y proteínas de adhesión que funcionan como moléculas enlazadoras que las interconectan, favoreciendo a su densidad y estructura característica ³⁰.

En el MAT, tanto las células tumorales como las células no tumorales asociadas al tumor (como los fibroblastos), contribuyen significativamente a la remodelación de la MEC secretando componentes específicos de la misma y alterando su composición ^{31,32}. Como consecuencia de estas alteraciones bioquímicas, la MEC también sufre transformaciones biofísicas, como en la topografía, la resistencia y la tensión, ya que aumenta la deposición

de colágeno fibrilar y el entrecruzamiento de moléculas, lo cual causa el depósito fibrótico típico de la MEC tumoral y la gran acumulación de GAGs y su alta hidratación aumentan la tensión ^{33,34}. Esta compleja matriz tridimensional es capaz de inducir señales inter e intracelulares anormales, las cuales pueden i) favorecer la proliferación celular desregulada, ii) promover la migración, invasión, proliferación y supervivencia de células endoteliales y otros tipos celulares ³⁵, iii) modular la respuesta inmunológica y angiogénica, iv) afectar la distribución de fármacos al sitio tumoral; entre otras funciones ^{36,37}. Dado que la acción de estas respuestas y el balance entre ellas puede evitar o favorecer la progresión tumoral, surge la hipótesis de la implicancia que tienen ciertos factores de la MEC en modular el desarrollo tumoral, inclusive como esa MEC impactaría en la respuesta del tumor al tratamiento quimioterapéutico. En esta sección se describirá a uno de ellos: el ácido hialurónico, junto con sus proteínas de unión y las respuestas que desencadena en el MAT.

2.2.1. Ácido hialurónico

Entre los componentes más abundantes de la MEC se encuentra la familia de los GAGs, definidos como heteropolisacáridos largos no ramificados, compuestos por disacáridos alternados de ácido urónico y aminoazúcares. Dentro de esta familia de GAGs, se han identificado seis tipos principales: heparán sulfato, heparina, condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y el ácido hialurónico (AH).

El AH es un GAG lineal no sulfatado formado por disacáridos repetidos de ácido-D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) (*Figura 4*). El AH puede existir como un GAG libre o unido de forma no covalente a PGs, y se encuentra en la MEC intersticial y pericelular de la mayoría de los tejidos adultos ³⁸. Este GAG es considerado un componente principal de la matriz pericelular de muchos tipos de células, donde se une a sus propias enzimas sintetasas o a sus receptores celulares para modular varias funciones celulares y quedar retenido en esa porción de MEC. Curiosamente, el AH también se ha detectado intracelularmente, así como en el núcleo de células normales y tumorales ²⁷. Además de contribuir a la organización, hidratación y sostén de los tejidos, el AH actúa como un importante modulador activo del comportamiento celular induciendo diferentes señales intra e intercelulares. Ello se debe a que el AH puede interactuar con diferentes receptores de superficie celular (CD44, RHAMM, TLR4, LYVE-1), con proteínas de unión (HABP, TSG-6) y con otros PGs como versicano y agricano presentes en la MEC (27). Estas interacciones permiten al AH modular distintos procesos

celulares entre los que se incluyen el crecimiento, la adhesión, la migración y diferenciación celular, así como también el cierre de heridas (36).

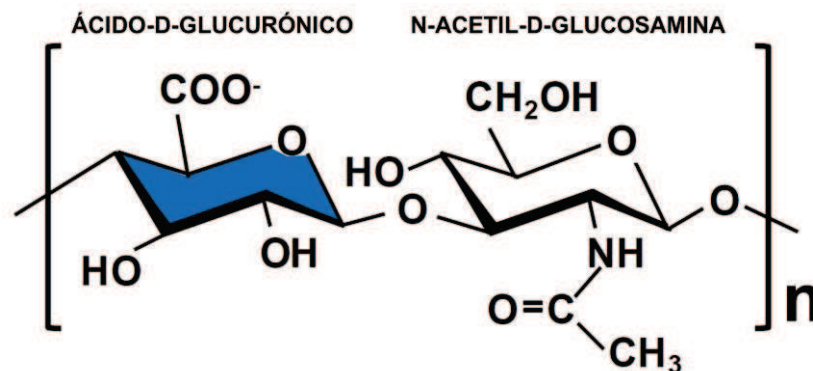


Figura 4. Estructura del ácido hialurónico. El AH es un polisacárido del tipo de glicosaminoglicanos compuesto por repetitivos disacáridos poliméricos de ácido-D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Figura adaptada de Kobayashi et al., *Hyaluronan: Metabolism and Function, Biomolecules*, 2020.

La complejidad que presenta el AH como señal molecular activa de sus distintos receptores y proteínas de unión es atribuible en gran medida a la longitud y la cantidad del polímero disponible en la MEC. Específicamente, las funciones del AH dependen de su peso molecular. En condiciones homeostáticas predominan las formas de AH de alto peso molecular (APM, de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 Da), las cuales ofrecen alta viscoelasticidad a los tejidos y cumplen principalmente funciones hidrodinámicas y estructurales ³⁹. Más aún, en tejidos con altas concentraciones de AH de APM, éste GAG forma una capa pericelular de MEC alrededor de las células que lo producen la cual juega un rol activo en la modulación de señales intra e intercelulares ⁴⁰. No obstante, las interacciones entre el AH de APM y otros componentes de la MEC inducen diversas señales de homeostasis que contribuyen al mantenimiento de la integridad de tejidos, desarrollando a su vez una función inmunomoduladora y angio-moduladora ⁴¹. Por otro lado, durante diversos procesos inflamatorios y patologías como el cáncer, el AH está predominantemente presente en formas de bajo peso molecular (BPM, de 10^4 a $0,5 \times 10^6$ Da), ya que el AH de APM se cliva a fragmentos de menor tamaño, por acción de enzimas de degradación o radicales libres ⁴² (Figura 5). En este sentido, un desbalance en el metabolismo de AH y la interacción con sus receptores se relacionan estrechamente con la gravedad de enfermedades inflamatorias y la agresividad en cáncer ⁴³. Particularmente en cáncer, la biosíntesis y la degradación de AH aumentan significativamente en comparación con los tejidos normales, lo que puede incrementar la formación de una matriz rica en AH y la producción simultánea de AH de

APM y sus fragmentos de menor peso molecular ⁴⁴, lo que genera un MAT único donde coexisten tanto el AH de APM como las formas de BPM.

Por su lado, el AH de APM forma una MEC pericelular favorable para la proliferación y migración de las células tumorales. En contraparte, los fragmentos de distinto peso molecular generados por la degradación del AH promueven el crecimiento de las CEs asociadas al tumor y por lo tanto inducen la angiogénesis ^{45,46}. Además, los fragmentos de AH de BPM poseen una actividad inmunomoduladora significativa, lo que resulta en una disminución de la vigilancia inmunológica del tumor ^{47,48}. Por lo tanto, la remodelación del MAT por la producción excesiva y la producción excesiva y la degradación de AH contribuye a la supervivencia y progresión maligna de las células tumorales.

2.2.1.1. Metabolismo del ácido hialurónico

Se denomina metabolismo del AH al estricto y regulado balance entre su síntesis y degradación. El AH es sintetizado por enzimas llamadas AH sintetas (HASs, del inglés: HA synthases) y es fragmentado en moléculas bio-activas por enzimas hialuronidasas (HYALs, del inglés: hyaluronidasas) o por especies reactivas del oxígeno (ROS) ⁴⁹ (Figura 5).

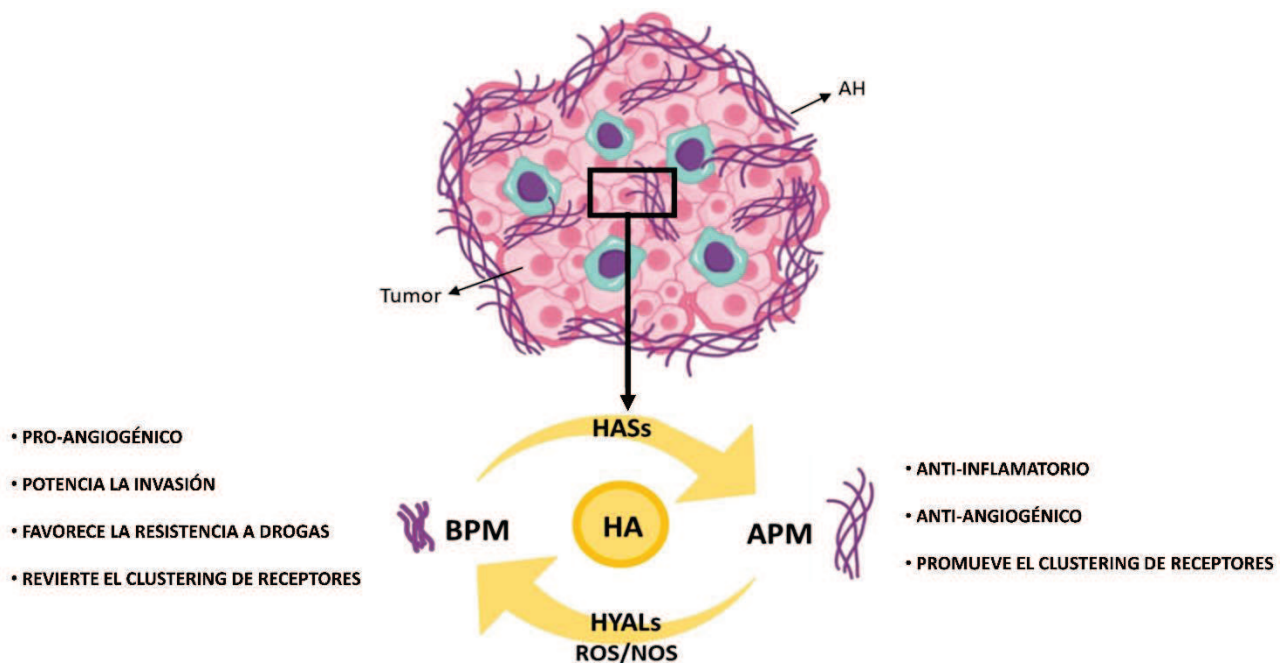


Figura 5. El metabolismo del AH y el microambiente tumoral. En los tejidos tumorales, el metabolismo de AH se encuentra desregulado, así como la interacción con sus proteínas de unión. La biosíntesis de AH es catalizada por la acción de las HASs. La cantidad y tamaño de las cadenas de AH presentes en un contexto tumoral depende de la actividad de degradación de las Hyals. Figura adaptada de *Spinelli et al., Hyaluronan in the Tumor Microenvironment, Capítulo 3, Tumor Microenvironment – Extracellular Matrix Components – Part A, Springer.*

I. Síntesis del ácido hialurónico

La síntesis del AH difiere ampliamente de la síntesis de otros GAGs. A diferencia del resto de los GAGs que se sintetizan a nivel intracelular en el aparato de Golgi⁵⁰, las enzimas HASs encargadas de sintetizar el AH son proteínas situadas en la membrana plasmática de las células⁴⁹. Las mismas tienen la capacidad catalítica para sintetizar cadenas de AH de varios pesos moleculares en la cara interna de la membrana plasmática y luego secretar el AH neosintetizado a la MEC, aunque gran parte de este GAG también puede quedar anclado a la membrana plasmática. En mamíferos, el AH es sintetizado por tres diferentes isoenzimas llamadas HAS 1, 2 y 3³⁹. Se reportó que HAS1 y HAS2 producen AH de mayor peso molecular (200-2000 kDa), mientras que HAS3 es la responsable de producir fragmentos más pequeños de AH (100-1000 kDa)⁵¹ (Figura 6A).

Numerosos trabajos han determinado que la biosíntesis de AH se encuentra finamente regulada en varias etapas mediante la regulación de la expresión de las enzimas HASs. Específicamente, se ha demostrado que la actividad y el recambio de HAS2 están controlados post-traduccionamente por fosforilación, O-GlcNAcación, ubiquitinación y dimerización⁵²⁻⁵⁴. Además, se ha descubierto una regulación a nivel transcripcional de HAS2, dada por la estabilización del ARN mensajero (ARNm) de HAS2 y el ARN antisentido natural HAS2-1 (HAS2-AS1)⁵⁵. A su vez, se ha demostrado que el gen codificante de HAS2 está sujeto a la regulación de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas⁵⁶.

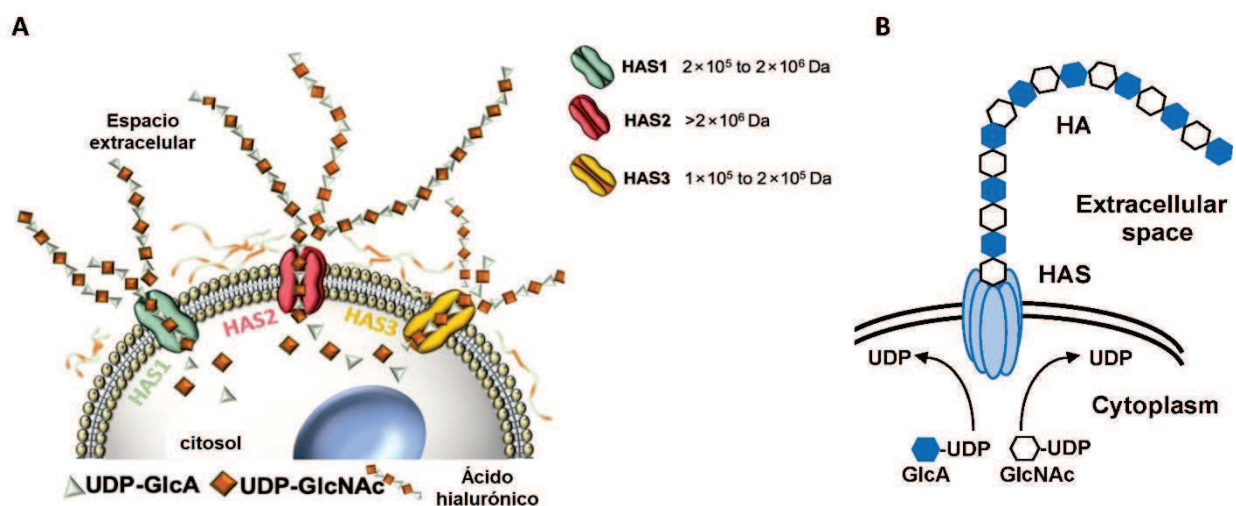


Figura 6. Síntesis del AH. (A) Las moléculas de AH con diferentes pesos moleculares son liberadas desde el citoplasma a la matriz extracelular a través de los poros de las AH sintasas (HAS1-3), que unen el espacio intracelular con el extracelular. Peso molecular típico del AH sintetizado por las tres HASs diferentes. (B) Los sustratos precursores del AH deben estar unidos a una molécula de UDP para poder ser reconocidos por las HASs y sintetizar AH. Figura adaptada de Amorin, et al., *Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials*, Trends in Biotechnology, Cell Press, 2020 - Kobayashi et al., *Hyaluronan: Metabolism and Function*, Biomolecules, 2020.

En cáncer, una desregulación en la expresión de las enzimas HASs resulta en una producción anómala de AH, lo que promueve el desarrollo de procesos biológicos anormales como la transformación celular y la metástasis ⁵⁷. Por otro lado, el silenciamiento de la enzima HAS2 en células de cáncer de mama suprimió su capacidad invasiva, lo cual fue rescatado al sobre-expresar dicha enzima ⁵⁸. Más aún, estudios recientes demostraron una sobre-expresión de las enzimas HASs en cáncer de vejiga, pulmón, ovario y mama, en donde fue relacionado con un fenotipo tumoral maligno ⁵⁹⁻⁶², indicando que HAS2 tendría un rol central en promover la proliferación tumoral, migración e invasión en varios tipos tumorales.

Por otro lado, la síntesis de AH se encuentra estrictamente influenciada por la disponibilidad celular de los precursores que conforman este GAG (N-acetil-D-glucosamina y ácido-UDP-glucurónico), los cuales deben estar conjugados al nucleótido uridina difosfato (UDP) para ser sustratos reconocibles por las HASs (*Figura 6B*). La UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) es un derivado de la fructosa-6-fosfato que se sintetiza a través de la vía de síntesis de hexosaminas y se utiliza además como sustrato donante para la glicosilación de proteínas y la O-GlcNAcilación ³⁹. Por otro lado, el ácido-UDP-glucurónico (UDP-GlcUA) es un metabolito clave en la biosíntesis de GAGs y PGs ⁶³ y se sintetiza a partir de glucosa-6-fosfato (metabolito intermedio de la glucólisis) a través de la síntesis de glucosa-1-fosfato y UDP-glucosa. Específicamente, el UDP-GlcUA es formado por la oxidación de una molécula de UDP-glucosa a través de la acción catalítica de la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (UGDH) ⁶⁴. Además de ser precursor de la síntesis de diferentes GAGs, el UDP-GlcUA puede intervenir en diversas reacciones de detoxificación de fármacos mediante la glucuronidación de las mismas, y representa un mecanismo protector para la eliminación de xenobióticos lipídicos del organismo ⁶⁵, entre ellos drogas quimioterapéuticas como ciertas antraciclinas ⁶⁶ y análogos de andrógenos ⁶⁷ (*Figura 7*).

Tal como se mencionó previamente, la regulación de la expresión y actividad de las HASs puede influir en la formación de una MEC celular rica en AH durante el desarrollo tumoral. No obstante, numerosos antecedentes mostraron que este hecho también se relaciona con la disponibilidad de UDP-azúcares en la célula y con el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, el inhibidor de la síntesis de AH llamado 4-metilumbeliferona (4-MU) inhibe la síntesis de AH al agotar la disponibilidad de UDP-GlcUA citoplasmático ⁶⁸. De manera similar, el agotamiento de UDP-GlcNAc celular por el tratamiento con manosa (en vez de glucosa) redujo la síntesis de AH en queratinocitos epidérmicos ⁵⁶.

También se ha determinado el rol activo de la enzima UGDH en cáncer ^{69,70}, debido a su rol como enzima productora de uno de los precursores de AH (UDP-GlcUA), mostrando una estrecha relación entre alteraciones en su expresión, la progresión de la enfermedad y supervivencia. En cáncer de próstata se ha propuesto a la enzima UGDH como un nuevo biomarcador candidato para complementar la detección de la transformación tumoral dentro del tejido tumoral adyacente ⁷¹. Aspectos similares se han observado en cáncer de pulmón, determinando que la expresión y localización de la enzima UGDH son un marcador de diagnóstico serológico temprano además de un indicador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón ⁷². Más aún, se ha determinado que la inhibición de la expresión de esta enzima en un modelo de carcinoma colorrectal retrasa la agregación celular ⁶⁹, lo que propone firmemente a la UGDH como un objetivo potencial de estudio para distintos tipos de cáncer.

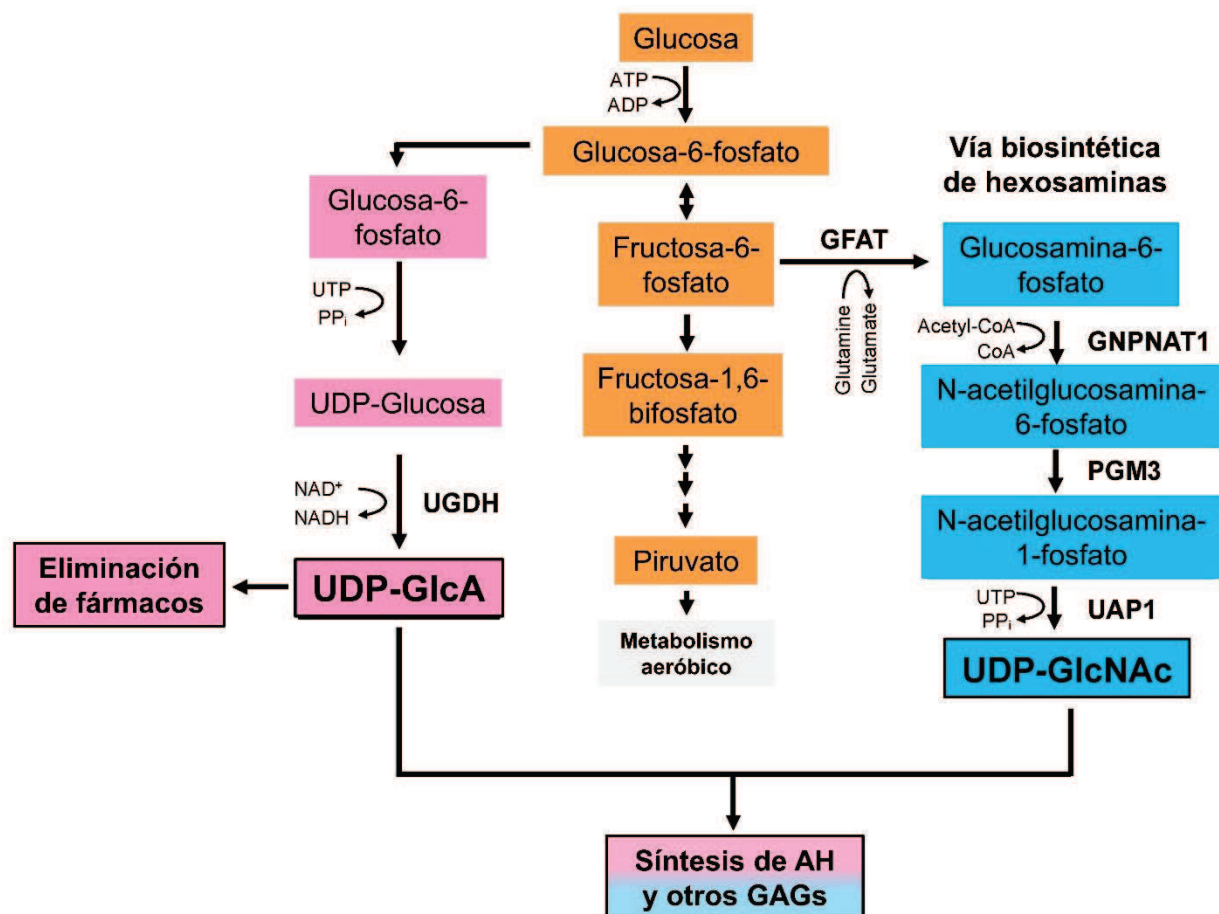


Figura 7. Rutas biosintéticas de UDP-GlcA y UDP-GlcNAc. El UDP-GlcA se sintetiza a partir de glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato se convierte en glucosa-1-fosfato y UDP-glucosa. Finalmente, UDP-GlcA se sintetiza a partir de UDP-glucosa por acción de la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (UGDH). Este UDP-azúcar es precursor de la síntesis de GAGs como el AH y también participa en la detoxificación celular de fármacos liposolubles, como drogas antineoplásicas. Por otro lado, el otro precursor del AH, la UDP-GlcNAc se sintetiza a través de la vía biosintética de hexosaminas. Se puede observar la estrecha relación entre las vías de obtención de energía celular y la síntesis de AH. Figura adaptada de Kobayashi et al., *Hyaluronan: Metabolism and Function, Biomolecules*, 2020.

II. Degradación del ácido hialurónico

El AH es normalmente degradado por endoglicosidasas específicas llamadas HYALs o bien, puede ser degradado de forma inespecífica en respuesta al estrés oxidativo generado por ROS. Las HYALs catalizan la hidrólisis del AH promoviendo la ruptura del enlace $\beta(1\rightarrow4)$. En humanos existen seis miembros pertenecientes a la familia de HYALs, siendo las isoformas HYAL1, HYAL2 y HYAL3 las que mayor actividad enzimática presentan, clivando un tercio del total de AH por día ⁷³. La actividad de estas enzimas genera las especies de BPM de AH, o incluso fragmentos muy cortos de AH denominados oligómeros de AH (oAH), que pueden conducir, entre varias funciones, hacia un perfil inmunológico pro-inflamatorio y pro-angiogénico ^{74,75}. Específicamente, el AH de APM es escindido por acción de las HYALs presentes en la membrana plasmática (HYAL2 y HYAL3) para obtener formas de AH de BPM. Este luego puede internalizarse hacia los lisosomas donde se completará su clivaje por la HYAL1 para formar oAH que pueden redirigirse a la MEC nuevamente por exocitosis ³⁹ (Figura 8). La degradación del AH mediada por las HYALs es la principal fuente de AH de BPM en los tumores; y la acumulación de AH de BPM produce la remodelación del MAT, lo que se asocia estrechamente con la agresividad del tumor ⁷⁶⁻⁷⁸. En varios tipos de tumores se reportó una sobre-expresión de HYALs y en muchos de

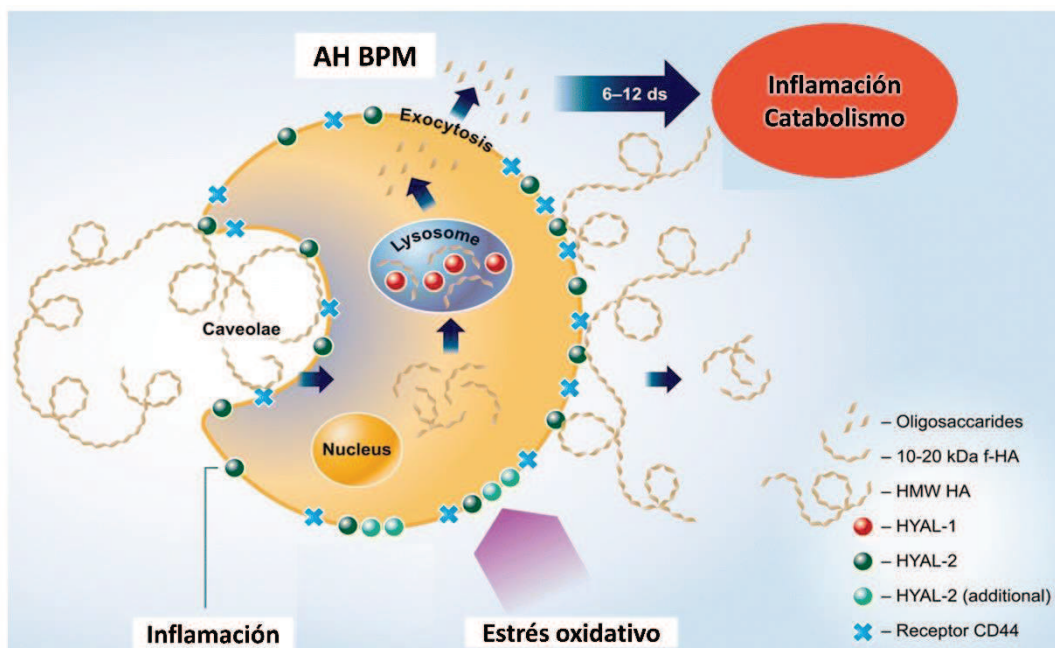


Figura 8. Mecanismos de degradación de AH. El AH es escindido por HYALs específicas. La HYAL-2 se encuentra en la membrana plasmática y genera AH de BPM. Este se internaliza hacia los lisosomas y se escinde en oligosacáridos por acción de la HYAL-1 lisosomal, para finalmente exponerse nuevamente en el espacio extracelular por exocitosis. En cáncer se ha demostrado que los oAH exhiben actividad biológica diferencial a otras especies de AH, son reconocido diferencialmente por los receptores de AH y pueden generar en consecuencia un entorno pro-inflamatorio y pro-angiogénico. Figura adaptada de Krupkova *et al.* *Expression and activity of hyaluronidases HYAL-1, HYAL-2 and HYAL-3 in the human intervertebral disc*, *European Spine Journal*, 2020.

ellos se han propuesto como un biomarcador ^{79,80}. Por ejemplo, se ha determinado que la expresión de HYAL1 y HYAL2 se encuentra elevada en melanoma ⁸¹, cáncer de vejiga ⁸², cáncer de próstata ⁸³ y en carcinoma no microcítico de pulmón ⁸⁴. En el caso de cáncer de mama, estudios previos reportaron que la hipoxia en el tumor y en su microambiente tiene un efecto positivo en la actividad de las enzimas HYALs, lo que resulta en la producción de fragmentos de AH de BPM que promueven la angiogénesis ⁸⁵. Más aún, se observaron altos niveles de actividad de estas enzimas en metástasis cerebrales humanas ⁸⁶ y cáncer de mama metastásico ⁸⁷, lo que propone a las HYALs como indicadores prometedores de la progresión tumoral.

2.2.1.2. Receptores de ácido hialurónico

Como se mencionó anteriormente, el AH interacciona con distintos receptores de la membrana plasmática. El principal receptor que media las señalizaciones inducidas por el AH es CD44. CD44 es una proteína de adhesión que se expresa en varios tipos celulares, incluyendo leucocitos, fibroblastos, CEs, células epiteliales, macrófagos, entre otros. Si bien CD44 es el principal receptor de AH, éste también es capaz de unirse a otros componentes de la MEC como colágeno, fibronectina, condroitin sulfato, entre otros ⁸⁸. CD44 media señales intracelulares cumpliendo un rol fisiológico en procesos de adhesión, proliferación y migración celular. Sin embargo, la unión del AH con CD44 también puede favorecer procesos asociados a condiciones no fisiológicas, como las observadas durante el desarrollo tumoral ⁴¹ (*Figura 9*). CD44 es capaz de reconocer selectivamente cadenas de AH de diferentes longitudes e iniciar respuestas de señalización al unirse a fragmentos de AH de un rango de tamaño específico ⁸⁹. La expresión elevada de CD44 ha sido demostrada en distintos tipos de cáncer, y es considerado un marcador clave de células madre tumorales de distintos tipos de tumores ^{90,91}.

Otra molécula que actúa como receptor del AH es RHAMM (por sus siglas en inglés: *Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility*). En la membrana plasmática, RHAMM funciona como una proteína de unión al AH que se une y activa a CD44 desencadenando una vía de señalización relacionada a la proliferación celular. RHAMM ha sido asociado con muchas funciones que incluyen la regulación y movilidad de CEs y macrófagos, entre otras. De esta forma, muchos reportes son consistentes con el rol de RHAMM e el proceso inflamatorio y la migración de CEs, contribuyendo a la cicatrización de heridas y a la angiogénesis *in vivo* ⁹².

Se ha demostrado también que el AH tiene capacidad de unirse a otras moléculas y receptores, como lo son LYVE-1 y los receptores tipo toll, TLR2 y TLR4. LYVE-1 es una proteína estructuralmente similar a CD44 presente en células endoteliales linfáticas, el cual es necesario para respuestas de células T específicas de antígeno ⁹³. Se ha determinado que la interacciones AH-LYVE-1 pueden influir en la inflamación y la administración de fármacos ⁹⁴. Además, el AH de BPM es capaz de unirse a receptores involucrados en la respuesta inmune tales como TLR2 y TLR4 ⁹⁵, lo cual puede inducir diversas señales intracelulares que estimulan la expresión de genes diana y la producción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias (Figura 9) ⁹⁶.

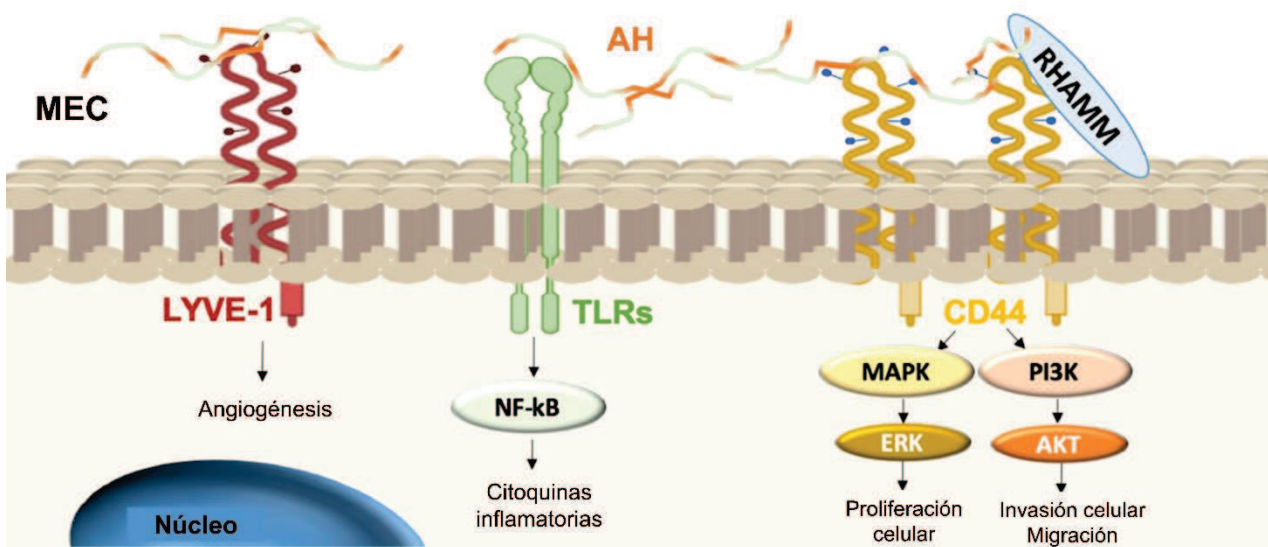


Figura 9. Principales cascadas de señalización mediadas por AH y sus receptores. La unión de HA a sus distintos receptores de membrana plasmática desencadena una variedad de eventos de señalización que generan la activación de efectores intracelulares como Akt, PI3K, ERK1/2 y NF-κB. Estos eventos de señalización impulsan finalmente la proliferación, la invasión y la angiogénesis. Figura adaptada de Amorim *et al.*, *Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials*, Trends in Biotechnology, 2021.

2.2.1.3. Modulación de señales en el microambiente tumoral a través del AH y CD44

Tal como se mencionó anteriormente, una producción anómala de AH promueve diversos procesos biológicos patológicos como los observados durante el desarrollo tumoral. A través de la interacción con sus receptores, el AH favorece la proliferación ⁴⁶, angiogénesis ⁹⁷, resistencia a la apoptosis y a multidrogas ^{98,99}, la modulación del sistema inmune ¹⁰⁰, la invasión y la metástasis ¹⁰¹. Más aún, la concentración de AH en tumores malignos es más alta que en tumores benignos y que en tejidos normales, e incluso en ciertos tumores los niveles de AH se utilizan como posibles indicadores de diagnóstico y malignidad ¹⁰²⁻¹⁰⁶. Por otro lado, se ha estudiado ampliamente el rol de las formas de APM

y BPM de AH en contexto tumoral, determinando que ambas pueden coexistir en el MAT y unirse a los receptores de AH eficientemente.

Todos los procesos en los cuales el AH presenta un rol clave dependen de la interacción de este GAG con sus receptores de membrana, principalmente CD44, el cual puede transmitir la señal generada hacia el interior celular y desencadenar una respuesta en la propia célula tumoral o en las células asociadas que forman parte de su microambiente. A continuación, se detallarán las vías de señalización más importantes activadas por la señalización AH-CD44, parte de las cuales se estudiarán en la presente tesis (*Figura 10*):

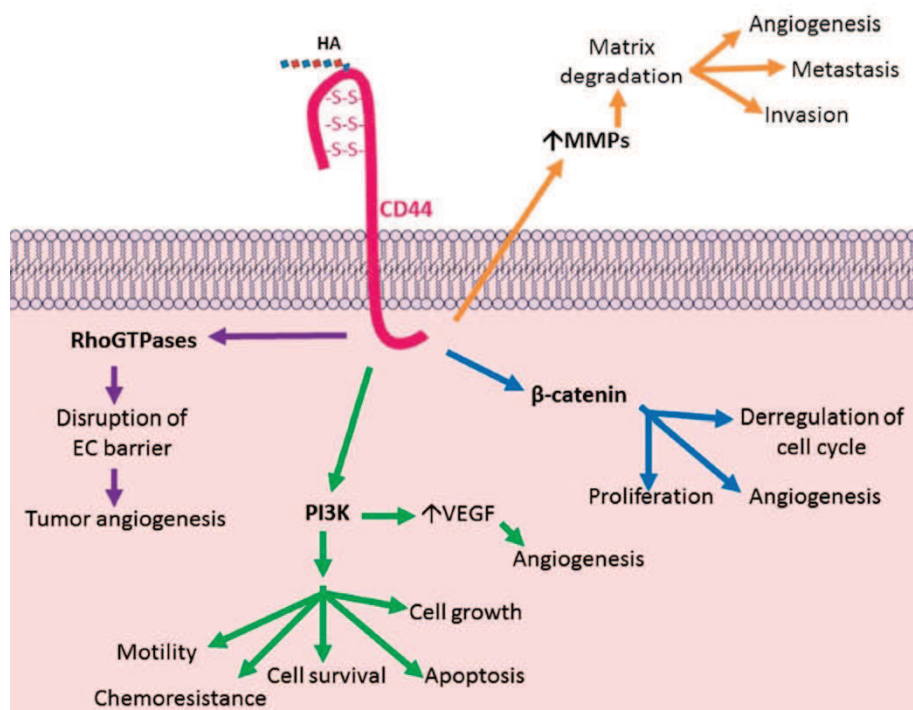


Figura 10. Interacción AH-CD44. CD44 es una glicoproteína transmembrana presente en diversos tejidos. Tiene un dominio citoplasmático que se fosforila por unión al AH para transmitir la señal inducida al interior celular. Existen múltiples efectores intracelulares para dicha señal, como proteínas del citoesqueleto (ankirinas), RhoGTPasas, PI3-Kinasas, β-catenina; así como la liberación de enzimas degradantes de la MEC (MMPs). Estas interacciones generan múltiples funciones celulares como la adhesión, crecimiento e invasión, angiogénesis y metástasis. Figura adaptada de *Spinelli et al. The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis, Clinical and translational Immunology, 2015.*

I. AH-CD44 y Rho-GTPasas:

La interacción AH-CD44 induce la activación de la señalización de RhoGTPasas, que produce cambios implicados en la supervivencia, migración e invasión de las células tumorales. CD44 está vinculado a pequeñas proteínas de unión a GTP como RhoA y Rac1. Se ha demostrado que la interacción AH de APM-CD44 conduce a la activación de Rac1 iniciando la formación de actina cortical y fortaleciendo la conexión entre CEs. Por otro lado, el AH

de BPM se une a CD44 y promueve la formación del complejo RhoA-GTP, que estimula la serina/treonina quinasa, lo que lleva a la formación de fibras activas en estrés y la ruptura de la barrera endotelial. Estos eventos desencadenados por el AH de BPM causan la ruptura del endotelio, evento importante en la angiogénesis tumoral y la metástasis del cáncer ⁴¹.

II. AH-CD44 y PI3K/Akt:

El AH induce la formación de un complejo que contiene CD44, ErbB2, fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), ezrin y la proteína chaperona HASP90. Se encontró que este complejo se ensambla y permite la señalización a través de ErbB2 y la activación de PI3K. PI3K finalmente fosforila a la proteína Akt causando su activación, lo que se transduce en la expresión de genes diana que favorecen la supervivencia celular ¹⁰⁷. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica sostenida que conduce a la supervivencia de las células tumorales y promueve el desarrollo de cáncer ¹⁰⁸. Se ha determinado que el AH es capaz de modular la vía PI3K/Akt en diferentes tipos de tumores, tales como el linfoma, el carcinoma de colon y de pulmón ⁹⁸. A su vez, la activación de esta vía en células tumorales puede aumentar la secreción de VEGF a través del factor inducible por hipoxia (HIF-1a) y modular la expresión de otros factores angiogénicos como el óxido nítrico y angiopoyetinas ¹⁰⁹. Por esto, su estudio es parte crucial para el entendimiento de los procesos de carcinogénesis.

III. AH-CD44 y Wnt/ β -catenina:

Otro punto interesante en la interacción AH-CD44 es la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. La vía de señalización de Wnt controla la polaridad celular, la auto-renovación y la proliferación. En presencia de ligandos Wnt, β -catenina (no fosforilada) se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes diana como la ciclina D1 y c-myc. Estos genes son importantes reguladores de ciclo celular y la proliferación ¹¹⁰, procesos claves relacionados estrechamente con la progresión de distintos tipos de cáncer ¹¹¹. Se determinó que la tirosin-quinasa ErbB2, previamente descrita, se encuentra modulada por la interacción AH-CD44 y promueve también la fosforilación de β -catenina, lo que conduce a la disminución de la adhesión celular y la desregulación del ciclo celular en células de cáncer de ovario ^{112,113}. A su vez, alteraciones en la vía Wnt disminuyen la expresión de CD44 y VEGF en diferentes tipos de tumores, lo que confirma el rol de la vía Wnt en la carcinogénesis y angiogénesis tumoral ^{114,115}.

IV. AH-CD44 y SDF1a-CXCR4:

La vía de señalización entre CXCR4 y su ligando SDF1a intervienen en la angiogénesis y la invasión; y se ha demostrado que dicha señal puede estar modulada por la unión del AH a CD44. SDF1a estimula la angiogénesis tumoral al actuar directamente sobre las CEs que expresan CXCR4. También participa en la metástasis, favoreciendo la migración, el establecimiento y la retención de células en microambientes específicos, donde las células metastásicas que expresan CXCR4 se alojan en órganos que expresan SDF1a ¹¹⁶. Particularmente, el eje SDF1a/CXCR4 es importante para la localización de células de cáncer de mama en sitios metastásicos, incluidos los huesos y los pulmones ¹¹⁷. En este sentido, se ha determinado que el AH de APM aumenta la señalización de CXCR4 inducida por SDF1a en células tumorales como en CEs asociadas a dicho tumor a través de la activación de la vía MAPK y la fosforilación de ERK, lo que condujo a una modulación positiva de la angiogénesis tumoral ¹¹⁸.

2.2.1.4. Efecto del AH sobre la angiogénesis tumoral, la resistencia a drogas y el metabolismo de las células tumorales

I. Angiogénesis tumoral

La angiogénesis es un proceso esencial en el crecimiento tumoral y la metástasis, el cual requiere eventos celulares secuenciales específicos, como la activación de las CEs, la degradación de la membrana basal, la migración de las CEs y la invasión del estroma ¹¹⁹. Además, no solo las células tumorales contribuyen en este proceso a través de la liberación de factores pro-angiogénicos, sino que las células inflamatorias, los fibroblastos estromales, las células perivasculares y otras células estromales asociadas a cada tumor contribuyen significativamente a la producción de factores pro-angiogénicos. Estos factores desencadenan una cascada angiogénica acompañada de la disociación de los pericitos de los vasos sanguíneos, la degradación de la membrana basal y la proliferación y migración de las CEs ¹²⁰ (*Figura 11*). Por lo tanto, la MEC que rodea la vasculatura, ya sea proveniente de las células tumorales o de las células asociadas al tumor puede afectar la angiogénesis, ya sea positiva o negativamente ¹²¹.

La MEC modula la formación de la red tubular de CEs y, por lo tanto, influye en la angiogénesis a través de múltiples mecanismos involucrados en la regulación del comportamiento de las CEs. En este sentido, el AH de BPM y los oAH son considerados factores pro-angiogénicos, ya que estimulan la proliferación, migración y formación de

capilares sanguíneos ¹²². A su vez, tal como se describió en la sección anterior, los fragmentos de AH pueden desencadenar diferentes cascadas de señalización a través de interacciones con CD44 las cuales culminan en la activación de la angiogénesis ^{116,123,124}. Por otro lado, el AH de APM es considerado anti-angiogénico ya que inhibe la proliferación y migración de las CEs ¹²⁵. Sin embargo, existe evidencia que indica que su rol sería controversial ya que puede presentar características pro-angiogénicas dependiendo de ciertas interacciones con otros componentes de la MEC. Específicamente, distintos estudios *in vivo* sugirieron que el AH de APM podría resultar pro-angiogénico por interacción con el PG versican, favoreciendo la movilización de células del estroma y la potenciación de la angiogénesis inducida por FGF-2 ¹²⁶.

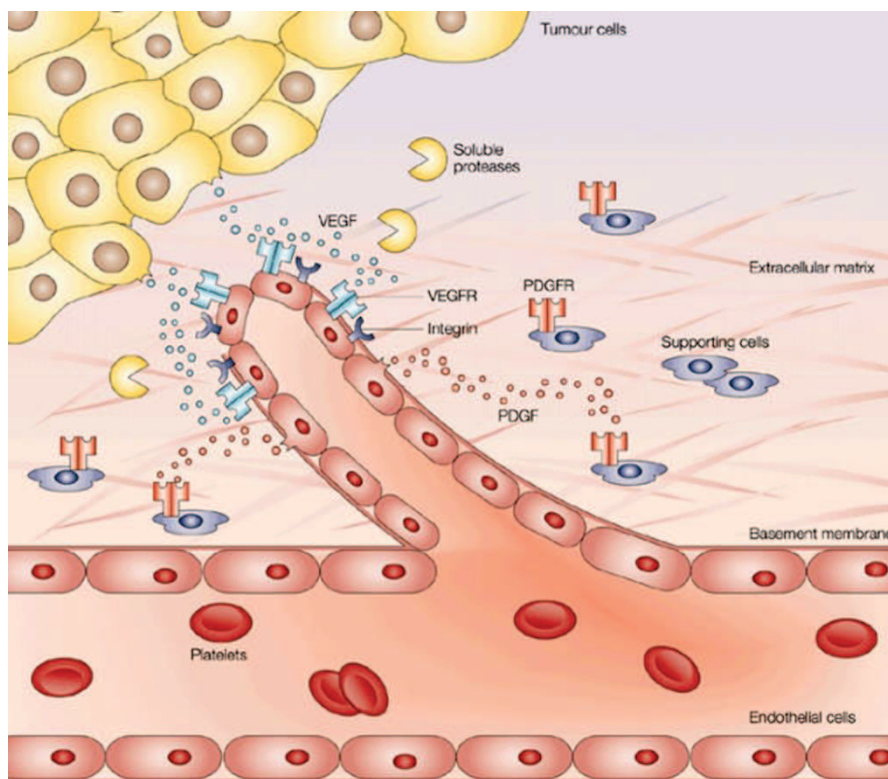


Figura 11. Angiogénesis tumoral. Las células tumorales liberan factores pro-angiogénicos, como VEGF, que se difunden hacia los tejidos cercanos y se unen a receptores en las células endoteliales preexistentes. Esta interacción lleva a la activación de células endoteliales y secreción de diversas enzimas proteolíticas como MMPs. Estas proteasas solubles degradan la membrana basal y la matriz extracelular, permitiendo la proliferación de las células endoteliales activadas; y su posterior migración hacia el microambiente tumoral. Figura adaptada de *Cristofanilli et al., Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches, Nature Reviews Drug Discovery, 2002.*

La modulación de la MEC del MAT no solo depende de la célula tumoral, sino que las distintas células asociadas al tumor pueden alterar la MEC y favorecer aún más la angiogénesis. Por su parte, las CEs microvasculares expresan altos niveles de CD44, RHAMM y HYAL2 ¹²⁷⁻¹²⁹ y se han considerado críticos para la formación de nuevos vasos

sanguíneos: CD44 es el principal receptor para la adhesión y proliferación de las CEs, mientras que RHAMM es esencial para la invasión de dichas células.

Respecto a las células inmunes asociadas a tumores, los macrófagos asociados a tumores se infiltran preferentemente en los tumores mamarios de una manera dependiente de AH y de sus moléculas de unión, mejorando la neo-vascularización y el crecimiento tumoral ^{130,131}. Por su parte, los fibroblastos asociados a tumor producen componentes de la MEC y sus enzimas degradantes, lo que los involucra en la remodelación de la MEC y la generación de un MAT favorable para la proliferación e invasión de células tumorales. Particularmente, la sobre-producción de AH en estos fibroblastos asociados a tumores mamarios espontáneos conduce a la acumulación de estos fibroblastos en el estroma tumoral, y a través de la activación de señalización paracrina vía CCL2 y VEGF contribuye al reclutamiento de progenitores de CEs, lo que favorece al proceso de angiogénesis ¹³²⁻¹³⁴.

II. Resistencia a drogas

Tradicionalmente, las células tumorales se han estudiado como poblaciones mayoritariamente homogéneas hasta en estadios más avanzados de la progresión tumoral, cuando la proliferación descontrolada combinada con el aumento de la inestabilidad genética generaría distintas subpoblaciones clonales. Sin embargo, en los últimos años, se ha acumulado contundente evidencia que apunta a la existencia de una mayor heterogeneidad tumoral desde la carcinogénesis y a la diferenciación de subpoblaciones de células neoplásicas responsables de la aparición de resistencia a multidroga. La aparición de resistencia implica que la efectividad de la terapia quimioterapéutica disminuya, lo que la convierte en la principal causa de recidivas y la aparición de metástasis. Dentro de los mecanismos por los cuales las células tumorales pueden desarrollar la resistencia a drogas se encuentran el aumento en la expresión de bombas de expulsión de drogas alojadas en la membrana plasmática de las células, la resistencia a la apoptosis y autofagia celular, la inducción de hipoxia y cambios epigenéticos, la reparación en el daño del ADN, cambios metabólicos, entre otros ¹³⁵ (*Figura 12*).

Uno de los factores clave en el desarrollo de resistencia a drogas es la existencia de una subpoblación de células tumorales denominadas células madre tumorales (CSC – *del inglés cancer stem cells*), las cuales pueden impulsar el crecimiento tumoral y la metástasis ¹³⁶. Esta población celular se caracteriza por la expresión de distintos marcadores asociados a cada tipo celular tumoral. Sin embargo, CD44, el principal receptor del AH, es uno de los

marcadores encontrados en la mayoría de los tumores. A su vez, las CSC se caracterizan por una alta expresión de bombas de expulsión de drogas dependientes de ATP pertenecientes a la familia ABC, lo cual le confiere características clave ¹³⁷.

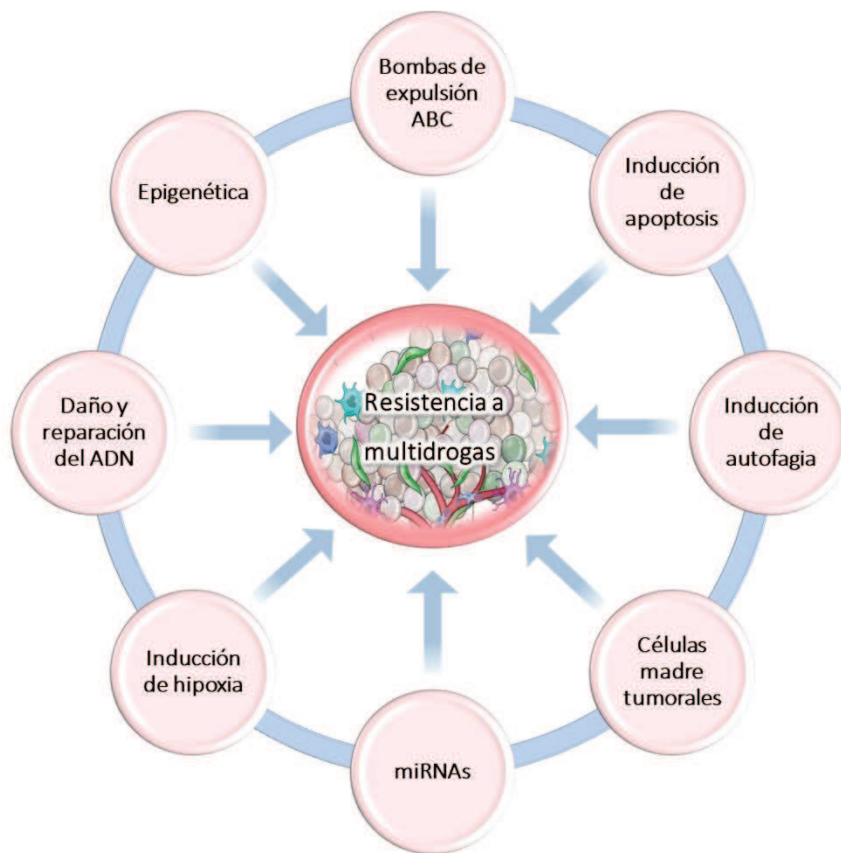


Figura 12. Principales mecanismos de desarrollo de resistencia a multidrogas. La aparición de resistencia a multidrogas es una de las causas principales de la falla del tratamiento antineoplásico. Este proceso está relacionado con la combinación de diferentes mecanismos regulados por cascadas de señalización intracelulares, señales provenientes de la MEC, eventos epigenéticos y la reprogramación metabólica. Esto produce el mantenimiento y/o renovación de células progenitoras tumorales resistentes que pueden generar la reaparición del tumor. Figura adaptada de Wu et al., *Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches*, *Cancer letters*, 2014.

Si bien los fármacos disponibles actualmente pueden reducir los tumores metastásicos, estos efectos son transitorios y, a menudo no se extiende sensiblemente la vida del paciente ¹³⁸. Una de las razones del fracaso de estos tratamientos es la adquisición de mecanismos de resistencia a los fármacos por las células tumorales a medida que evolucionan; otra posibilidad es que las terapias existentes no eliminen a las células CSC de manera efectiva. Se han desarrollado terapias contra la población mayor de células tumorales debido a que a menudo se identifican por su capacidad para reducir la masa tumoral. Por estas causas, las terapias a desarrollarse a futuro tienen que dirigirse más específicamente contra las CSC, ya que favorecería respuestas efectivas en tumores primarios e incluso en tumores metastásicos. En relación con la MEC, se ha determinado que el AH promueve el

mantenimiento de las propiedades asociadas a las CSC a través de diversos mecanismos, entre los cuales se encuentran la aparición de resistencia a drogas, la transición epitelial-mesenquimal, la reprogramación metabólica, la resistencia al estrés oxidativo, entre otros ^{45,139}.

A su vez, otra de las causas de una alta resistencia a los agentes quimioterapéuticos es la sobre-expresión de diferentes transportadores de membrana tipo “bombas” dependientes de ATP (ABC), tales como ABCB1 (glicoproteína-P, Gp-P), ABCC1, ABCG2 entre otros. Los mismos presentan un rol crucial en el eflujo de los fármacos desde el interior celular ¹⁴⁰; por lo que un aumento en la expresión de los mismos implica mayor eflujo de las drogas quimioterapéuticas hacia el exterior celular, lo que disminuye su eficacia y favorece el desarrollo de resistencia. Se ha demostrado que la interacción AH-CD44 afecta la función de los transportadores de drogas mediante varios mecanismos, incluida la modulación de su expresión génica y su actividad ^{141,142}. Por otro lado, se ha descubierto que los oAH pueden inhibir la interacción de CD44 con transportadores ABCG2 y Gp-P en la membrana plasmática y aumentan la sensibilidad de las células tumorales a agentes quimioterapéuticos como DOX y vincristina ^{143,144}.

Otro de los procesos celulares que ha sido recientemente asociado a la aparición de resistencia a drogas es la autofagia. La misma se caracteriza por la formación de vesículas denominadas autofagosomas las cuales engloban contenido celular citoplasmático u organelas, se fusionan con los lisosomas y su contenido es digerido por hidrolasas lisosomales. Las macromoléculas resultantes son recicladas y catabolizadas, generando energía utilizable por las células ante una disminución de nutrientes o en respuesta a estrés; y contribuyendo finalmente a la supervivencia celular. Respecto al cáncer, se ha demostrado que tanto la quimioterapia, radioterapia y la terapia endocrina activan la autofagia en las células tumorales ¹⁴⁵ (*Figura 13*). Más aún, distintos estudios determinaron que la autofagia inducida por la quimioterapia promueve la supervivencia de diferentes modelos de cáncer de mama, colon y esófago ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Recientemente, se informó que la autofagia facilita el desarrollo de resistencia a tamoxifeno y herceptina en células de cáncer de mama ^{149,150}. De principal interés para esta tesis se observó que el tratamiento con la antraciclina EPI indujo la autofagia en un modelo de cáncer de mama humano sensible a la terapia hormonal, protegiendo a las células de la apoptosis inducida por EPI ^{146,151}.

En relación con el AH, se determinó que la presencia de oAH y su interacción con CD44 provoca la muerte celular por autofagia a través del estrés del retículo endoplásmico en

leucemia linfoblástica aguda ¹⁵². Por otro lado, inhibir la expresión de HAS3, o bloquear al receptor CD44 inhibió la proliferación de células de glioma *in vitro* e *in vivo* debido a la inhibición de la autofagia y a la detención del ciclo celular en G1; efectos similares a los encontrados cuando se trataron las células con el inhibidor de la síntesis de AH 4-MU ¹⁵³.

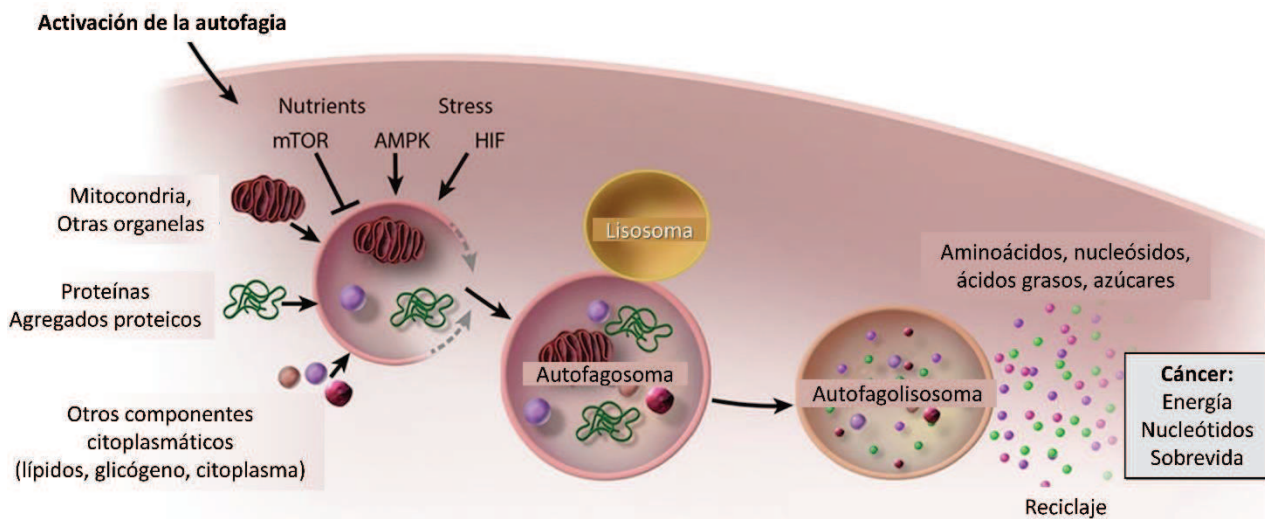


Figura 13. Autofagia en cáncer. La autofagia se activa en respuesta a diversas condiciones de estrés celular y distintas señales recibidas desde el interior o exterior celular. Una vesícula de doble membrana comienza a formarse y alargarse en un autofagosoma para contener los componentes dirigidos a la degradación intracelular, incluidas las mitocondrias, las organelas dañadas, etc. El autofagosoma maduro conteniendo los componentes de degradación intracelular luego se fusiona con el lisosoma y forma un autolisosoma, que proporciona un entorno ácido para que las enzimas hidrolíticas se activen y generen precursores sencillos aprovechables por la célula tumoral. Figura adaptada de *White et al., Autophagy Regulates Stress Responses, Metabolism, and Anticancer Immunity, Trends in Cancer, 2021.*

Por otro lado, las células que forman parte del MAT (fibroblastos, CE, adipocitos, células inmunes y células madre derivadas de médula ósea) podrían favorecer la resistencia a la quimioterapia a través de diversos mecanismos. De particular interés resultan las CE, las cuales desarrollan sus propias vías específicas de resistencia durante el tratamiento quimioterapéutico. Dentro de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia se encuentran la resistencia a la muerte celular por apoptosis. Se ha observado que durante un tratamiento antitumoral y anti-angiogénico combinado, las CE adquirieron resistencia al fármaco sunitinib durante el tratamiento con DOX ¹⁵⁴. En concordancia con lo anterior expuesto, se ha determinado que las CE son capaces disminuir la eficacia de la quimioterapia a través del incremento de la expresión de los transportadores ABC ^{155,156}. Por esta razón, es crucial realizar un enfoque integral del MAT y buscar estrategias terapéuticas que promuevan la eliminación de los distintos tipos celulares asociados al tumor para minimizar la progresión del tumor y el riesgo de recurrencia.

III. Perfil metabólico de las células tumorales

Uno de los mecanismos estrechamente relacionado con la progresión tumoral es la adaptación del perfil metabólico de las células tumorales hacia un desbalance que favorece la glucólisis sobre la respiración celular mitocondrial, la cual sería teóricamente más eficiente energéticamente en términos de rendimiento de ATP. Sin embargo, las células tumorales logran re-programar su metabolismo a través del llamado “*efecto Warburg*”¹⁵⁷ (Figura 14). La disfunción mitocondrial, el favorecimiento de un ambiente hipóxico y la re-programación metabólica a través de oncogenes específicos son los procesos iniciales necesarios para la obtención anormal de energía. En este sentido, las células tumorales favorecen el metabolismo anaeróbico de la glucosa a través distintos procesos: i) la sobre-expresión de los transportadores de glucosa que favorecen su ingreso a la célula, ii) la formación de lactato mediante fermentación láctica a partir del piruvato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), y iii) su liberación al exterior celular. Un aumento en la expresión y actividad de dicha enzima implica una mayor producción de lactato, lo que favorece a su vez la sobre-expresión de los transportadores de lactato en la superficie de la membrana plasmática. Como consecuencia, la concentración de lactato en el medio extracelular genera la acidificación del mismo, lo cual resulta favorable para la progresión tumoral. Un MAT ácido puede modular la migración celular, angiogénesis y el escape inmunológico ya que promueve la liberación de diversos factores de crecimiento tales como VEGF, TGF β , IL-1 y HIF1 α incluso en condiciones normales de oxígeno^{158,159}. A su vez, un aumento en la concentración de lactato está positivamente correlacionado con la aparición de resistencia a la radioterapia¹⁶⁰.

Tal como se ha descrito anteriormente, la reprogramación metabólica de las células tumorales está influenciada tanto por factores propios de la célula como por factores extrínsecos provenientes del MAT; uno de estos es la presencia de moléculas características de la MEC como el AH⁴⁴. Más aún, existe una estrecha relación entre el metabolismo del AH y el metabolismo celular, ya que sus precursores se obtienen a partir de la glucosa. En este sentido, se ha determinado que la síntesis de AH favorece las propiedades tipo CSC a través de la reprogramación metabólica y la vía biosintética de las hexosaminas, de la cual se obtiene la UDP-GlcNAc. En concordancia, un modelo animal de xenoinjerto generado con células que sobre-expresaban HAS3 demostró que la acumulación de AH en los tumores se correlacionó con un incremento en la hipoxia y la acidificación del tumor¹⁶¹. A su vez se determinó que la sobre-producción de AH desplazó el metabolismo celular hacia la glucólisis y fermentación en las células de cáncer de mama

⁴⁴, lo que indica que el AH actúa como un regulador clave del metabolismo celular. Interesantemente, la señalización a través de AH-CD44 también puede modular la liberación de lactato, gracias a la co-localización de CD44 con receptores anexos como CD147 que afecta la función de los transportadores de lactato ¹⁶².

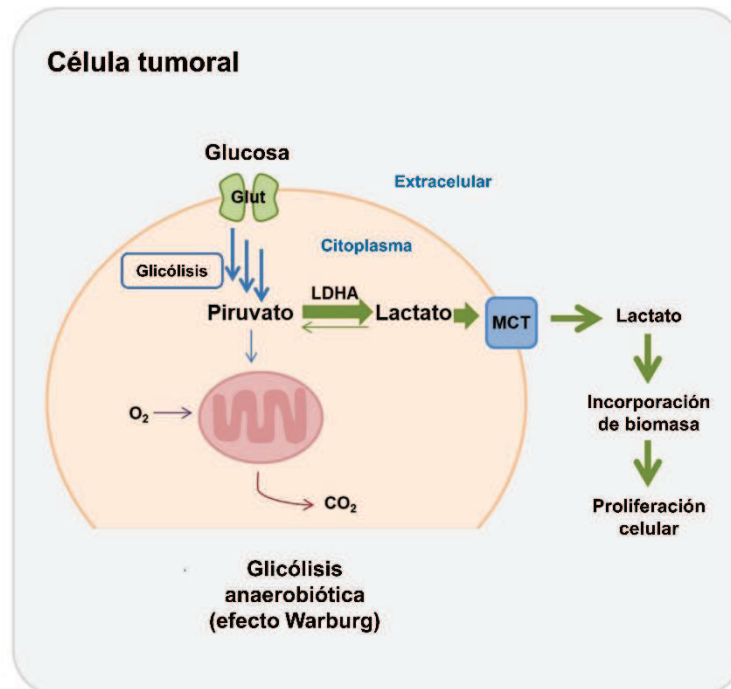


Figura 14. Reprogramación metabólica en células tumorales: efecto Warburg. Las células tumorales reprograman su metabolismo glucídico para obtener energía principalmente desde el proceso de glucólisis, independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno. El piruvato producido por dicho proceso no se dirige a la matriz mitocondrial, sino que se acumula en el citoplasma para ser sustrato de la fermentación láctica, para producir lactato. Existe una retroalimentación positiva de todo el mecanismo, dado por la sobre-expresión de los transportadores de glucosa y lactato y las enzimas involucradas en la glucólisis y fermentación láctica. El lactato generado se libera al medio extracelular donde promueve la proliferación celular y la progresión tumoral. Figura adaptada de Kim *et al.*, *Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.

Por otro lado, la enzima UGDH se encuentra implicada estrechamente con la regulación del metabolismo celular y con la producción del otro precursor del AH, el UDP-GlcUA ⁶⁴. Se ha determinado que en un modelo de cáncer de mama anular la expresión de UGDH o utilizar 4-MU inhibió la invasión celular a través de la reprogramación metabólica ¹⁶³. De forma similar, se determinó una relación estrecha entre genes relacionados con la MEC y el metabolismo celular en cáncer colorrectal, entre los que se encontraban enzimas colagenasas, metaloproteinasas, LDH y UGDH, los cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad ¹⁶⁴. Por esto, es necesario un análisis integral del metabolismo de AH y sus precursores, considerando la relación estrecha existente con la reprogramación metabólica de las células y sus requerimientos energéticos.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El AH es un modulador del comportamiento tumoral en este microambiente, capaz de afectar la respuesta a antraciclinas y la respuesta angiogénica. Su efecto requiere de la interacción con sus receptores y de la activación de vías de señalización específicas. Por lo tanto, la modulación del metabolismo de AH es un blanco terapéutico a considerar según el tipo de cáncer.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El aumento del número de recidivas en cáncer es consecuencia de la aparición o existencia de células tumorales resistentes al tratamiento quimioterapéutico, entre ellas las células madres tumorales capaces de continuar en proliferación y regenerar el tumor. La desregulación de la matriz extracelular en microambiente tumoral es esencial para el proceso de metástasis y la adquisición de resistencia a drogas de uso clínico, por lo cual el estudio de la expresión del ácido hialurónico en distintos tumores permitirá considerar a esta molécula como un marcador o blanco a modular en los procesos patológicos del cáncer. En este sentido, el objetivo general del presente proyecto es evaluar al ácido hialurónico como modulador de la respuesta al tratamiento quimioterapéutico, con antraciclinas analizando la modulación de mecanismos implicados en la angiogénesis y la aparición de resistencia a drogas.

2.2. Objetivos específicos

a) *Evaluar el efecto del agregado de ácido hialurónico exógeno de bajo peso molecular en líneas celulares tumorales de diferente etiología sobre:*

- Modulación de angiogénesis, proliferación celular y apoptosis
- Desarrollo de resistencia a drogas

b) *Identificar la presencia de células tumorales resistentes al tratamiento antitumoral en combinación con AH exógeno analizando:*

- Expresión de marcadores de resistencia a drogas
- Análisis de vías de señalización involucradas en la aparición de resistencia

c) *Evaluar el efecto de la alteración de la síntesis de ácido hialurónico endógeno en líneas celulares tumorales sobre el desarrollo de resistencia a drogas estudiando:*

- Modulación de la proliferación celular, apoptosis y angiogénesis
- Análisis de diferentes procesos implicados en la respuesta a la quimioterapia
- Cambios en la expresión de componentes de la matriz extracelular



MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS GENERALES

1.1. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico de bajo peso molecular utilizado para los experimentos *in vitro* e *in vivo* (AH de BPM, 1×10^5 Da – $3,3 \times 10^5$ Da) fue gentilmente provisto por Farmatrade Argentina (Contipro a.s.).

1.2. Antraciclinas

Las antraciclinas que se utilizaron en la presente tesis son la DOX y la EPI. Durante las últimas décadas, ambas se han utilizado para el tratamiento de enfermedades metastásicas como terapia adyuvante, y son uno de los fármacos más activos empleados en el tratamiento de pacientes con distintos tipos de cáncer ¹. La EPI es un derivado de la DOX que se obtiene mediante una epimerización axial a ecuatorial del grupo hidroxilo en C-4, lo cual genera cambios farmacocinéticos y metabólicos como el aumento del volumen de distribución y la eliminación por glucuronidación ², obteniendo así una menor toxicidad. La DOX fue cordialmente donada por Laboratorios FILAXIS s.a. La EPI fue adquirida en la compañía Selleckchem.

1.3. Anticuerpos y reactivos

El anticuerpo anti- β -catenina se adquirió en Millipore. El anticuerpo específico contra la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue comprado en NeoBioLab. El anticuerpo anti-Akt fosforilada (p-Akt: Ser473, Ser472 y Ser474) se adquirió en la compañía R&D System. El anticuerpo anti-CD44 conjugado al fluorocromo APC se compró en BD BioSciences y el AH conjugado al fluorocromo FITC fue de Calbiochem. Los anticuerpos secundarios correspondientes a cada anticuerpo primario fueron obtenidos en la compañía Santa Cruz Biotechnology. El kit de detección de apoptosis utilizado (Anexina V-FITC) fue adquirido en ImmunoTools. El kit para transfección Amaxa Cell Line Nucleofector® V se adquirió en Lonza Cologne AG. El kit de detección de citotoxicidad celular fue adquirido en Abcam. La ciclosporina A (CsA) fue proporcionada amablemente por Novartis Pharmaceuticals Corporation.

1.4. Líneas celulares

La línea celular EL4 de linfoma T de origen murino (TIB-39™) y la línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma mamario humano (HTB-26™) se adquirieron en la compañía ATCC®. La línea celular K12 de osteosarcoma murino fue por la Dra. Marcela Bolontrade (Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica, Hospital Italiano, Argentina). La línea celular HMEC-1 de endotelio humano fue proporcionada gentilmente por la Dra. Mariana García (Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional, Universidad Austral, Argentina). La línea celular MDA-MB-231 fue autenticada por la compañía Northgene Ltd. Company, utilizando pruebas de ADN altamente sensibles para repeticiones de microsatélites en tándem. Las líneas celulares murinas (EL4 y K12) también se analizaron para identificar cada línea celular y descartar contaminación con líneas celulares humanas por el Departamento de Control de Calidad del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH, Pergamino, Argentina).

Para el cultivo celular, las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM con alto contenido de glucosa (Lab. Microvet) suplementado con 2 μ moles/l de glutamina (Lab. Microvet), 100 U/ml de penicilina (Lab. Microvet), 100 mg/ml de estreptomycin (Lab. Microvet) y 10% de suero fetal bovino (SFB - Natocor) inactivado por calor. Todas las líneas se mantuvieron en estufas a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Durante los ciclos de cultivo celular se realizaron controles periódicos de la morfología celular, así como controles estrictos de los pasajes y la tasa de crecimiento de cada línea. Además, se descartó la presencia de contaminación por micoplasma mediante PCR.

2. CÁLCULO DE IC₅₀

Para determinar las concentraciones de uso de DOX y EPI, se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀, de su sigla en inglés: *half maximal inhibitory concentration*), que se refiere a la concentración de DOX o EPI necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad celular *in vitro*. Para ello, se realizaron tratamientos con distintas concentraciones de DOX o EPI (ensayo MTT). Los datos de absorbancia obtenidos para cada línea celular fueron analizados para calcular el valor IC₅₀ interpolando el valor necesario para disminuir la viabilidad del 50% de las células analizadas con el software Prism (GraphPad).

3. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA CUMPLIR EL PRIMER Y SEGUNDO OBJETIVO PROPUESTOS

3.1. Análisis de expresión de CD44 y capacidad de unión a AH

Para determinar la capacidad de unión a AH y los niveles de expresión de su principal receptor CD44 en las líneas celulares estudiadas, 5×10^5 células de la línea EL4, MDA-MB-231 y K12 fueron procesadas de la siguiente manera: a) para detectar la capacidad de unión a AH se incubaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de AH-FITC en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a 4°C; b) para determinar la expresión de CD44 en la superficie de la membrana plasmática, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD44 acoplado a APC en una solución de albúmina sérica bovina al 1% (BSA) en PBS durante 1 hora a 4°C. Para ambos ensayos, una vez finalizado el tiempo de incubación, se lavó dos veces con 1% BSA-PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Posteriormente, los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (LLC).

3.2. Tratamientos con AH de BPM y DOX

Para todos los experimentos se utilizó AH de BPM diluido en agua ultra pura hasta una concentración de 6 mg/ml. Según antecedentes propios del laboratorio y bibliografía de referencia, las concentraciones de AH de BPM seleccionadas para realizar los fueron 20 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ (AH 20 y AH 100 respectivamente) ⁷⁴. La DOX y la EPI se diluyeron en una solución salina estéril siguiendo las indicaciones de cada proveedor. Las concentraciones de DOX utilizadas en los ensayos fueron 0,5 μM , 1 μM y 2,5 μM (0,5D - 1D - 2,5D respectivamente) seleccionadas teniendo en cuenta una concentración de droga menor a la requerida para disminuir la viabilidad del 50% de las células (IC_{50}).

El esquema metodológico planteado para llevar a cabo los experimentos *in vitro* fue el siguiente: las tres líneas celulares (EL4, K12 y MDA-MB-231) se cultivaron con una densidad de 1×10^6 células/ml y fueron sometidas a quiescencia 12 horas previas al inicio de cada experimento. Al día siguiente, se adicionó AH de BPM al medio en las dos concentraciones de trabajo seleccionadas 20 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ (AH 20 - AH 100 respectivamente) y luego de 12 horas del tratamiento con AH de BPM, se adicionó DOX (0,5D, 1D o 2,5D) para cumplir con un tratamiento de 12 horas en combinación con el AH de BPM. Posteriormente, se colectaron los medios condicionados y se conservaron a -

80°C hasta su uso. Las células fueron colectadas teniendo en cuenta cada ensayo a realizar una vez finalizado el tratamiento combinado con AH de BPM + DOX (Figura 15).

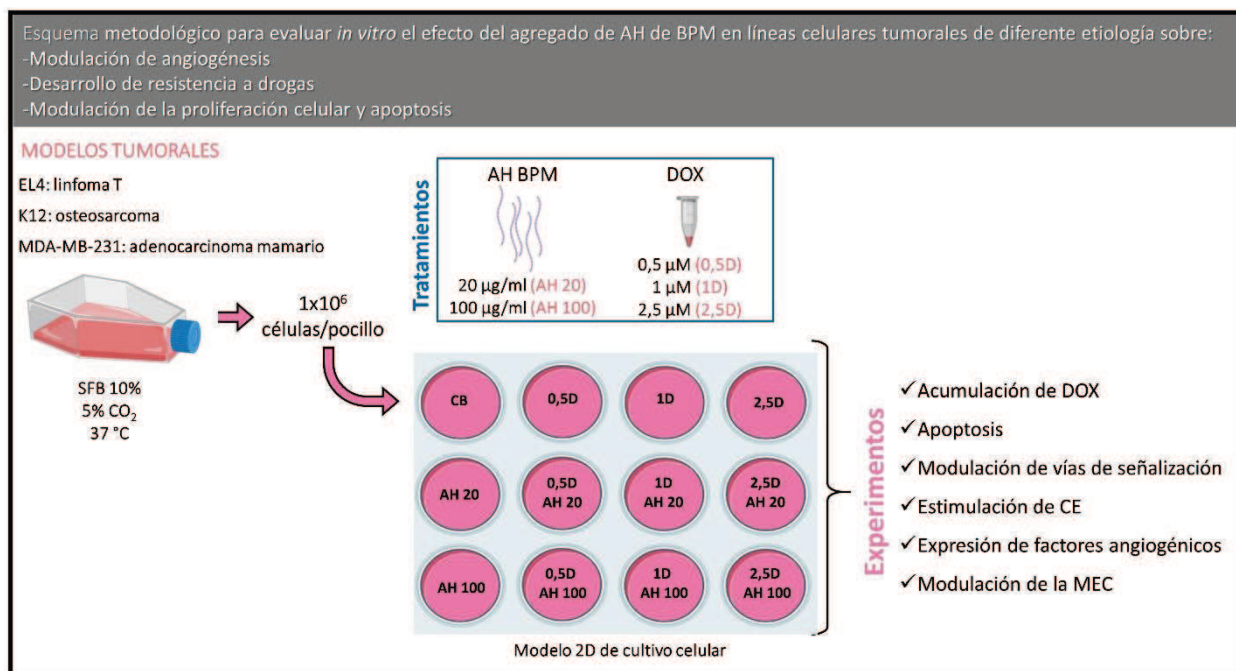


Figura 15. Diseño experimental para evaluar *in vitro* el efecto del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX en líneas celulares tumorales de diferentes etiologías. Brevemente, las líneas celulares EL4, K12 y MDA-MB-231 se cultivaron en condiciones estándar y se plaquearon. Luego de 12 horas de privación de SFB se realizaron los tratamientos con AH de BPM (AH 20 y AH 100). Pasadas 12 horas del tratamiento con AH de BPM, se adicionó DOX (0,5D; 1D; 2,5D) para completar 24 horas de tratamiento combinado. Una vez finalizados, las células y sobrenadantes se utilizaron para realizar los experimentos indicados.

3.3. Ensayo de detección de acumulación intracelular de antraciclinas

Para evaluar si el tratamiento con AH de BPM podía modular el eflujo de antraciclinas a través de la membrana de las células tumorales, se utilizaron 5×10^5 células tratadas como se mencionó anteriormente para analizar la acumulación intracelular de dichas drogas. Las antraciclinas utilizadas (DOX y EPI) emiten fluorescencia en un espectro de emisión de 550-600 nm detectable por citometría de flujo. Por ello, se pudo cuantificar y diferenciar el eflujo de DOX o EPI midiendo la acumulación intracelular de cada fármaco como se describió anteriormente¹⁴⁴. Para estudiar la presencia de bombas de expulsión funcionales, se analizó la acumulación de DOX en presencia o ausencia del tratamiento con una solución 100 µM de CsA. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y los datos se evaluaron con el software FlowJo (LLC).

3.4. Ensayo de detección de apoptosis con Anexina-V

Para analizar si el tratamiento con AH de BPM ejercía un efecto modulador sobre la acción de la DOX en las células tumorales tratadas, se utilizó el ensayo de detección de apoptosis basado en la utilización de anexina-V acoplada al fluorocromo FITC (ImmunoTools). Para ello, 5×10^5 células fueron tratadas como se mencionó anteriormente, y luego se siguieron las instrucciones brindadas por el fabricante para realizar la marcación. Las muestras se procesaron con un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y los datos se evaluaron posteriormente con el software FlowJo (LLC).

3.5. Ensayo de formación de tumorosferas

Este tipo de ensayo se utiliza normalmente para investigar el rol de las interacciones entre las células tumorales y la MEC a través del crecimiento de esferas 3D ¹⁶⁵. De esta manera, es posible simular en un ensayo *in vitro* la disposición de la MEC de una forma similar a la observada en tumores *in vivo* ¹⁶⁶. Para llevarlo a cabo, se partió de 1×10^4 células MDA-MB-231 colocadas en 20 μ l de medio completo junto con la cantidad de AH de BPM necesaria para llegar a la concentración de 20 μ g/ml o 100 μ g/ml (AH 20 y AH 100) y la cantidad necesaria de DOX para alcanzar la concentración de 0,5 μ M (0,5D). Posteriormente, se las colocó en la parte superior de una placa de Petri con PBS en su interior para prevenir el efecto de la evaporación. Las células crecieron en forma invertida y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo durante 8 días, y una vez finalizado dicho tiempo, se tomaron varias micrografías de cada condición y se analizaron utilizando el software ImageJ 1.50b (NIH) para el cálculo del volumen de cada tumorosfera ^{166,167}. A su vez se analizó la acumulación de DOX y la apoptosis inducida por citometría de flujo tal como se mencionó previamente (*Figura 16*).

3.6. Extracción de proteínas y Western Blot

Para analizar la expresión de proteínas intracelulares (β -catenina y p-Akt), las líneas celulares tumorales fueron tratadas con AH de BPM y DOX como se describió anteriormente y luego fueron lisadas con un buffer que contenía: Tris-HCl 0,02 M pH=8, NaCl 0,15 M, NaF 0,1M, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 1mM pH=10, glicerol 10% y NP-40 1%; en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma). Luego se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos, se conservó el sobrenadante y se midió la concentración proteica utilizando

el método de Bradford. Los extractos se almacenaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente, cantidades iguales de proteína se resolvieron mediante una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos (anti- β -catenina, anti-p-Akt, anti-GAPDH) durante toda la noche a 4°C , y luego se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se detectó la reacción de quimioluminiscencia utilizando una solución estable de peróxido de hidrógeno y luminol. Las imágenes se obtuvieron con un analizador de imagen mini bioluminiscente ImageQuant 4000 (GE HealthCare LifeSciences) y se analizaron densitométricamente utilizando el software ImageJ 1.50b (NIH).

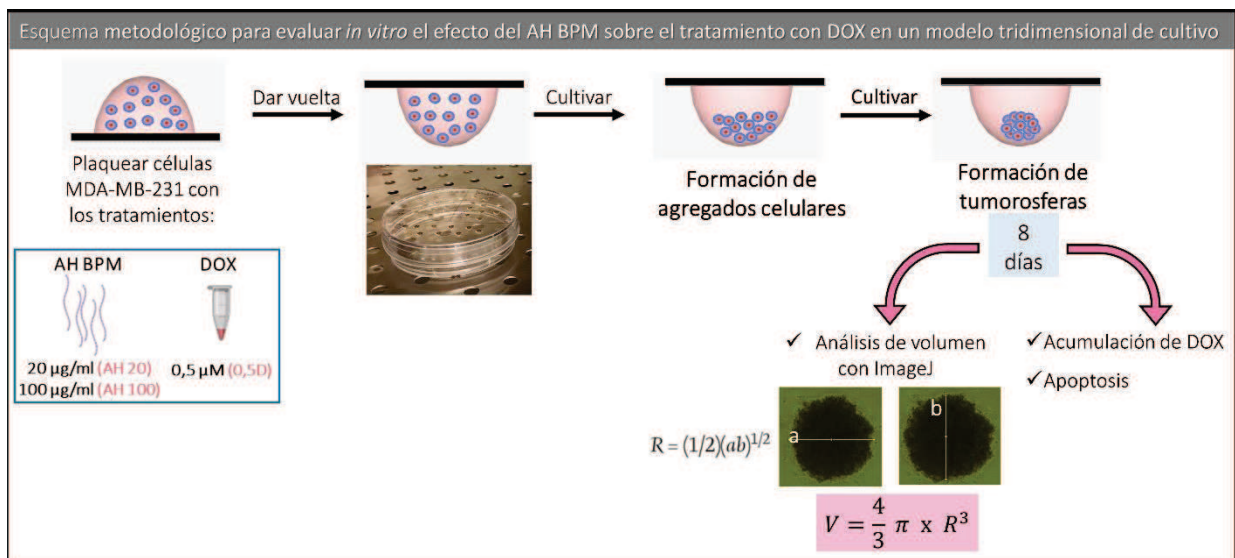


Figura 16. Ensayo de formación de tumorosferas. Las células MDA-MB-231 se plaquearon en la tapa de una p100 en forma de gota con el tratamiento de AH de BPM y DOX (0,5D únicamente). Se dio vuelta la placa para que crezcan en forma tridimensional y se cultivaron hasta obtener tumorosferas (8 días). Una vez finalizado el experimento, se tomaron fotos y se analizó el volumen con el software ImageJ. Las células de cada condición fueron procesadas para analizar la acumulación intracelular de DOX y los niveles de apoptosis por citometría de

3.7. Ensayo de cierre de herida sobre células endoteliales

El ensayo de cierre de herida realizado sobre células con capacidad angiogénica permite analizar la migración de dichas células bajo diferentes estímulos. En este caso, se utilizaron CEs correspondientes a la línea celular HMEC-1 las cuales fueron estimuladas con los medios condicionados provenientes de las células tumorales tratadas con AH de BPM y DOX, tal como se mencionó previamente. Este método se basa en la observación de que, al realizar una herida en una monocapa confluyente de

células con potencial angiogénico, las células situadas en el borde tienen la capacidad de movilizarse para cerrarla. Para ello, las células HMEC-1 ($2,5 \times 10^5$) se cultivaron hasta llegar a confluencia total en placas de 24 pocillos, y 18 horas antes de comenzar el ensayo fueron sometidas a quiescencia por falta de SFB para evitar posibles efectos de proliferación. Para realizar las heridas en cada pocillo se empleó una punta de pipeta estéril de 100 μ l, creando una línea de área libre de células endoteliales ¹⁶⁸. En ese momento, las células HMEC-1 se expusieron a los medios condicionados provenientes de las células tumorales EL4, K12 o MDA-MB-231 previamente tratadas con AH de BPM y DOX. Para el control negativo, las células se expusieron a medio de cultivo DMEM sin SFB. También se realizaron controles para descartar posibles efectos residuales de DOX o AH de BPM sobre las CEs. En paralelo al cultivo de células tumorales tratadas con AH de BPM y DOX se realizaron controles que contenían únicamente el mismo medio de cultivo de cada línea celular tumoral con las mismas dosis de AH de BPM (AH 20 y 100) y DOX (0,5D, 1D y 2,5D) utilizadas para tratar a las células tumorales. Se respetaron los tiempos de cultivo e incubación y luego estos CR se utilizaron como medio de estímulo para las CEs HMEC-1. Se capturaron tres imágenes en el mismo punto de coordenadas a las 0, 4, 8 y 22 horas después de realizar la herida para el posterior cálculo del área libre de células (área libre tiempo 0 – área libre tiempo de ensayo). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.50b (NIH).

3.8. Ensayo de formación de tubos de células endoteliales

Para evaluar la capacidad angiogénica de las CEs en un contexto tridimensional, se realizó un ensayo de formación de tubos utilizando una matriz de membrana basal reducida en factores de crecimiento Geltrex™ (Gibco™ Life Technologies) ¹⁶⁹. Para ello, se sembraron 40 μ l de Geltrex™/pocillo en una placa de 96 pocillos y se dejó polimerizar durante 30 minutos a 37°C. Las células HMEC-1 se mantuvieron en quiescencia durante 18 horas previas al ensayo, luego se sembraron en los pocillos con Geltrex™ y se expusieron a los sobrenadantes de las células EL4, K12 y MDA-MB-231 provenientes de los diferentes tratamientos con AH de BPM y DOX. Como control positivo, se utilizaron 100 ng/ml de VEGF humano recombinante mientras que, como control negativo se utilizó solo el medio de cultivo DMEM sin SFB. Después de 4 horas de incubación a 37°C, las células se tiñeron usando una solución de eosina. La cuantificación se realizó analizando el área sin células de cinco imágenes por pocillo con el software ImageJ 1.50b (NIH).

3.9. ELISA

Los niveles de secreción de VEGF y FGF-2 de las células tumorales (humano y de ratón) se determinaron mediante el kit comercial de ELISA DuoSet (R&D System) a partir de los medios de cultivo condicionados colectados luego de los tratamientos con AH de BPM y DOX. Los niveles de expresión de FGF-2 (humano y de ratón) se determinaron mediante el kit ELISA DuoSet (R&D System) a partir de los extractos proteicos de todas las líneas celulares tratadas con DOX y AH de BPM. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

3.10. Ensayo de exclusión de partículas

Para analizar el efecto de los tratamientos con AH de BPM y DOX sobre los componentes de la MEC, se realizó un ensayo de exclusión de partículas. Este ensayo se utiliza para visualizar el área pericelular que está compuesta principalmente por AH. De esta forma, el ensayo permite detectar el AH pericelular aprovechando sus características de encapsulamiento de la célula y, en este caso, bloqueando partículas pequeñas y exógenas como los glóbulos rojos¹⁷⁰. Para ello, las células MDA-MB-231 se colocaron en una placa de 12 pocillos en baja densidad (3×10^4) y se trataron con AH de BPM y DOX tal como se describió anteriormente. Cuando se completaron los tratamientos, se realizó un lavado con PBS y se agregaron glóbulos rojos fijados en alta densidad (2×10^7) a cada pocillo para dejarlos decantar en estufa durante 30 minutos. Durante cada ensayo se realizaron controles con enzima hialuronidasa activa. Posteriormente, para visualizar el área pericelular compuesta principalmente por AH, se tomaron varias micrografías de cada condición y se analizaron utilizando el software ImageJ 1.50b (NIH) (*Figura 17*).

3.11. Ensayo tipo ELISA para la detección de AH soluble

Debido a que una fracción del AH sintetizado en la membrana plasmática puede ser secretado y no quedar anclado a la célula, también se decidió evaluar la concentración de este GAG en los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 tratadas con AH de BPM y DOX. El protocolo de detección utilizado fue adaptado a partir de antecedentes previos¹⁷¹ y desarrollado por nuestro laboratorio durante esta tesis. Para realizar dicha técnica se eligió utilizar una estrategia tipo “*sándwich*” en la cual se emplea una proteína

específica de unión a AH (del inglés *hyaluronan binding protein* o HABP) para cubrir una placa de 96 pocillos. Posteriormente se colocaron las muestras de los sobrenadantes provenientes de las células MDA-MB-231 junto con soluciones de concentraciones conocidas de AH como curva estándar, y se adicionó la misma proteína HABP en su forma biotinilada. Finalmente se determinó la concentración de AH a través de la detección colorimétrica de la actividad de la enzima peroxidasa. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

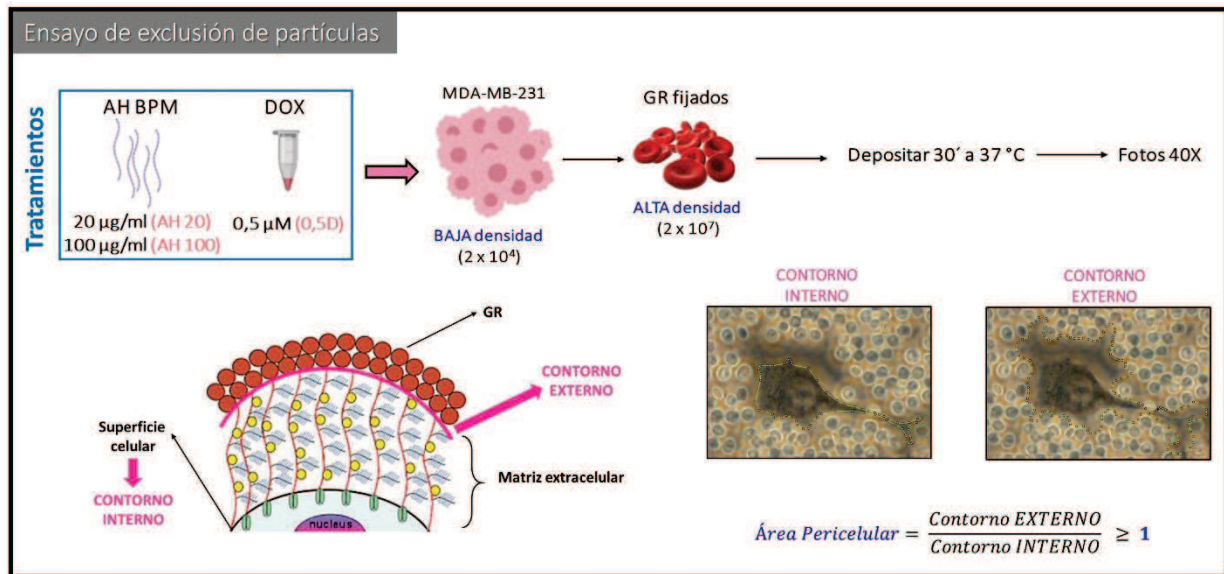


Figura 17. Ensayo de exclusión de partículas. Este ensayo se utiliza para visualizar el área pericelular que está compuesta principalmente por AH. Las células MDA-MB-231 se colocaron en una placa de 12 pocillos en baja densidad (3x10⁴) y se trataron con AH de BPM y DOX tal como se describió anteriormente. Cuando se completaron los tratamientos, se realizó un lavado con PBS y se agregaron glóbulos rojos fijados en alta densidad (2x10⁷) a cada pocillo para dejarlos decantar en estufa durante 30 minutos. Durante cada ensayo se realizaron controles con HYAL activa. Posteriormente, para visualizar el área pericelular compuesta principalmente por AH, se tomaron varias micrografías de cada condición (objetivo 40X) y se calculó el área pericelular como la relación entre el contorno externo y el contorno interno de cada célula analizada.

3.12. Experimentos *in vivo*

Para analizar la posible modulación de un MAT rico en AH BPM en un contexto *in vivo*, se realizaron diferentes modelos tumorales ectópicos murinos. Las células EL4 o K12 (1x10⁶) fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco derecho de ratones C57BL/6 (EL4) o BALB/c (K12) de cuatro a seis semanas de edad. Para los experimentos *in vivo* con las células MDA-MB-231 se utilizaron ratones Nu/Nu los cuales fueron inoculados con 1x10⁷ células para garantizar el desarrollo tumoral en la mayoría de los animales. Posteriormente se controló diariamente el crecimiento tumoral y el bienestar general de los animales. El tamaño tumoral se calculó midiendo el diámetro menor (d) y el diámetro mayor (D) del tumor con un calibre automático, y utilizando la siguiente fórmula para

obtener el volumen en mm^3 : $V = D \times d^2 \times 0,52$ ⁴⁷. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente un volumen de 85 mm^3 , se realizaron los tratamientos con AH de BPM y DOX de forma intratumoral. A fin de reducir al máximo posible el número de animales utilizados, cumpliendo con el principio de las 3R en la utilización de animales de experimentación, se decidió utilizar una única concentración de DOX para cada tumor establecido, determinada por los resultados obtenidos *in vitro*. Después de cuatro días o al alcanzar un tamaño tumoral máximo de 500 mm^3 (punto final humanitario) los animales fueron sacrificados y se extrajeron los tumores formados (Figura 18).

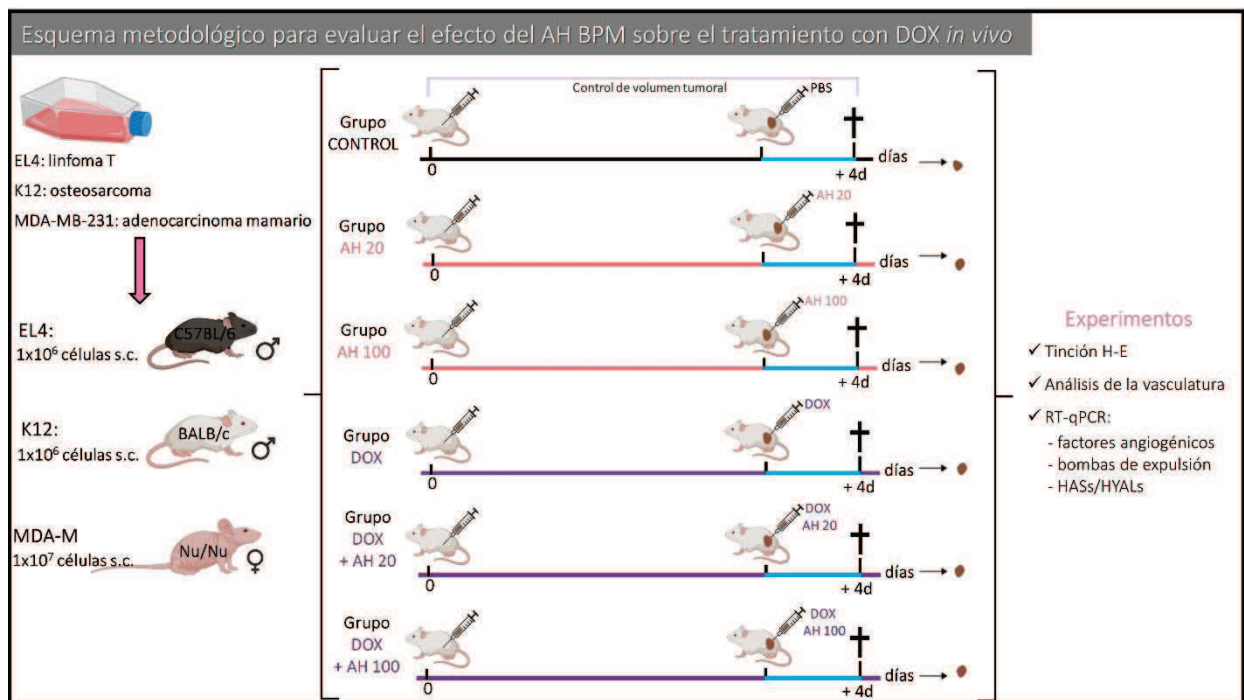


Figura 18. Diseño experimental para evaluar *in vivo* el efecto del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX. Brevemente, se inocularon las células tumorales (EL4, K12 o MDA-MB-231) subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Las cepas y cantidad de células a utilizar se determinaron según cada tipo celular. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente un volumen de 85 mm^3 , se realizaron los tratamientos con AH de BPM y DOX de forma local. Luego de 4 días, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se los procesó para luego realizar los experimentos indicados.

Se procesó una sección de cada uno para la realización de tinciones tisulares, para lo cual se fijaron en formalina al 4% y se incluyeron en parafina. Con un micrótopo se cortaron secciones de $3 \mu\text{m}$, las cuales se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol para luego realizar las tinciones que se explicarán en los siguientes ítems. Por otro lado, otra sección de los tumores obtenidos se colectó en TriReagent (Molecular Research Center, Inc.) para realizar análisis de PCR tal como se mencionará posteriormente.

3.12.1. Tinción con hematoxilina y eosina

Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) para el respectivo análisis histológico. Mediante esta tinción se observó la arquitectura general del tejido tumoral y las zonas necróticas ¹⁷².

3.12.2. Tinción con GSL-I para detección de células endoteliales

Los cortes histológicos obtenidos del ítem 3.2.12 se tiñeron con 20 µg/ml de lectina I proveniente de *Griffonia Simplicifolia* (Bandeiraea) marcada con fluoresceína (GSL-I, Vector Laboratories), la cual se une específicamente a células endoteliales murinas ¹⁷³, y con DAPI (0,3 µg/ml) para detectar los núcleos. Las micrografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.50b (NIH).

3.12.3. RT-qPCR

Los tumores obtenidos del ítem 3.2.12 recolectados en el reactivo TriReagent (Molecular Research Center, Inc.) fueron procesados para la extracción de ARN total. La cantidad de ARN obtenido y la integridad del mismo se evaluaron mediante espectrofotometría midiendo la densidad óptica a 260-280 nm en un instrumento Picodrop®. La síntesis de la cadena complementaria de ADN copia (ADNc) se realizó mediante PCR en transcriptasa reversa (RT-PCR) empleando un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con 200 U de transcriptasa reversa MMLV (Promega) y 2,5 pmol/µl de cebadores oligos dT (GenBiotech). Los ADNc se sometieron luego a PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando la estrategia de detección con SYBR Green y 200 nM de cada cebador específico (Invitrogen) para los ARNm de interés a detectar (*Tabla 2*). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 90 segundos a 94°C y luego 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Los niveles relativos de ARNm se expresaron como el "cambio de veces" en relación con el gen GAPDH. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se añadió correspondientemente un control sin plantilla (NTC) durante cada ensayo.

3.13. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se determinaron los intervalos de confianza (IC) del 95% mediante el cálculo de los valores de la media aritmética y la varianza (error estándar de la media o EEM) de tres experimentos realizados de forma independiente. La distribución normal de datos y la homogeneidad de la varianza se probaron en todos los casos. Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos fueron significativas, se utilizó la prueba T de Student en el caso de comparaciones entre dos grupos. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los valores de más de dos grupos experimentales. Se utilizó el software Prism (GraphPad), considerando un valor p como estadísticamente significativo: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. Es importante aclarar que cuando se coloca la significancia encima de cada barra corresponde a aquella en comparación con el control basal, mientras que la significancia entre los tratamientos se señala mediante líneas que van de barra a barra.

4. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA CUMPLIR EL TERCER OBJETIVO PROPUESTO

4.1. Análisis bibliográfico y bioinformático: datos de expresión de UGDH en TCGA y análisis de sobrevida

Para determinar en primera medida el rol de la enzima UGDH en cáncer, se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas para determinar los niveles de expresión de UGDH en distintos tipos de cáncer y su relación con la sobrevida de pacientes con cáncer de mama triple negativo (*Figura 19*). Para determinar los datos de expresión génica, se utilizó la sección The Pathology Atlas del Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org/)¹⁷⁴, utilizando los datos de expresión génica de The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://www.cancer.gov/tcga>). Los datos de RNA-seq en distintos tipos de cáncer se informan como la mediana del número de fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas. La distribución normal en el conjunto de datos se visualiza con diagramas de caja, que se muestran como la mediana y los percentiles 25 y 75.

Para evaluar el valor pronóstico de la UGDH y otros genes vinculados funcionalmente, se empleó la herramienta en línea kmplot.com¹⁷⁴, que permite un metanálisis de la

expresión génica en relación con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Los datos de expresión génica se obtuvieron a través del análisis de microarrays ampliamente utilizadas de la base de datos GEO y se convirtieron en diagramas de Kaplan-Meier ¹⁷⁵. Para distinguir entre expresión alta y baja, se seleccionó la mediana como valor de corte para reducir el impacto de los valores atípicos y producir números iguales en ambas categorías para mostrar solo correlaciones fuertes ¹⁷⁶ y se eliminaron muestras redundantes para mejorar la calidad de la muestra. Los pacientes fueron estratificados por estado de RE, PR y HER2, analizando solo pacientes que tenían tumores triple negativos y recibían algún tratamiento de quimioterapia (n = 181). Se analizó la expresión de UGDH, HASs, HYALs, factores pro-angiogénicos (VEGF, EGF, FGF-2), bombas ABC (ABCC1, ABCC2 y ABCG2) y marcadores de autofagia (ATG16L1 y LC3-II). La correlación con la supervivencia se visualizó dibujando diagramas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los ID de Affymetrix correspondientes son: 203342_at_UGDH; 207316_en_HAS1; 206432_en_HAS2; 223541_en_HAS3; 210619_en_HYAL1; 206855_en_HYAL2; 211728_en_HYAL3; 210512_en_VEGF; 204422_en_FGF-2; 206254_en_EGF; 209735_en_ABCG2; 202804_en_ABCC1; 205887_en_ABCC2; 232612_en_ATG16L1 y 208786_en_LC3-II. Los cocientes de riesgos instantáneos mostrados no están invertidos (HR < 1 favorable).

4.2. Silenciamiento del ARNm de UGDH y tratamiento con EPI

Con el fin de analizar el efecto de la modulación de la expresión de UGDH sobre el tratamiento con la antraciclina EPI y la síntesis de AH, se realizaron ensayos combinando el silenciamiento de UGDH con el posterior tratamiento con EPI. Para ello, las células de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 fueron colocadas en placas de 6 pocillos (1x10⁶) y se transfectaron con 50 nM de un ARN pequeño de interferencia (del inglés *small interference RNA* - siRNA) específico contra el ARNm de la enzima UGDH (siUGDH) o con un siRNA de control negativo de secuencia aleatoria (del inglés *scrambled RNA* – scr RNA) mediante electroporación usando el kit Nucleofector™ (Amaxa). Después de 24 horas de incubación, se añadió 1 µM de EPI (1 EPI) para completar 48 horas de incubación desde la transfección. Posteriormente, se colectaron los medios condicionados de cada tratamiento y se conservaron a -80°C hasta su uso y las células fueron colectadas teniendo en cuenta cada ensayo a realizar posteriormente (*Figura 19*). Es importante destacar que la concentración de EPI utilizada en los ensayos se

seleccionó teniendo en cuenta una concentración de droga menor a la requerida para disminuir la viabilidad del 50% de las células (IC50) y en base a los resultados obtenidos previamente para DOX.

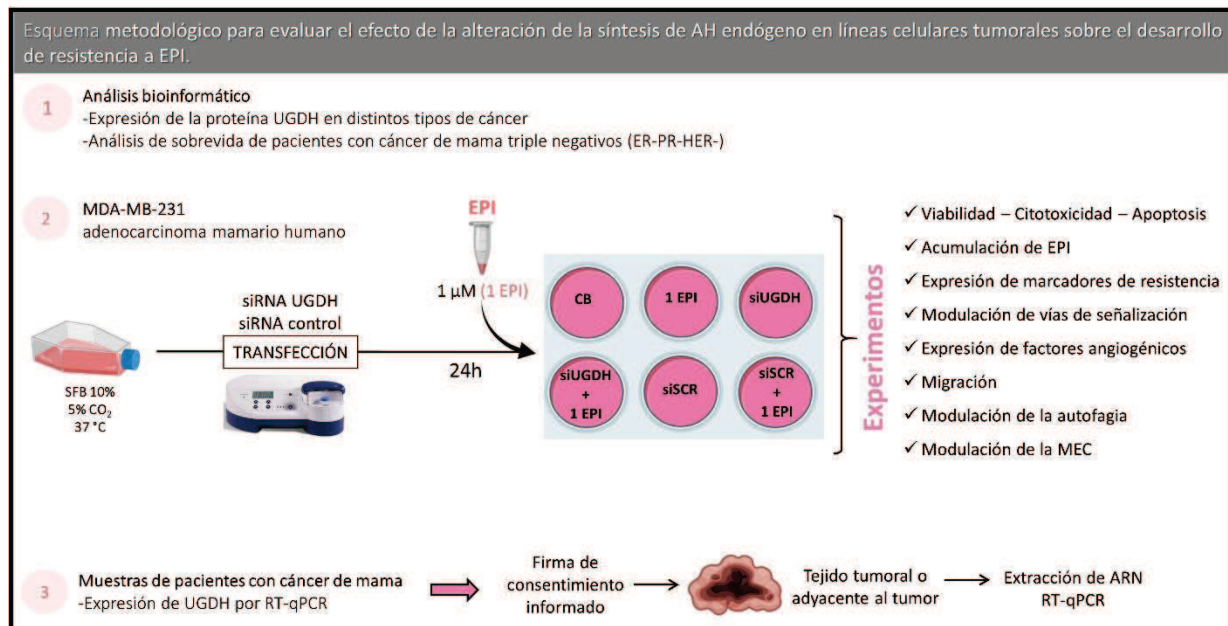


Figura 19. Esquema metodológico propuesto para evaluar el efecto de la alteración de la síntesis de AH sobre el desarrollo de resistencia a EPI. Flujo de trabajo llevado a cabo para estudiar el rol de la enzima UGDH en la progresión del cáncer de mama y la resistencia a EPI. Se realizó un análisis integral que incluye análisis bioinformático, experimentos in vitro con líneas celulares y el estudio de la expresión de UGDH en muestras de pacientes oncológicos.

4.3. Ensayo de viabilidad

Para evaluar la viabilidad celular una vez finalizada la transfección con el siRNA para UGDH y el tratamiento con EPI se utilizó la técnica MTT. Para ello, las células MDA-MB-231 (1×10^3) se colocaron en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Todas las muestras se trataron con el reactivo MTT y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

4.4. Ensayo de citotoxicidad

Después de la transfección y el tratamiento con EPI, se evaluó la citotoxicidad celular midiendo la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de las células dañadas utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad LDH (Abcam). La enzima LDH presente en los sobrenadantes celulares es capaz de oxidar el lactato a piruvato, que reacciona con una sal de tetrazolio (INT) para formar formazán, un compuesto coloreado

capaz de ser detectado. Los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 transfectadas y tratadas con EPI se analizaron siguiendo el protocolo del fabricante. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

4.5. Ensayo de detección de acumulación intracelular de antraciclinas

Tal como se mencionó previamente, es posible detectar la acumulación intracelular de las antraciclinas por citometría de flujo. Con el fin de evaluar si el silenciamiento de la enzima UGDH era capaz de modular el eflujo de EPI a través de la membrana de las células tumorales, se utilizaron 5×10^5 células MDA-MB-231 transfectadas y tratadas con EPI tal como se mencionó anteriormente a fin de determinar la acumulación intracelular de EPI ¹⁴⁴. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y los datos se evaluaron con el software FlowJo (LLC).

4.6. Ensayo de detección de apoptosis con Anexina-V

Para analizar si la transfección con el siRNA contra UGDH ejercía un efecto modulador sobre la acción de la EPI en las células tumorales MDA-MB-231, se utilizó el ensayo de detección de apoptosis basado en la utilización de anexina V-FITC (ImmunoTools). Para ello, las células MDA-MB-231 fueron tratadas como se mencionó anteriormente y se siguieron las instrucciones brindadas por el fabricante para realizar la marcación. Las muestras se procesaron con un citómetro de flujo FACS Canto II y los datos se evaluaron posteriormente con el software FlowJo (LLC).

4.7. Procesamiento de conjuntos de datos provenientes de microarrays

Para investigar la expresión de UGDH en diferentes modelos de cáncer de mama, decidimos utilizar conjuntos de datos de microarrays disponibles públicamente de cuatro líneas de células tumorales con diferentes estados de expresión de los receptores RE, RP y HER2. Se utilizó un conjunto de datos de microarrays disponible públicamente (GSE54326) para comparar los niveles de expresión diferencial de UGDH en células de cáncer de mama resistentes a antraciclinas y células control. Se utilizó la herramienta NCBI GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) para analizar los niveles de expresión de ARNm de UGDH.

4.8. RT-qPCR a partir de muestras celulares

Luego de la transfección con el siRNA para UGDH y el tratamiento con EPI, se extrajo el ARN total utilizando PureLink® RNA Mini Kit Life Technologies (Life Technologies). La cantidad de ARN obtenido y la integridad del mismo se evaluaron mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260-280 nm en un instrumento Picodrop®. La síntesis de la cadena complementaria de ADN copia (ADNc) se realizó mediante PCR en transcriptasa reversa (RT-PCR) empleando un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y 2,5 pmol/μl de cebadores oligo dT (GenBiotech). Los ADNc se sometieron luego a PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando la estrategia de detección con SYBR Green o sondas Taqman® según corresponda (*Tabla 2*). Los niveles relativos de ARNm se expresaron como el "cambio de veces" en relación con el gen GAPDH. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se añadió correspondientemente un control sin plantilla (NTC) durante cada ensayo.

4.9. Extractos de Proteínas y Western Blot

Para analizar la expresión de las proteínas citoplasmáticas, las células MDA-MB-231 (1×10^6) se transfectaron y se trataron con EPI como se describió anteriormente, para luego ser lisadas con un buffer de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH: 8, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0,5% y SDS 0,1%) durante toda la noche (ON) a 4°C. Después de una centrifugación a 12000 rpm durante 30 minutos, se conservaron los sobrenadantes y se midió la concentración de proteínas utilizando el ensayo de proteínas de Bradford. Los extractos proteicos se almacenaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente, se resolvieron cantidades iguales de proteína mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 10%-SDS al 0,1% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para las proteínas LC3, utilizamos un SDS-PAGE de tricina con gel de urea 6M de poliacrilamida al 16%¹⁷⁷. Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos anti-β-catenina, anti-p-Akt, anti-LC3-I, anti-LC3-II y anti-GAPDH ON a 4°C, y luego se incubaron con cada anticuerpo secundario específico durante 1,5 h a temperatura ambiente acoplado a peroxidasa. Finalmente, se detectó la reacción de quimioluminiscencia utilizando una solución estable de peróxido y luminol. Las imágenes se obtuvieron con un mini analizador de imágenes bioluminiscente

ImageQuant 4000 (GE HealthCare LifeSciences) y se analizaron con el paquete de software ImageJ 1.50b (NIH).

4.10. Ensayo de migración celular por cierre de herida

Tal como se mencionó previamente, el ensayo de cierre de herida permite analizar la capacidad de migración de células cultivadas en una monocapa estimuladas con distintos tratamientos. Para ello, una vez que las células MDA-MB-231 cumplieron el esquema de transfección y posterior tratamiento con EPI, se realizaron heridas en cada pocillo creando una línea de área libre de células ¹⁶⁸. Se capturaron tres imágenes en el mismo punto de coordenadas a las 0, 4, 8 y 22 horas después de realizar la herida para el posterior cálculo del área libre de células. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.50b (NIH).

4.11. ELISA

Los niveles de secreción de VEGF en los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 se determinaron mediante el kit comercial de ELISA DuoSet (R&D System) a partir de los medios de cultivo condicionados colectados. Los niveles de expresión de FGF-2 se determinaron mediante el kit ELISA DuoSet (R&D System) a partir de los extractos proteicos obtenidos. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

4.12. Ensayo de exclusión de partículas

Para analizar el efecto del silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI sobre los componentes de la MEC, se realizó un ensayo de exclusión de partículas utilizando glóbulos rojos ^{170,178}. Las células MDA-MB-231 (3×10^4) se colocaron en una placa de 12 pocillos y se transfectaron y trataron con EPI tal como se describió anteriormente. Cuando se completaron los tratamientos, se realizó un lavado con PBS y se agregaron glóbulos rojos fijados (2×10^7) a cada pocillo para dejarlos decantar en estufa durante 30 minutos. Durante cada ensayo se realizaron controles con enzima HYAL activa. Posteriormente, se tomaron varias micrografías de cada tratamiento y se analizaron utilizando el software ImageJ 1.50b (NIH) (*Figura 17*).

4.13. Ensayo tipo ELISA para la detección de AH soluble

Debido a que una fracción del AH sintetizado en la membrana plasmática puede ser secretado y no quedar anclado a la célula, se decidió evaluar la concentración de este GAG en los sobrenadantes de las células transfectadas con el siRNA para UGDH y posteriormente tratadas con EPI. El protocolo de detección utilizado fue descrito previamente en la sección 3.11.

4.14. Microscopía confocal para la localización subcelular de LC3

Las células MDA-MB-231 se sembraron en cubreobjetos y se co-transfectaron con siRNA contra UGDH (siUGDH) o siRNA de control negativo (siSCR) más 2 µg de EGFP-LC3 (# 11546, Addgene). 24 horas después de la transfección, las células tumorales se trataron con 1 µM de EPI como se describió anteriormente. Después del tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células se montaron en portaobjetos de vidrio y se fijaron en formaldehído al 4% durante 30 minutos. El experimento también se realizó tratando cada pocillo con cloroquina 20 µM como control negativo (un inhibidor de la autofagia). Se añadió cloroquina a las células junto con EPI. La localización subcelular de LC3 se analizó mediante microscopía confocal utilizando un instrumento Leica TCS SP5 (Leica) y se analizaron las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ 1.50b (NIH).

4.15. Obtención de muestras de pacientes oncológicos

Cuatro pacientes con cáncer de mama fueron seleccionados para el análisis (*Figura 19*). Se incluyeron en el estudio mujeres mayores de 18 años del Servicio de Cirugía del Hospital Interzonal General de Agudos “Abraham Piñeyro” (HIGA) y la Clínica Centro de la ciudad de Junín, Buenos Aires, Argentina. Los pacientes habían firmado previamente un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética del Hospital Austral, Provincia de Buenos Aires (17-006). Este trabajo se ha realizado siguiendo el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial. Las investigaciones se llevaron a cabo siguiendo las normas de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013. Se utilizaron dos tipos de muestras: tejido tumoral (TT) descartado en el momento de la cirugía y tejido no tumoral adyacente al tumor (NAT). Las muestras de tejido se recogieron en el quirófano y fueron evaluadas por un patólogo. Los pacientes seleccionados no recibieron previamente tratamiento antineoplásico para la enfermedad actual. Los pacientes con un estadio avanzado de cáncer o metástasis fueron excluidos de este estudio. Los pacientes

eran todos mujeres con una edad media de $61,50 \pm 6,6$ años. El diagnóstico histopatológico para todas las pacientes con cáncer de mama fue carcinoma invasivo de ningún tipo especial (NST). Los estadios TNM fueron determinados por un patólogo y el estado de marcadores específicos como PR, ER, HER2 y Ki67 se analizaron previamente en nuestro laboratorio ¹⁷⁹.

4.15.1. Extracción de ARN de tejidos y RT-qPCR

El ARN del tejido tumoral (TT) o del tejido no tumoral adyacente (NAT) se extrajo con el reactivo Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc.). Se realizó un tratamiento con ADNasa para degradar el ADN contaminante y posteriormente la transcripción inversa con cebadores oligo dT (Genbiotech) y transcriptasa reversa MMLV (Promega) para obtener ADNc. Teniendo en cuenta que el ARN se degrada fácilmente, para su conservación se utilizó una solución de conservación RNAhold previo a la extracción (TransGen Biotech Co). El rendimiento y calidad del ARN se determinó mediante Picodrop tal como se mencionó anteriormente. Para evaluar la expresión de UGDH, se amplificó el ADNc previamente preparado mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando SYBR Green y cebadores específicos de 200 nM (Invitrogen) (*Tabla 2*). Las condiciones de PCR fueron 90 s a 94°C y luego 40 ciclos de 30 s a 94°C y 30 s a 60°C. Los niveles relativos de ARNm se expresaron como el "cambio de veces" en relación con el gen GAPDH. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se añadió correspondientemente un control sin plantilla (NTC) durante cada ensayo.

4.16. Análisis *in silico* de interacción de proteínas

Se utilizó la herramienta STRING v11 (<http://string-db.org/>) para generar redes de interacción de proteínas *in silico* para los principales mediadores de los mecanismos estudiados: UGDH, UGT2B7, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2, HY-AL3, VEGF, EGF, PI3K, AKT, β -catenina, ABCC1, ABCC2, ABCG2, ATG16L1 y LC3-II. Todas las interacciones se predijeron con un umbral de confianza alto y se permitieron todos los métodos predictivos activos. Para el análisis de enriquecimiento, STRING implementa sistemas de clasificación bien conocidos como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ¹⁸⁰.

4.17. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se determinaron los intervalos de confianza (IC) del 95% mediante el cálculo de los valores de la media aritmética y la varianza (error estándar de la media o EEM) de tres experimentos realizados de forma independiente. La distribución normal de datos y la homogeneidad de la varianza se probaron en todos los casos. Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos fueron significativas, se utilizó la prueba T de Student en el caso de comparaciones entre dos grupos. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los valores de más de dos grupos experimentales. Se utilizó el software Prism (GraphPad), considerando un valor p como estadísticamente significativo: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. Es importante aclarar que cuando se coloca la significancia encima de cada barra corresponde a aquella en comparación con el control basal, mientras que la significancia entre los tratamientos se señala mediante líneas que van de barra a barra.

Tabla II. Secuencias de cebadores y sondas empleadas para la detección de ARNm por RT-qPCR

Gen a detectar (humano)	Cebador Fw	Cebador Rv
<i>UGDH</i>	5' GTG ACT GAG AAA AGC ACA GTT CC 3'	5' CAG AAA CTC AGG GTT GGA CAG 3'
<i>UGT2B7</i>	5' GGA GAA TTT CAT CAT GCA ACA GA 3'	5' CAG AAC TTT CTA GTT ATG TCA CCA AAT ATT G 3'
<i>ABCC1</i>	5' AAG TCG GGG CAT ATT CCT G 3'	5' TGA AGA CTG AAC TCC CTT CCT C 3'
<i>ABCC2</i>	5' AAA TCC AGG ACC AAG AGA TCC 3'	5' TGT GGC TTG TCC AGA GTC TTC 3'
<i>ABCG2</i>	5' GCT GCA AGG AAA GAT CCA AG 3'	5' CAG AGT GCC CAT CAC AAC ATC 3'
<i>VEGFA</i>	5' CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT 3'	5' GCA GTA GCT GCG CTG ATA GA 3'
<i>EGF</i>	5' TGA TAA GCG GCT GTT TTG G 3'	5' CAC CAA AAA GGG ACA TTG C 3'
<i>FGF2</i>	5' CCT GGC TAT GAA GGA AGA TGG 3'	5' TCG TTT CAG TGC CAC ATA CC 3'
<i>HYAL1</i>	5' GGC TAT GAG GAA ACT GAG TCA C 3'	5' TAG GAG TGC AAG GGC TGT AC 3'
<i>HYAL2</i>	5' ATC TCT ACC ATT GGC GAG AGT G 3'	5' ATC TTT GAG GTA CTG GCA GGT C 3'
<i>HYAL3</i>	5' TAT GTC CGC CTC ACA CAC C 3'	5' CTG CAC TCA CAC CAA TGG AC 3'
<i>LC3II</i>	5' AGC AGC ATC CAA CCA AAA TC 3'	5' CTG TGT CCG TTC ACC AAC AG 3'
<i>SDF1</i>	5' GAG AGC CAC ATC GCC AGA G 3'	5' TTT CGG GTC AAT GCA CAC TTG 3'
<i>CXCR4</i>	5' AGC ATG ACG GAC AAG TAC C 3'	5' GAT GAT ATG GAC AGC CTT ACA C 3'
<i>B-ACTINA</i>	5' AGAAAATCTGGCACCACACC 3'	5' TAGCACAGCCTGGATAGCAA 3'
<i>GAPDH</i>	5' GGG GCT GCC CAG AAC ATC AT 3'	5' GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG 3'
Gen a detectar (ratón)	Cebador Fw	Cebador Rv
<i>Vegfa</i>	5' GTG CAC TGG ACC CTG GCT TTA 3'	5' GGT CTC AAT CGG ACG GCA GTA 3'
<i>Sdf1</i>	5' GAG AGC CAC ATC GCC AGA G 3'	5' TTT CGG GTC AAT GCA CAC TTG 3'
<i>Cxcr4</i>	5' AGC ATG ACG GAC AAG TAC C 3'	5' GAT GAT ATG GAC AGC CTT ACA C 3'
<i>Abcc1</i>	5' CAT CCA GAT GAC ACA CCT CAA C 3'	5' AGC ACT CCC TGA CTT CTT TCC 3'
<i>Abcc2</i>	5' CTT TCC CAA ATC CTG GTT GG 3'	5' GGT CTT TCA CGA AGC CAA TG 3'
<i>Hyal2</i>	5' TTT GTC AGT TTC CGT GTT CG 3'	5' TCA CCG ATG GTA GAG ATA AGG TC 3'
<i>Has2</i>	5' ATG GGG TGG AAA GAG AGA AG 3'	5' AGG CAG GGT CAA GCA TAG TAT C 3'
<i>GAPDH</i>	5' GGG GCT GCC CAG AAC ATC AT 3'	5' GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG 3'
Sondas Taqman® (humano)		
<i>UGDH</i>	Hs00163365_m1 (Applied Biosystems)	
<i>HAS2</i>	Hs00193435_m1 (Applied Biosystems)	
<i>HAS3</i>	Hs00193436_m1 (Applied Biosystems)	



RESULTADOS

SECCIÓN 1: EFECTO DEL AH de BPM SOBRE LA RESPUESTA A DOX Y LA RESISTENCIA A DROGAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

1.1. Efecto del AH exógeno de BPM en líneas celulares tumorales de diferente etiología sobre la respuesta a DOX

1.1.1. Análisis de expresión de CD44 y capacidad de unión a AH

Inicialmente para evaluar si las tres líneas celulares utilizadas como modelos de estudio, EL4 (linfoma T murino), K12 (osteosarcoma murino) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamario humana) presentaban la capacidad de responder al tratamiento con AH de BPM, y por la falta de antecedentes, hemos decidido analizar la capacidad de unión al AH y la expresión de su principal receptor CD44 en estas líneas celulares tumorales como punto de partida para nuestro estudio. Al observar en conjunto los resultados obtenidos a través del análisis de citometría de flujo, pudimos determinar que todas las líneas celulares mostraron elevados niveles de expresión de CD44, presentado un alto porcentaje de células positivas. Sin embargo, las tres líneas celulares utilizadas no mostraron la misma capacidad de unir AH mediante la técnica empleada para tal análisis.

En el caso de la línea celular EL4 de linfoma T, se hallaron dos poblaciones con diferente intensidad media de fluorescencia o MFI (*del inglés mean fluorescence intensity*) para la expresión de CD44, lo que indica que dichas poblaciones celulares presentan diferente grado de intensidad de expresión de este receptor. Se observó una población mayoritaria con alta expresión de CD44 (CD44^{alta}, MFI: 641) y una pequeña población con menor expresión de este receptor (CD44^{baja}, MFI: 219) (*Figura 20A*). De forma similar, la línea celular K12 de osteosarcoma presentó dos poblaciones bien diferenciadas en la intensidad de expresión de CD44 (CD44^{alta}, MFI: 12500 y CD44^{baja}, MFI: 1347) (*Figura 20C*). Finalmente, si bien existen numerosos antecedentes que han estudiado la expresión de CD44 y la capacidad de unión a AH en la línea celular MDA-MB-231¹⁸¹, nuestros resultados han demostrado que el 98,9% de las células expresan CD44, observándose una única población homogénea con alta intensidad de expresión de CD44 (CD44^{alta}, MFI: 41800) (*Figura 20E*).

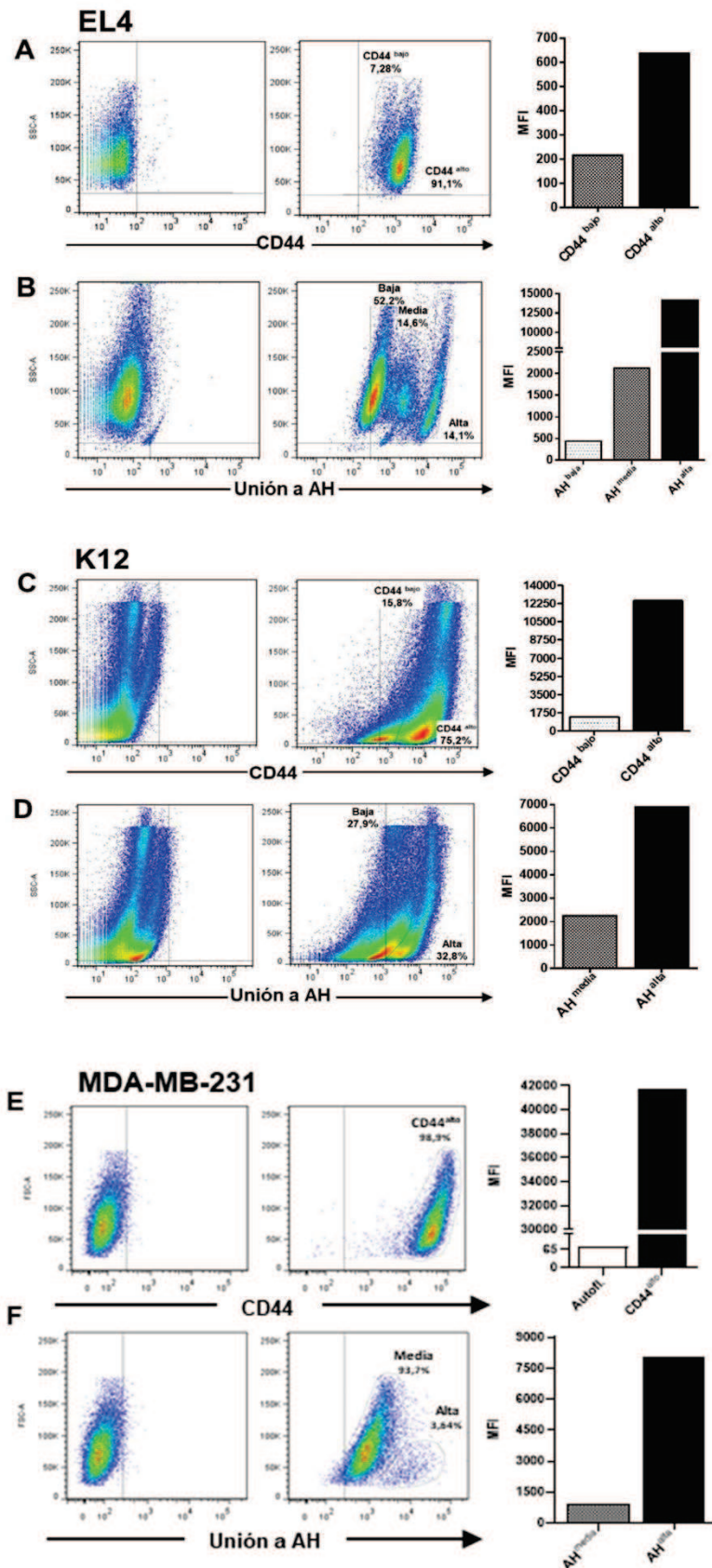


Figura 20. Análisis de la expresión de CD44 y la capacidad de unión a AH en líneas celulares EL4, K12 y MDA-MB-231. Los gráficos de puntos muestran frecuencias de líneas EL4 (A), K12 (C) y MDA-MB-231 (E) que expresan CD44 en la membrana plasmática y la capacidad de unión a AH (B), (D) y (F). Las barras muestran la intensidad de fluorescencia media (*del inglés Mean Fluorescent Intensity o MFI*) de las distintas poblaciones con niveles diferenciales de expresión de CD44 en la membrana plasmática celular y la capacidad de unión a AH. Los gráficos de puntos muestran el experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente.

Además, dado que la simple expresión de CD44 no implica capacidad de unión del AH a este receptor, se determinó la capacidad de unión a AH utilizando este GAG acoplado al fluoróforo FITC. En la línea celular EL4 hallamos tres poblaciones celulares que se unieron al AH fluorescente con diferentes niveles de MFI (AH^{alta}, MFI: 14300; AH^{media}, MFI: 2144 y AH^{baja}, MFI: 460) (*Figura 20B*). Por su lado, la línea celular K12 también demostró que es capaz de unir AH de forma diferenciada en dos poblaciones nuevamente (AH^{media}, MFI: 2144 y AH^{alta}, MFI: 6941) (*Figura 20D*). Finalmente, la línea celular MDA-MB-231 mostró una gran capacidad de unión a AH, donde también pudieron distinguirse dos poblaciones celulares con distinta MFI (AH^{media}, MFI: 972 y AH^{alta}, MFI: 8027) (*Figura 20F*). Estos resultados en conjunto nos indican que en el estudio de esta molécula no es posible considerar las líneas celulares como modelos de estudio homogéneos, es importante tener en consideración que puede existir distinto grado de heterogeneidad dentro de cada una de ellas, lo que podría estar afectando a los resultados posteriormente obtenidos cuando se evaluó la respuesta biológica-funcional al AH.

1.1.2. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la acumulación de DOX, la expresión de transportadores ABC y la muerte celular

Trabajos previos han demostrado la capacidad de ciertos componentes de la MEC, tales como el AH, de modular la resistencia a drogas ampliamente utilizadas en la terapia antitumoral, como la vincristina y DOX. Los estudios se han enfocado mayoritariamente en la comparación entre diversos modelos tumorales resistentes y sensibles a dichas drogas, evaluando los mecanismos implicados en la regulación de muerte celular y en la regulación de la expresión de genes de la familia MDR-1, que codifican los transportadores proteicos responsables de la expulsión de las drogas desde el interior celular, disminuyendo la concentración intracelular y por lo tanto su citotoxicidad^{144,182,183}. Tomando estos datos previos como punto de partida, y continuando con el análisis de mecanismos que favorecen el desarrollo tumoral, se decidió estudiar el potencial efecto del AH de BPM exógeno como modulador del eflujo de DOX y de la capacidad de inducir apoptosis en las distintas líneas celulares tumorales.

Si bien cada tipo tumoral se suele asociar a un tratamiento farmacológico específico, se decidió utilizar el fármaco antineoplásico DOX ya que se emplea para tratar un amplio espectro de tumores sólidos (adenocarcinoma de mama, osteosarcoma, carcinoma de

pulmón y neuroblastoma) así como neoplasias malignas hematológicas (linfomas y leucemias agudas) ¹⁸⁴. Más aún, como la DOX es capaz de emitir fluorescencia detectable a través de citometría de flujo, se pudo determinar la acumulación de la misma en el interior celular. Para ello las tres líneas tumorales seleccionadas fueron tratadas con diferentes dosis de DOX (0,5D: 0,5 μM ; 1D: 1 μM ; 2,5D: 2.5 μM) en combinación con distintas concentraciones de AH de BPM (AH 20: 20 $\mu\text{g/ml}$ y AH 100: 100 $\mu\text{g/ml}$), como se explicó detalladamente en la sección de materiales y métodos. Además, durante el mismo ensayo se analizó en conjunto el nivel de apoptosis inducida por el tratamiento de DOX en combinación con el AH de BPM. Las dosis de DOX finalmente utilizadas en los ensayos funcionales se seleccionaron considerando valores inferiores al IC_{50} para cada línea celular ($\text{IC}_{50_{\text{EL4}}}$: 2,4 μM ; $\text{IC}_{50_{\text{K12}}}$: 6,8 μM ; $\text{IC}_{50_{\text{MDA-MB-231}}}$: 4,9 μM) a fin de evitar posibles efectos de altos niveles de muerte celular por un exceso de DOX (Figura 21).

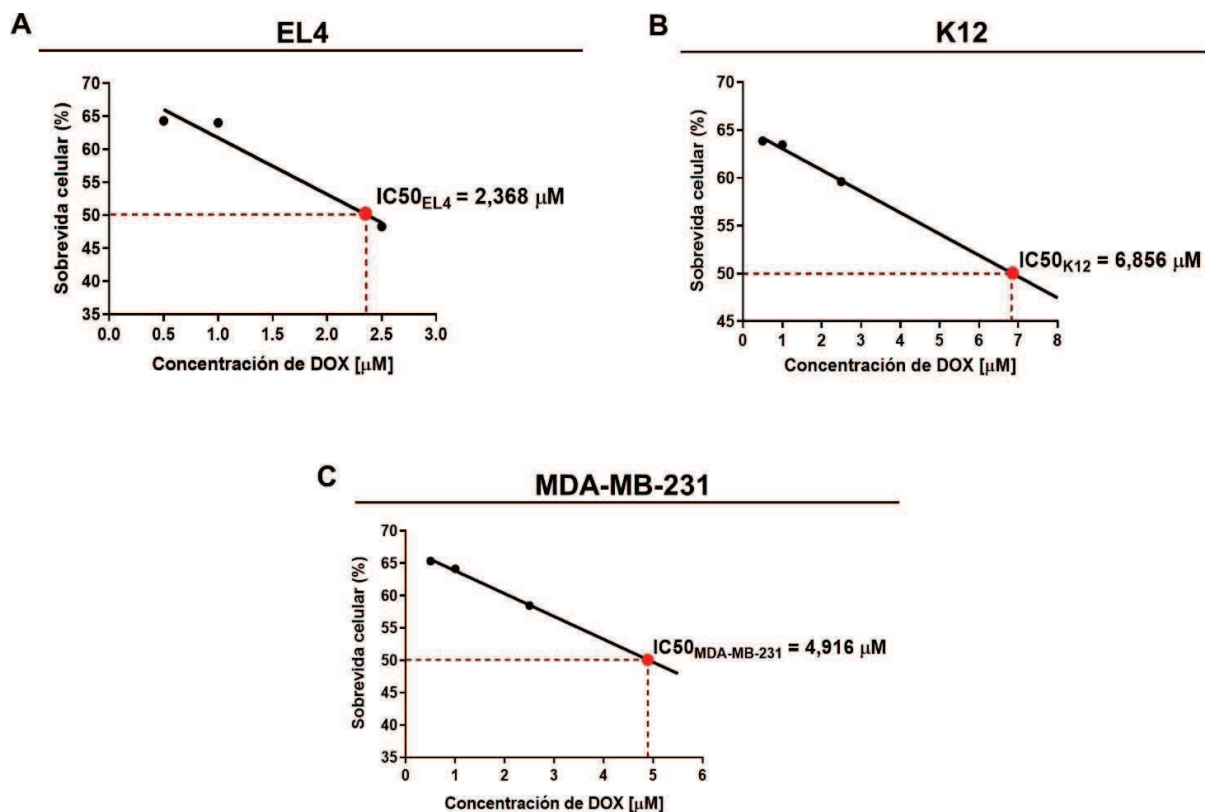


Figura 21. Cálculo de la concentración de doxorubicina (DOX) inhibitoria del 50% de la sobrevivida celular (IC_{50}). Para determinar las dosis de DOX a utilizar en los ensayos posteriores, se determinó el valor IC_{50} para cada línea celular estudiada. Para ello, las células EL4 (A), K12 (B) y MDA-MB-231 (C) fueron tratadas con dosis crecientes de DOX por 12 horas y posteriormente se realizó un ensayo tipo MTS para determinar la viabilidad celular. El valor IC_{50} para DOX se calculó interpolando el dato necesario para disminuir en un 50% la viabilidad celular.

En la línea celular EL4 observamos una reducción significativa de los niveles intracelulares de DOX sólo cuando el tratamiento con 1D se combinó con el tratamiento con AH 100, respecto del tratamiento que contenía DOX únicamente ($*p<0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la acumulación de DOX en las células K12 ni MDA-MB-231 (Figura 22A). Por último, el tratamiento con 2,5D mostró ser una concentración saturante de la intensidad de fluorescencia, ya que alrededor del 100% de la población celular de cada línea tumoral resultó ser positiva para DOX y se dificultaría observar algún efecto mediado por el AH de BPM. Por lo tanto, para los experimentos a futuro se decidió no continuar utilizando esta dosis. De acuerdo con los resultados anteriores, no hallamos diferencias significativas en la apoptosis inducida por DOX después de combinar el tratamiento con AH de BPM en ninguna de las líneas celulares (Figura 22B), al menos en las condiciones experimentales establecidas.

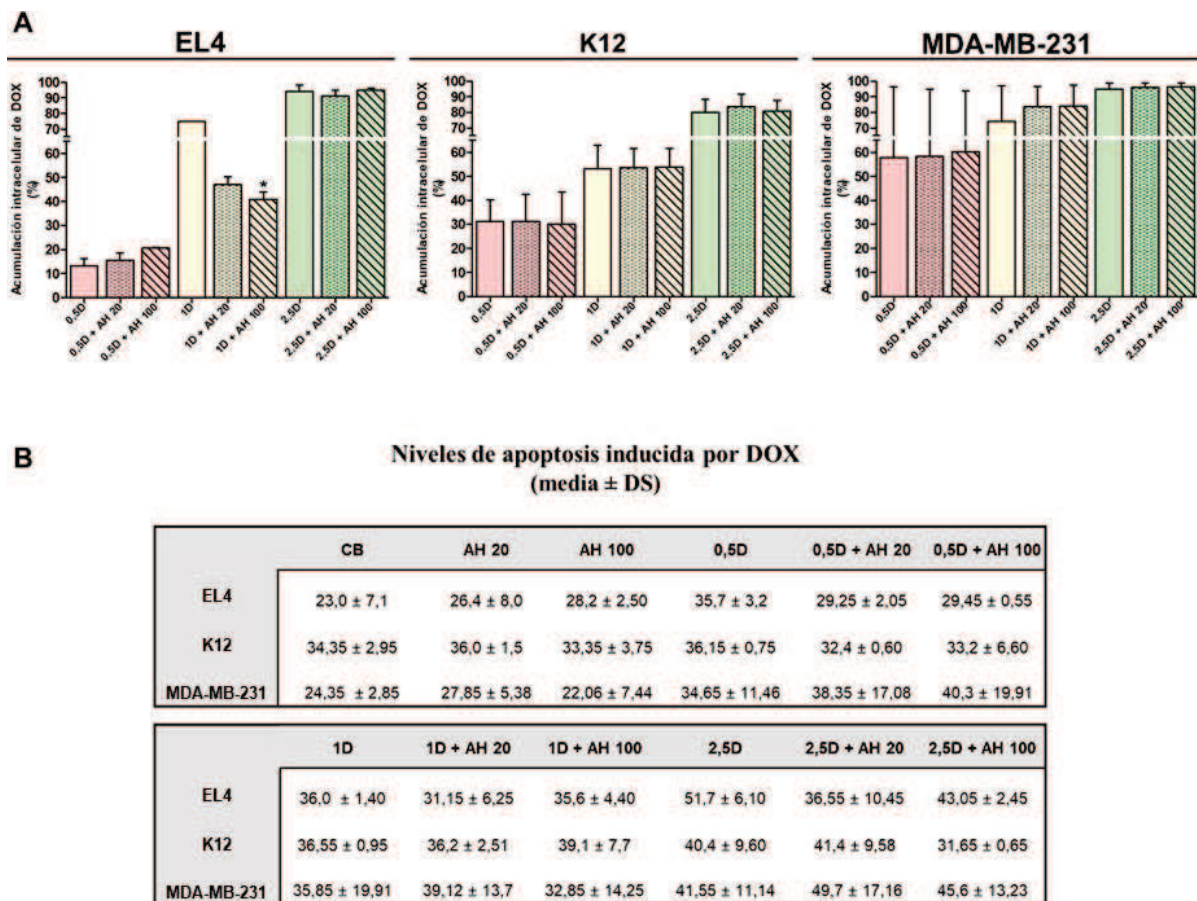


Figura 22. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la muerte celular. Análisis de citometría de flujo para la acumulación de doxorubicina (DOX) (A) y apoptosis (B) evaluado en las líneas EL4, K12 y MDA-MB-231. Las células se incubaron con 0,5; 1 y 2,5 μ M de DOX (0,5D, 1D y 2,5D) o en combinación con 20 o 100 μ g/ml de AH de BPM (AH 20 y AH 100). Los niveles de acumulación de DOX se detectaron midiendo la fluorescencia emitida a través del detector FL2 del citómetro de flujo. Para medir los niveles de apoptosis inducida post-tratamiento, las células fueron incubadas con anexinaV-FITC y analizadas también mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como las medias aritméticas \pm el error estándar de la media (EEM) evaluados en tres experimentos independientes. * $p<0,05$.

Debido a que no hallamos una modulación en la respuesta a DOX por parte del AH de BPM en las células de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 cultivadas en monocapa, se decidió utilizar una estrategia de crecimiento tridimensional en tumorosferas en donde se tienen en cuenta otros factores que pudieran afectar la respuesta a la droga. Si bien las células MDA-MB-231 presentan el mismo tipo de crecimiento en monocapa que las células K12 de osteosarcoma murino, a estas últimas no se las consideró para realizar este tipo de ensayos. Esto se debe a que hasta el momento solo hemos obtenido muestras de tejido tumoral de pacientes de cáncer de mama, con las cuales se podrían realizar comparaciones con el modelo *in vitro*, hecho que no podríamos tener en cuenta al tratarse del estudio de osteosarcoma.

Este tipo de ensayo permite determinar las estrechas relaciones entre la MEC y las células tumorales, simulando un entorno tridimensional que mimetiza el contexto tisular donde se desarrolla la enfermedad. Para ello, las células MDA-MB-231 se trataron con 0,5D y sus combinaciones con AH de BPM y se cultivaron para formar tumorosferas. Una vez finalizado el experimento, se analizó el crecimiento de las tumorosferas calculando su volumen y se analizó la acumulación de DOX y la inducción de apoptosis por citometría de flujo. Al determinar el volumen de los esferoides formados, no observamos diferencias significativas bajo ninguna de las dos dosis de AH de BPM con las cuales se trataron a las células. Sin embargo, como era esperable, bajo el tratamiento con la droga DOX (con o sin el agregado de AH de BPM) se observó una reducción significativa del volumen de las tumorosferas ($*p < 0,05$) (Figura 23A y 23B), lo que indicaría en primera medida que el tratamiento con DOX afectó la capacidad de formación de tumorosferas y el crecimiento de las mismas.

Por otro lado, al evaluar el porcentaje total de células que acumularon DOX en su interior bajo el tratamiento con AH de BPM no hallamos diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento solo con DOX, efecto que también se observó al estudiar los niveles de apoptosis inducida en esas mismas condiciones (Figura 23D y 23E). Sin embargo, se pudo determinar un aumento en la tendencia de los niveles de apoptosis que permiten suponer que podría haber cierta modulación de este proceso no detectada en las condiciones del ensayo. No obstante, el comportamiento de las células tumorales tratadas con 0,5D fue diferencial a las células no tratadas, debido a que se observó la presencia de dos poblaciones bien diferenciadas respecto a la acumulación de DOX (Figura 23C).

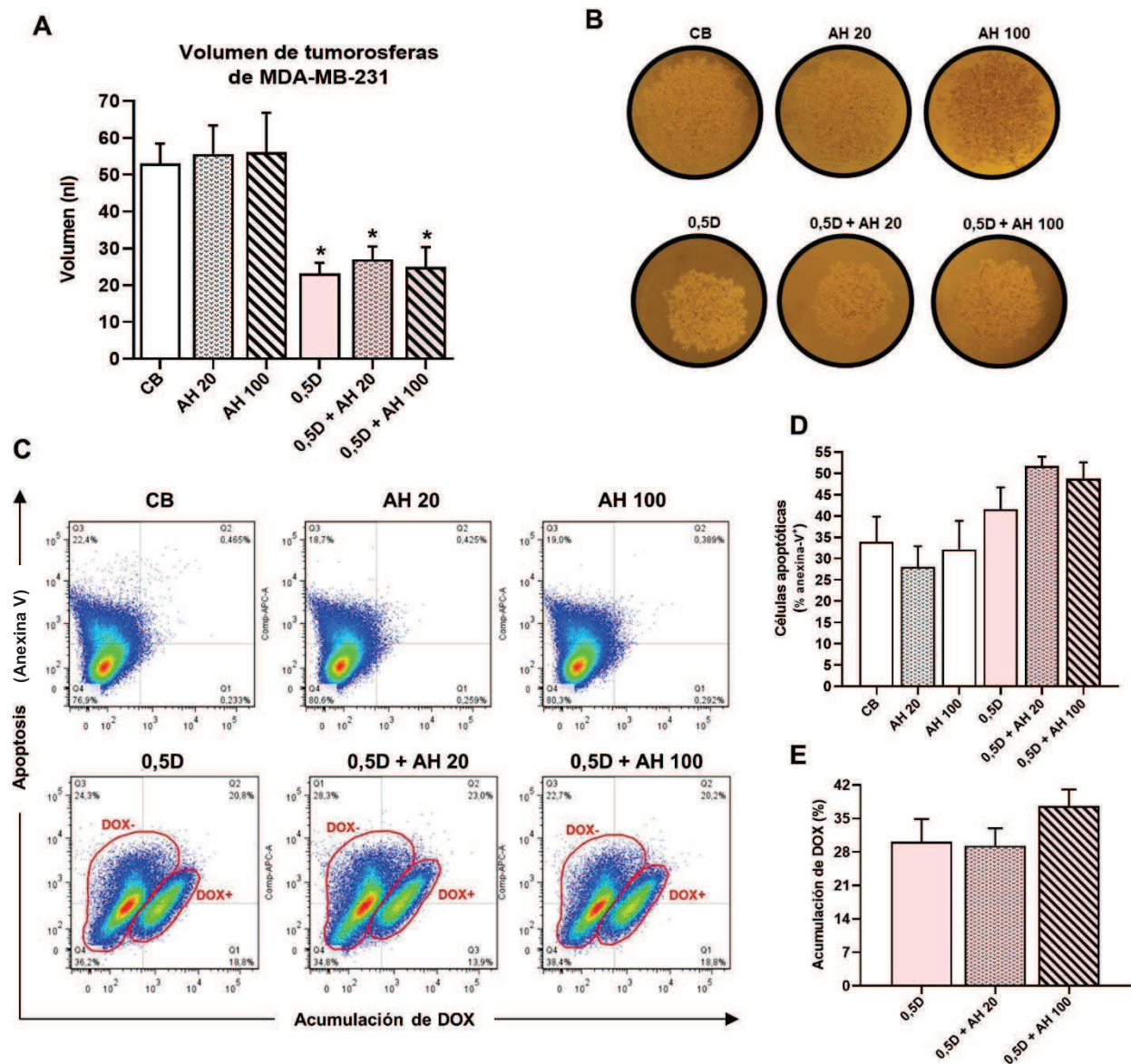


Figura 23. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la muerte celular en un modelo tridimensional de cultivo celular de células MDA-MB-231. Las células tumorales MDA-MB-231 se cultivaron para formar tumosferas tridimensionales sin tratamiento (Control Basal CB) y se incubaron con 0,5 μ M de DOX (0,5D) o en combinación con 20 o 100 μ g/ml de AH de BPM (AH 20 y AH 100 respectivamente). Luego de 8 días de cultivo se tomaron diferentes micrografías de los esferoides obtenidos y se calculó el volumen (A). Los niveles de acumulación intracelular de DOX y la apoptosis inducida (anexina-V) se detectaron mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como las medias aritméticas \pm el error estándar de la media (EEM) evaluados en tres experimentos independientes. * $p < 0,05$. Los gráficos de puntos muestran el experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente.

Una población celular se caracterizó por presentar mayor MFI para DOX respecto de la otra (población DOX+ MFI: 1337 vs. población DOX- MFI: 229) (Figura 1 - Anexo), lo que indicaría una mayor acumulación de la droga en el interior de dichas células, mientras que la otra población se mantuvo negativa para dicho parámetro. Este hecho se mantuvo aún con el tratamiento combinado de AH de BPM + DOX, lo que determinaría la existencia de poblaciones celulares con capacidad diferencial para acumular DOX.

Sorprendentemente, dichas poblaciones presentaron valores similares de MFI para la inducción de apoptosis, lo que nos indicaría que, si bien existen células con mayor capacidad de acumular DOX que otras, esas mismas células no están activando el proceso de apoptosis en dichas condiciones, hecho que podría haber afectado al resultado del porcentaje total de células apoptóticas.

Debido a que únicamente observamos diferencias significativas en la acumulación de DOX luego del tratamiento con AH de BPM y DOX en la línea EL4, decidimos continuar analizando en este modelo tumoral la expresión de ciertos transportadores ABC específicamente involucrados en la expulsión de DOX desde el interior celular. Al analizar los niveles de expresión de la bomba ABCG2 durante el tratamiento conjunto con DOX y AH de BPM, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de dicho transportador (*Figura 24B*). Sin embargo, cuando se estudió la expresión de la bomba ABCB1 en las mismas células, la adición de AH 100 al tratamiento con 1D incrementó la expresión del ARNm con respecto al tratamiento con DOX sola (1D vs. 1D + AH 100, * $p < 0,05$) (*Figura 24A*). A su vez, confirmamos la presencia de bombas de expulsión de drogas funcionales utilizando el inhibidor específico ciclosporina A (CsA) (*Figura 24C*). Estos datos concuerdan con la disminución de la acumulación intracelular de DOX observada en las células EL4 en esta condición. Estos resultados en conjunto, nos indican que el AH de BPM no desempeñaría una función moduladora sobre la acumulación de DOX y la inducción de apoptosis en líneas celulares derivadas de tumores sólidos, tales como osteosarcoma y cáncer de mama en las condiciones de ensayo utilizadas. Sin embargo, un aumento en la presencia de AH de BPM en el microambiente tumoral de tumores malignos hematopoyéticos, podría afectar la disponibilidad intracelular de DOX mediante la inducción de la expresión de bombas de expulsión que favorecen la eliminación de la droga previo a que esta pueda ejercer su efecto.

1.1.3. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la modulación de la proliferación celular y vías de señalización moduladas por AH

Durante la tumorigénesis y el desarrollo de resistencia a drogas es crucial la activación exacerbada de diferentes vías de señalización celulares implicadas en la supervivencia y la proliferación celular, dentro de las cuales se encuentran las vías Wnt y PI3K/Akt. Por tal motivo, decidimos analizar la expresión proteica de β -catenina y p-Akt, ambas

moduladores positivos de dichas vías, en las condiciones de tratamiento combinado con AH de BPM y DOX.

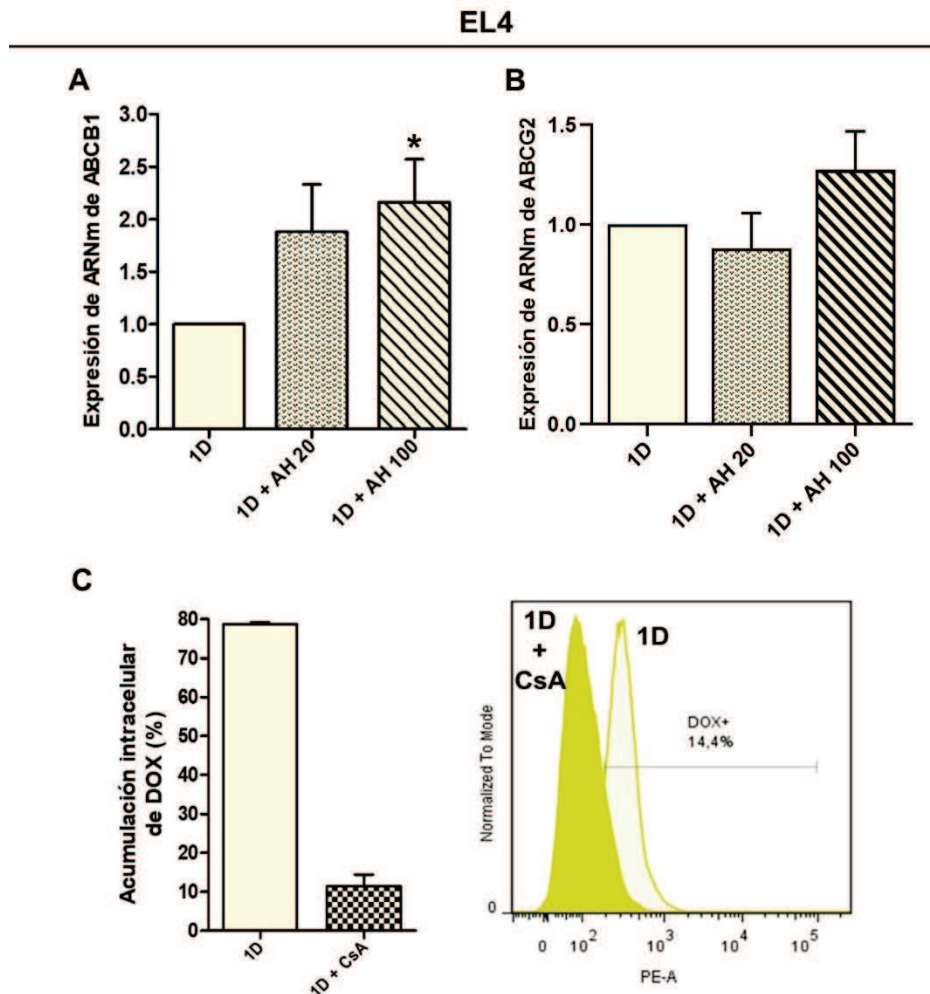


Figura 24. Efecto del AH de BPM sobre la expresión y funcionalidad de bombas de expulsión dependientes de ATP (ABC) implicadas en la expulsión de DOX. Las células EL4 se incubaron con 1D o en combinación con AH 20 y AH 100. Luego los ADNc se sometieron a PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando la estrategia SYBR Green. Los resultados se normalizaron utilizando GAPDH como gen de referencia y todas las determinaciones se realizaron como duplicados en tres experimentos independientes (A y B). Análisis de citometría de flujo para la acumulación de doxorubicina (DOX) evaluado en presencia del inhibidor específico de bombas de expulsión ABC ciclosporina A (CsA) (C). Los niveles de acumulación intracelular se detectaron midiendo la fluorescencia emitida a través del detector específico FL2 del citómetro de flujo empleado. Los valores se expresan como las medias aritméticas \pm el error estándar de la media (EEM) evaluados en tres experimentos independientes.

En la línea celular EL4 de linfoma T, observamos un incremento de la expresión de β -catenina como resultado del tratamiento con ambas concentraciones de AH de BPM en ausencia de DOX, lo cual confirma el conocido rol del AH de BPM como molécula estimuladora de la progresión tumoral. En particular, encontramos diferencias significativas en la expresión de β -catenina cuando las células EL4 fueron tratadas con AH de BPM 20 respecto a las condiciones basales (CB $*p < 0,05$). En adición a lo mencionado anteriormente, el AH de BPM demostró ser capaz de modular la expresión

de dicha proteína aún en presencia de DOX, específicamente, al combinar 100 µg/ml de AH de BPM con el tratamiento de 1D (1D + AH 100, $*p < 0,05$) (Figura 25A). Al analizar el efecto del AH de BPM *per se* sobre la expresión de β -catenina en las células K12, no observamos ninguna diferencia significativa. Sin embargo, la expresión de β -catenina aumentó cuando las células K12 se trataron conjuntamente con 0,5D y AH 100, en comparación con el tratamiento con 0,5D ($**p < 0,01$). De la misma forma, el tratamiento con 1D también favoreció el incremento de la expresión de β -catenina, pero la adición de AH de BPM no mostró cambios significativos (Figura 25A). Por último, en el caso de la línea MDA-MB-231, los tratamientos con AH 20 y AH 100 (en ausencia de DOX) aumentaron significativamente la expresión de β -catenina ($*p < 0,05$). Asimismo, la expresión de β -catenina fue significativamente mayor luego de tratar a las células con 0,5D y AH 20 ($*p < 0,05$) (Figura 25A).

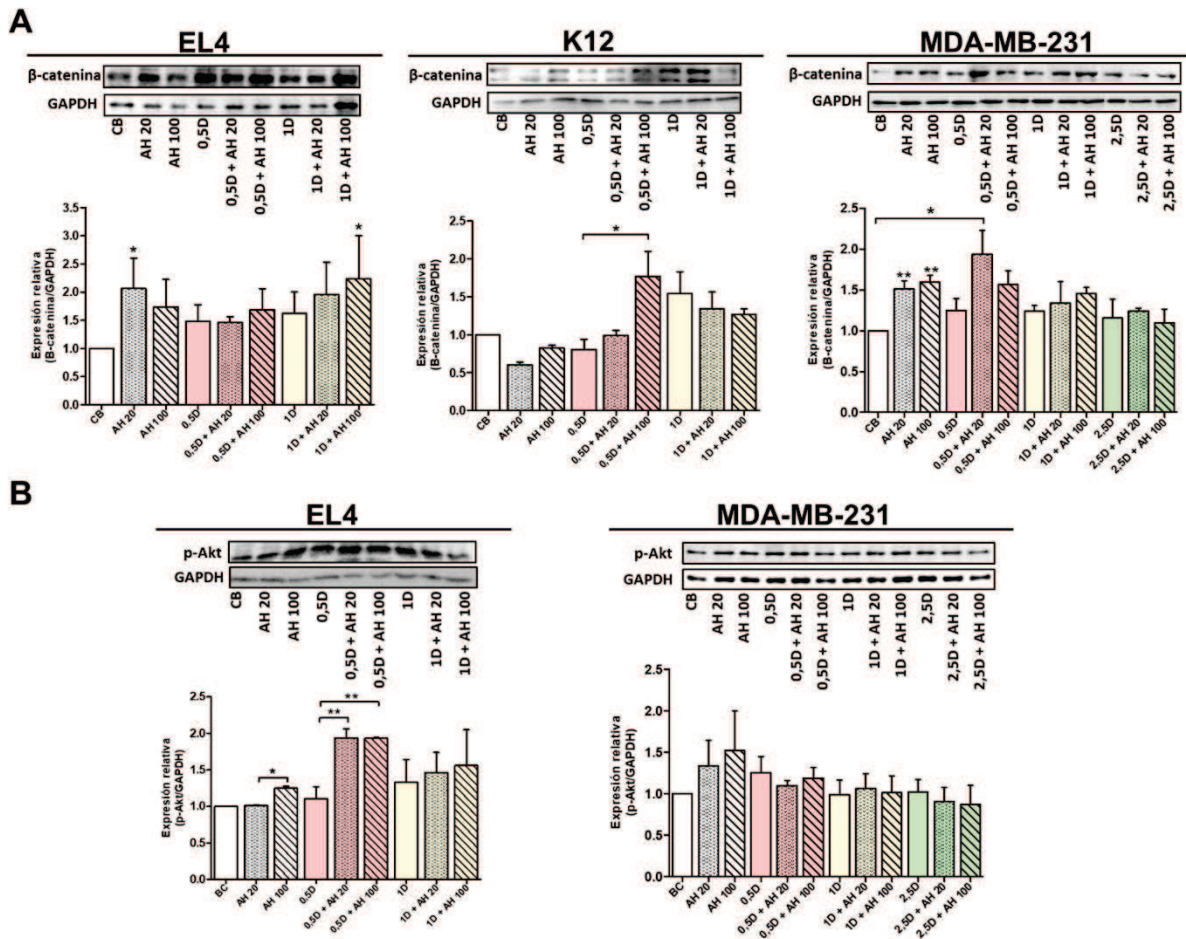


Figura 25. Efecto del AH de BPM y el tratamiento con DOX sobre la modulación de la expresión de β -catenina y p-Akt. La expresión de las proteínas β -catenina (A) y p-Akt (B) se evaluó en las líneas celulares tumorales EL4, K12 y MDA-MB-231 mediante Western blot. Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de células no tratadas (control basal: CB) o tratadas con AH de BPM, DOX o la combinación AH de BPM + DOX. Los resultados obtenidos se relativizaron a la expresión de la proteína GAPDH como control de carga. Se realizó un análisis de densitometría de las bandas obtenidas en el Western blot y los resultados se expresan como las medias aritméticas \pm EEM de unidades arbitrarias obtenidas en tres experimentos independientes. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Numerosos antecedentes han demostrado que el AH produce la activación de la vía PI3K/Akt por fosforilación específica del mediador Akt en varias líneas de células tumorales. Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de una modulación de dicha vía aún bajo el tratamiento con drogas antitumorales. Por eso, decidimos evaluar la expresión de la proteína Akt en su forma fosforilada: (p-Akt) en las tres líneas celulares estudiadas, ya que su activación desempeña una función sumamente importante en la respuesta a la quimioterapia ¹⁸⁵.

Tal como se esperaba, el tratamiento con AH 100 aumentó significativamente la expresión de p-Akt en ausencia de DOX en la línea celular EL4 de linfoma T (AH 100 vs. CB, * $p < 0,05$). Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles de p-Akt cuando las células fueron tratadas con DOX (0,5D y 1D). No obstante, cuando el tratamiento con 0,5D se combinó con el AH de BPM, hallamos un incremento significativo en la expresión de p-Akt en comparación con el tratamiento con 0,5D (0,5D vs. 0,5D + AH 20, ** $p < 0,01$ y 0,5D vs. 0,5D + AH100, ** $p < 0,01$). Resultados similares se observaron con el tratamiento con 1D en combinación con ambas concentraciones de AH de BPM, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (*Figura 25B*). En el caso de la línea celular K12, no se observamos niveles detectables de p-Akt en las condiciones experimentales utilizadas significativas (*Figura 25B*). Finalmente, cuando analizamos la expresión de p-Akt en las células MDA-MB-231, se observó un ligero aumento en la expresión de p-Akt en respuesta al tratamiento con AH 20 y AH 100 respecto a las condiciones basales (CB). Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de p-Akt durante el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX significativas (*Figura 25B*) ($p > 0,05$). En conjunto, estos resultados demostraron que el AH de BPM es capaz de modular la expresión de β -catenina y p-Akt en las líneas tumorales EL4 y MDA-MB-231, activando en consecuencia, dos vías de señalización cruciales durante el tratamiento con DOX en los distintos modelos tumorales estudiados.

1.1.4. Modulación del comportamiento de células endoteliales en respuesta al tratamiento con AH de BPM y DOX

Generalmente, el tratamiento con DOX es eficaz para inducir la muerte de las células tumorales. Sin embargo, el MAT y los componentes de la MEC pueden generar distintas respuestas que alteren su acción, como por ejemplo, la modulación del comportamiento de células endoteliales (CEs) y, consecuentemente la angiogénesis tumoral ^{186,187}. Con

el objetivo de evaluar si el tratamiento con AH de BPM y DOX era capaz de afectar la capacidad angiogénica de las células tumorales, se realizaron diferentes ensayos sobre CEs estimuladas con los medios condicionados provenientes de las tres líneas celulares tumorales tratadas con AH de BPM y DOX y de las células tumorales sin tratar (CB). Específicamente, se realizaron ensayos de cierre de herida y de formación de tubos utilizando la línea celular HMEC-1 las cuales fueron estimuladas con los sobrenadantes de las células tumorales tratadas con DOX y AH de BPM.

Al realizar el ensayo de cierre de herida utilizando los medios condicionados de las células de linfoma T (EL4), observamos que los provenientes del tratamiento con AH 20 indujeron un aumento significativo en la migración de las CEs en comparación con las condiciones basales de las células tumorales sin tratar (CB), evidenciado por una reducción en el área libre de células (AH 20 vs. CB, $*p < 0,05$). Cuando las CEs fueron estimuladas con los sobrenadantes derivados de los tratamientos con DOX, los niveles de migración fueron similares a los del control basal (CB), lo que sugiere que la DOX *per se* no modula la respuesta angiogénica en las células EL4. Sin embargo, se observó una disminución en la capacidad de migración de las CEs bajo el estímulo con el sobrenadante que provenía de las células EL4 tratadas con 1D + AH 100 en comparación con el tratamiento con AH de BPM solo (AH 100 vs. 1D + AH 100, $*p < 0,05$) (*Figura 26A*). Para confirmar estos resultados, realizamos un ensayo de formación de tubos estimulando a las CEs con las mismas condiciones que fueron utilizadas para el ensayo de cierre de herida. El tratamiento con AH de BPM (AH 20 y AH 100) no mostró tener un potencial efecto pro-angiogénico sobre las células tumorales EL4 (*Figura 27A*). Por otro lado, el tratamiento con DOX y su combinación con el AH de BPM tampoco mostró un aumento en la formación de tubos en las CEs, lo que indica que este tratamiento no estaría afectando al comportamiento angiogénico de las CEs *in vitro* en un contexto de linfoma T (*Figura 27A*). Cuando se evaluó el comportamiento de las CEs usando como estímulo los sobrenadantes de las células K12 tratadas únicamente con AH de BPM, observamos un efecto pro-angiogénico sobre las CEs. Durante el ensayo de cierre de herida, se encontró un aumento en la migración de las CEs en respuesta al medio condicionado proveniente del tratamiento con AH 100 (AH 100 vs. CB, $**p < 0,01$) (*Figura 26B*).

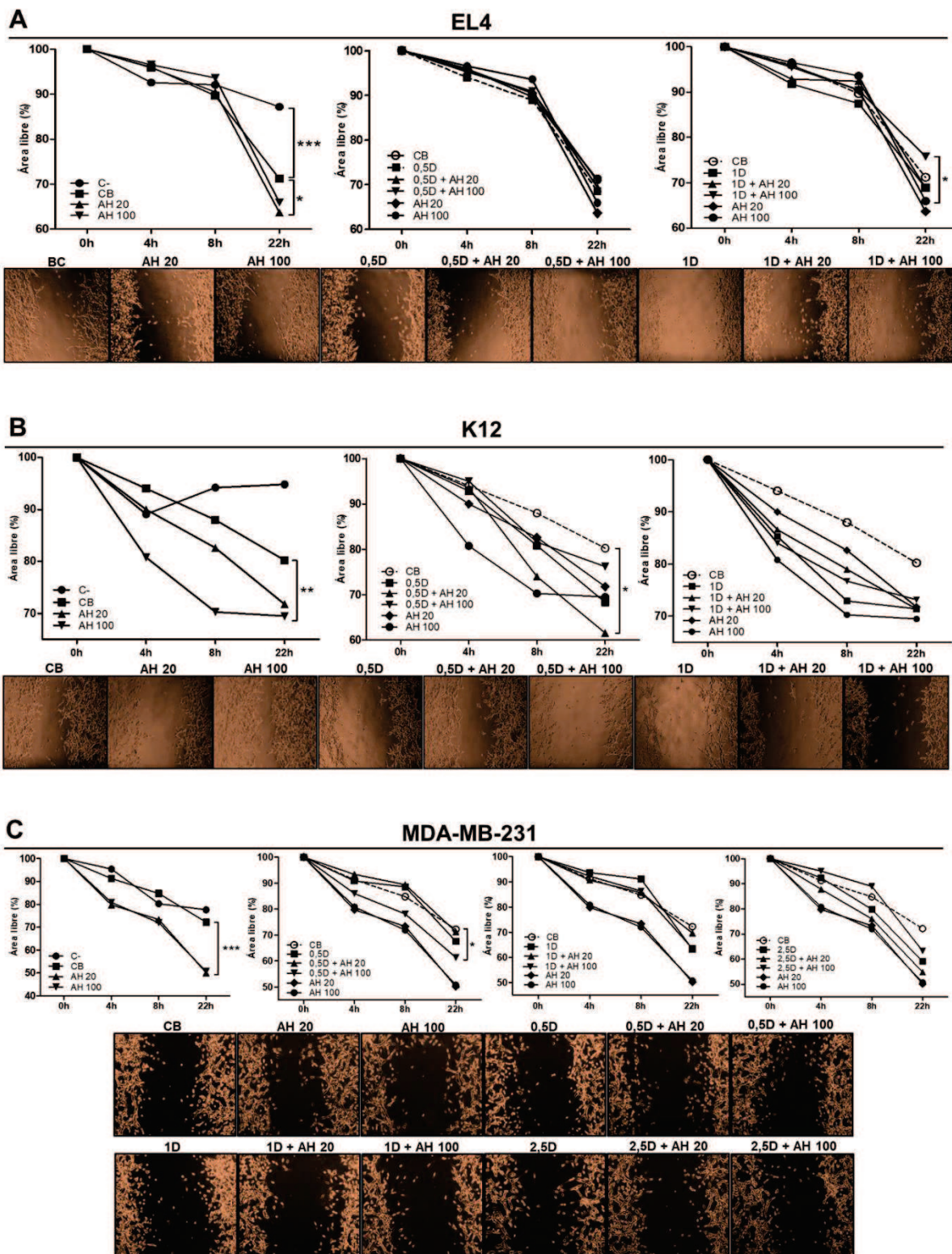


Figura 26. Modulación de la migración de células endoteliales en respuesta al tratamiento con AH de BPM y DOX. Las células microendoteliales humanas HMEC-1 se estimularon con los medios de cultivo condicionados provenientes de las células EL4 (A), K12 (B) o MDA-MB-231 (C) luego de ser tratadas con AH de BPM y DOX. Se realizó una herida en el centro de cada pocillo y se tomaron micrografías cada 4 horas para evaluar el cierre de dicha herida como medida de la capacidad migratoria de las células HMEC-1. Los gráficos muestran el área libre de células generada durante el ensayo, medida cada 4 horas. Las micrografías muestran el experimento más representativo de los tres realizados en forma independiente. Los valores se expresan como la media aritmética \pm EEM de tres experimentos independientes. C-: células HMEC-1 sin estimular. CB: células HMEC-1 estimuladas con los sobrenadantes de las células tumorales sin tratar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A su vez, el mismo sobrenadante (AH 100) estimuló significativamente la formación de tubos en las CEs, demostrado por un aumento en el número de estructuras tipo vasos con respecto al control basal (CB) cuando se realizó el ensayo de formación de tubos (*Figura 27B*).

Sorprendentemente, el tratamiento con DOX sin el agregado de AH de BPM mostró tener una acción pro-angiogénica, ya que los sobrenadantes de los tratamientos con 0,5D y 1D indujeron niveles más altos de migración (*Figura 26B*) y de formación de tubos sobre las CEs (*Figura 27B*). Al analizar los resultados obtenidos a partir de los medios condicionados derivados del tratamiento combinado con DOX y AH de BPM en las células K12, hallamos diferencias significativas en el comportamiento de las CEs. Durante el ensayo de cierre de herida, los sobrenadantes que provenían del tratamiento con 0,5D + AH 20 estimularon significativamente la migración de las CEs ($*p < 0,05$) (*Figura 26B*). En concordancia con lo anterior, dicho efecto se mostró aún más acentuado durante el ensayo de formación de tubos, donde se pudo observar un aumento significativo en la formación de tubos cuando las CEs fueron estimuladas con los medios condicionados derivados de los tratamientos con 0,5D y 1D combinados con ambas concentraciones de AH de BPM: 0,5D vs. 0,5D + AH 20 y 0,5D + AH 100 ($***p < 0,001$) y 1D vs. 1D + AH 20 y 1D + AH 100 ($**p < 0,01$) (*Figura 27B*).

Finalmente, las CEs fueron estimuladas con los medios condicionados derivados de los tratamientos con DOX y AH de BPM realizados sobre las células de cáncer de mama MDA-MB-231. Cuando las CEs se cultivaron con los sobrenadantes del tratamiento con AH de BPM, ambas dosis del mismo (AH 20 y AH 100) aumentaron significativamente la capacidad de migración de las CEs durante el ensayo de cierre de herida respecto de las condiciones basales (AH 20 y AH 100 vs. CB, $***p < 0,001$) (*Figura 26C*). Por otro lado, al utilizar los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 tratadas con DOX, las tres dosis empleadas (0,5D; 1D y 2,5D) favorecieron la migración de las CEs en comparación con los niveles basales (CB). No obstante, al analizar los resultados obtenidos luego de exponer a las CEs a los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 tratadas con la combinación de DOX y AH de BPM, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la migración de las CEs con una dosis de 0,5D combinada con AH 100 respecto al control basal (0,5D + AH 100 vs. CB $*p < 0,05$) (*Figura 26C*). De acuerdo con los efectos vistos en el ensayo de cierre de herida, el tratamiento con AH de BPM sobre las células MDA-MB-231 promovió un perfil pro-angiogénico confirmado por una mayor formación de estructuras similares a tubos en

comparación con sobrenadantes de células MDA-MB-231 no tratadas (CB) ($*p<0,05$) (Figura 27C). Más aún, al estimular a las CE con los medios provenientes de los tratamientos con

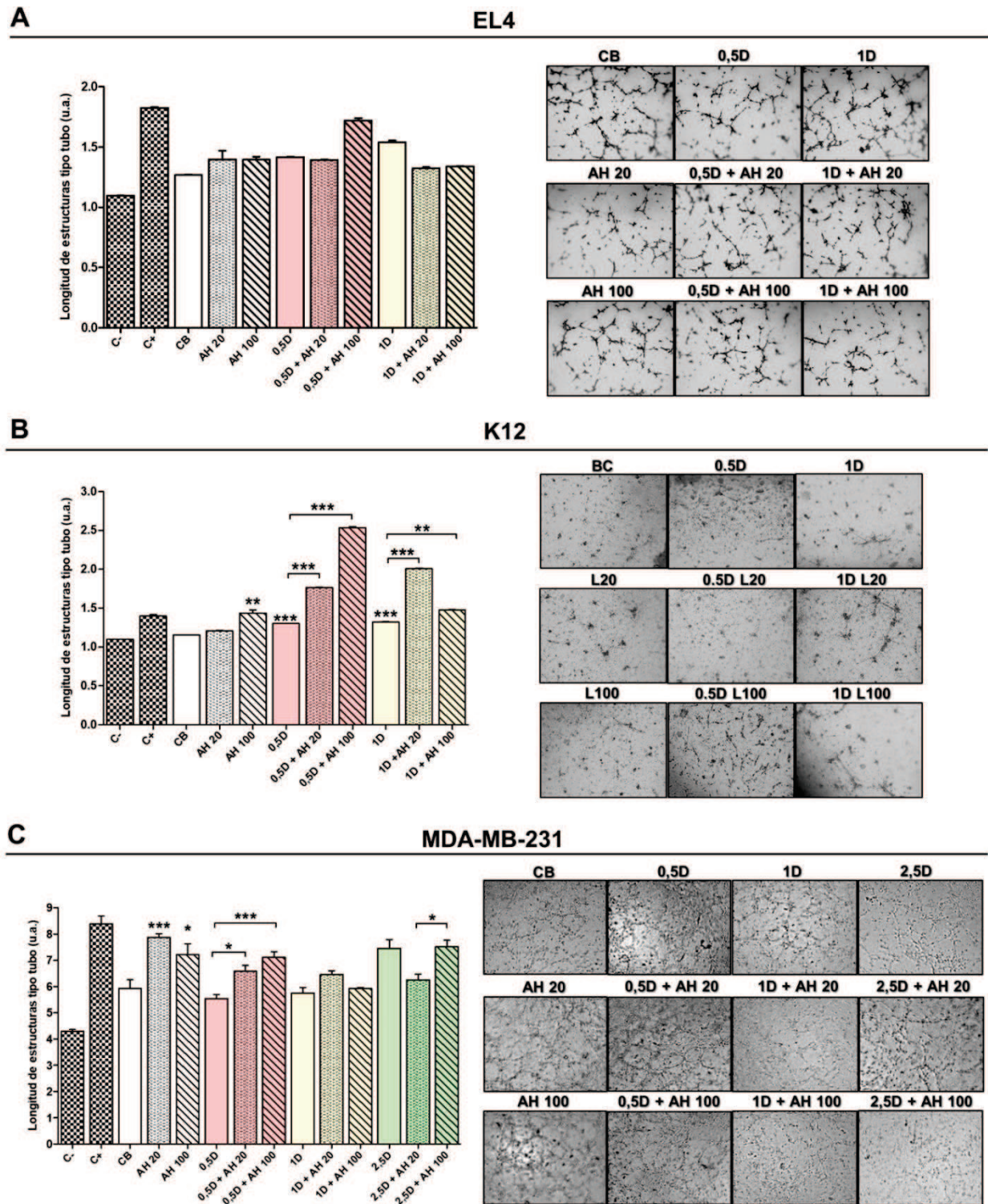


Figura 27. Ensayo de formación de tubos sobre células endoteliales. Las células microendoteliales humanas HMEC-1 fueron plaqueadas en un soporte Geltrex™, simulando la MEC. Posteriormente, se estimularon con los medios de cultivo condicionados provenientes de las células tumorales EL4 (A), K12 (B) o MDA-MB-231 (C) luego de ser tratadas con AH de BPM y DOX. Las micrografías representativas muestran la formación de redes endoteliales después de 6 horas de siembra y estímulo. Los gráficos muestran la media \pm EEM de la formación de tubos en las CE de tres experimentos independientes. C-: células HMEC-1 sin estimular. CB: células HMEC-1 estimuladas con los sobrenadantes de las células tumorales sin tratar. C+: CE estimuladas con 100 ng/ml de VEGF; CB: sobrenadante de células tumorales no tratadas. * $p<0,05$ *** $p<0,001$.

0,5D más ambas dosis de AH de BPM, encontramos un aumento en la formación de tubos en comparación al tratamiento con DOX sola (0,5D + AH 20 y 0,5D + AH 100 vs. 0,5D; *** $p < 0,001$) (*Figura 27C*). Durante el ensayo de cierre de herida fueron incluidos controles específicos para descartar el efecto residual de la DOX o el AH de BPM sobre las CEs.

En dichas condiciones se observaron resultados similares o inferiores en la capacidad de migración de las CEs respecto a las condiciones basales (*Figura 2 - Anexo*), lo que nos indica y confirma que el efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs depende específicamente de la activación de señales y factores con potencial angiogénico provenientes de las células tumorales tratadas con AH de BPM y DOX.

1.1.5. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la expresión de factores angiogénicos

VEGF es uno de los factores más importantes implicados en la angiogénesis tumoral^{18,188,189}. Para continuar estudiando la modulación de la angiogénesis por parte del tratamiento con AH de BPM y DOX, se decidió evaluar si VEGF sería uno de los factores solubles involucrados en la modulación de la angiogénesis inducida en las células tumorales bajo el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX. Para ello, se analizó la biosíntesis y secreción de VEGF en los medios condicionados de las células tumorales obtenidos después de los tratamientos con AH de BPM y DOX utilizados como estímulo de las CEs mediante la técnica de ELISA.

Al determinar la concentración de VEGF en las células EL4 de linfoma T (*Figura 28A*), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos realizados. En contraste, en las células K12 de osteosarcoma se observó una disminución significativa de los niveles de VEGF secretados en todos los tratamientos, en comparación con las condiciones basales (CB) (*Figura 28A*). Por último, cuando se evaluaron los niveles de VEGF en los sobrenadantes de las células MDA-MB-231, tampoco se observó ninguna diferencia en la concentración de dicho factor (*Figura 28A*), lo que indicaría que los niveles de VEGF no explicarían las diferencias en el efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs en nuestro modelo experimental.

Dado que no se hallaron diferencias en la secreción de VEGF en los medios condicionados de las células tumorales tratadas, surgió la hipótesis de que otros factores pro-angiogénicos podrían verse modulados por los tratamientos y estar relacionados con

fenotipos agresivos de los diferentes tipos de células tumorales^{190,191}. FGF-2 es otro de los factores importantes de supervivencia celular involucrado en la angiogénesis tumoral^{192,193}, y por ello, decidimos continuar nuestro estudio evaluando la expresión de este factor como un potencial modulador del proceso angiogénico en nuestro modelo.

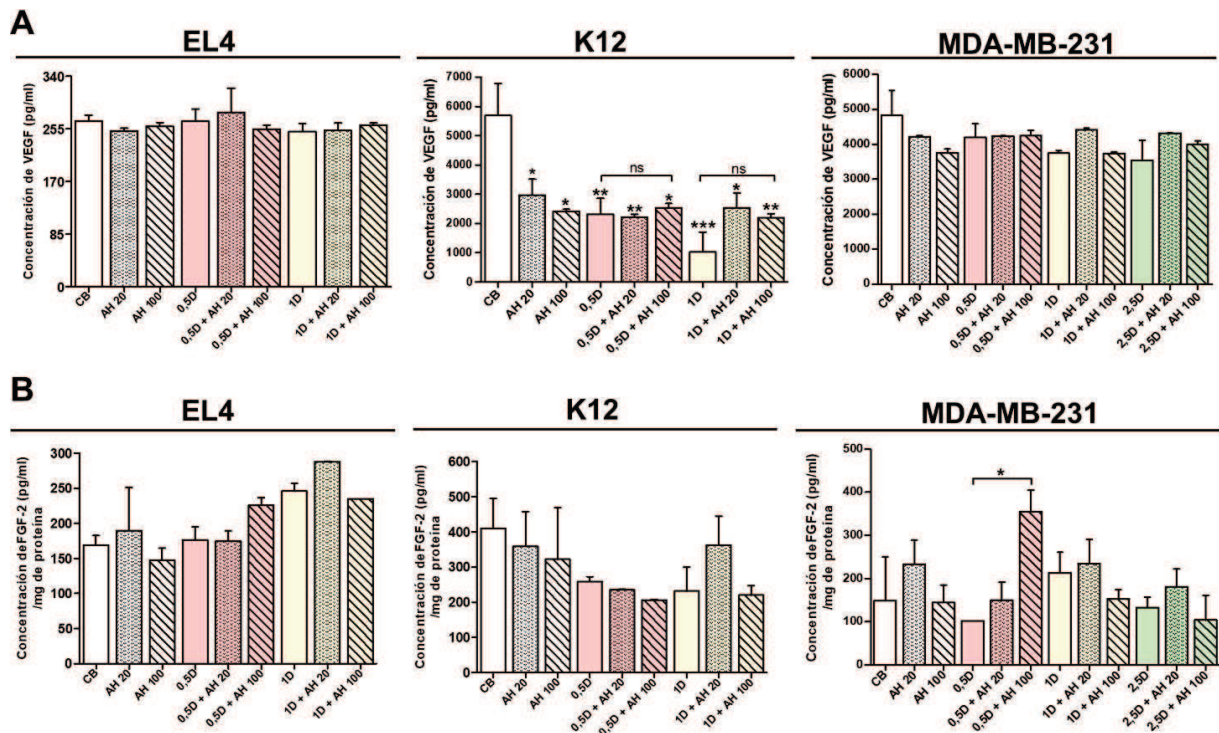


Figura 28. Análisis de la expresión de factores pro-angiogénicos en respuesta al tratamiento combinado con AH de BPM y DOX. Los niveles de concentración de VEGF (A) y FGF-2 (B) (pg/ml) se detectaron en sobrenadantes (A) o extractos proteicos (B) de las líneas celulares tumorales EL4, K12 y MDA-MB-231 sin tratar, tratadas con AH de BPM o tratadas con la combinación AH +DOX mediante ELISA. Los resultados se expresan como las medias aritméticas \pm EEM obtenidos en tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Primero, analizamos los niveles de FGF-2 secretado por ELISA, utilizando los medios condicionados de las líneas tumorales tratadas con AH de BPM y DOX. Sin embargo, no encontramos niveles detectables de FGF-2. Esto puede deberse a que, frecuentemente durante su secreción, FGF-2 permanece asociado con PGs de heparán sulfato de la superficie celular^{46,194}, lo que dificulta su detección en los sobrenadantes celulares. Por tal motivo, realizamos el ensayo nuevamente utilizando como muestras los extractos proteicos totales de cada línea celular, que contienen la fracción de membrana citoplasmática además de la fracción intracelular.

Al evaluar la síntesis de FGF-2 en los extractos proteicos de las células EL4, el tratamiento con AH 20 mostró una tendencia de aumento los niveles de expresión de tal

factor, aunque no se encontraron diferencias significativas (*Figura 28B*). Al analizar los niveles de síntesis de FGF-2 en la línea K12, no se hallaron cambios significativos en la expresión de este factor cuando las células fueron tratadas con AH de BPM. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con 1D + AH 20, los niveles de FGF-2 aumentaron respecto al tratamiento con 1D (*Figura 28B*).

A continuación, se realizó el mismo análisis para las células de adenocarcinoma mamario (MDA-MB-231). Observamos que el tratamiento con AH 20 produjo un incremento en tendencia en la expresión de FGF-2. Sin embargo, no resultó significativo estadísticamente. De acuerdo con nuestros resultados obtenidos en los otros tipos de células, el tratamiento con DOX *per se* no mostró ninguna acción pro-angiogénica. Sin embargo, cuando se combinó con el AH de BPM (0,5D + AH 100), la expresión de FGF-2 aumentó significativamente en comparación con el tratamiento con 0,5D ($*p < 0,05$) (*Figura 28B*). Estos resultados podrían explicar el efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs detectadas en los ensayos *in vitro* utilizando los medios condicionados provenientes de las células tratadas con AH de BPM y DOX. Los datos previamente expuestos nos demuestran que el efecto modulador del AH de BPM durante el tratamiento con DOX, podría depender y deberse, a favorecer la expresión de FGF-2. Un aumento en la expresión de este factor clave en la angiogénesis tumoral, es un potencial responsable del efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs tanto en los ensayos *in vitro*.

1.1.6. Efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la MEC tumoral endógena

A fin de corroborar el efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre los componentes propios de la MEC tumoral, específicamente el AH, se analizó la fracción de AH soluble y adherida a la membrana plasmática en las células EL4 y MDA-MB-231. Para determinar la fracción de AH soluble presente en los sobrenadantes de las células tumorales EL4 y MDA-MB-231 se utilizó una estrategia de ensayo tipo ELISA desarrollado en el laboratorio durante la presente tesis. En este caso, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de AH secretados de las células MDA-MB-231 bajo los tratamientos con AH de BPM, con DOX o la combinación de ambos (*Figura 29A*). Por el contrario, en el caso de la línea tumoral EL4, el tratamiento con AH 100 logró estimular la secreción de AH respecto a las condiciones basales (CB vs. AH 100, $*p < 0,05$) (*Figura 29B*). Más aún, efectos similares se observaron al tratar a las células

EL4 con el tratamiento combinado con 1D + AH 100, donde se determinó mayor secreción de AH respecto al tratamiento que únicamente contenía 1D (1D vs. 1D + AH 100, $*p < 0,05$) y en comparación con las condiciones basales (CB vs. 1D + AH 100, $*p < 0,05$) (Figura 29B). Cabe destacar que durante este ensayo se agregaron controles residuales de AH 20 y 100 para descartar una señal inespecífica por parte del AH utilizado como tratamiento (Figura 3 Anexo).

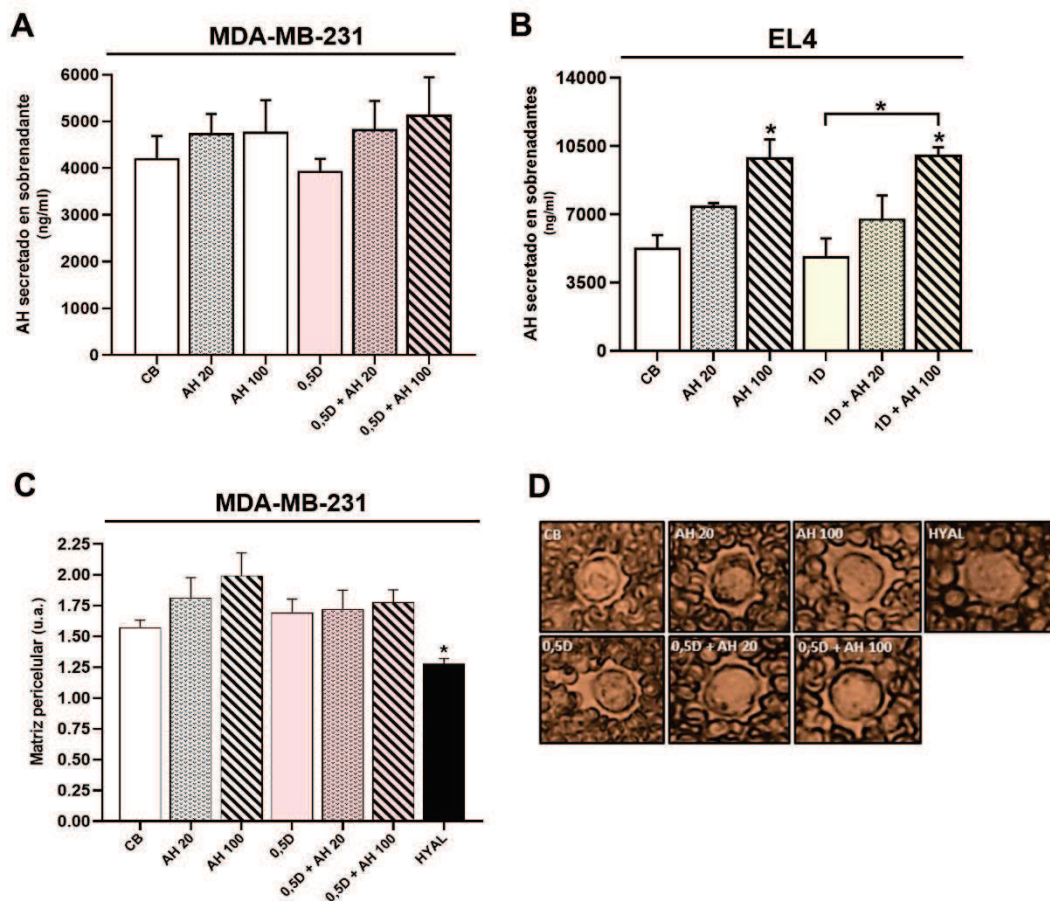


Figura 29. Evaluación de las variaciones de la MEC tumoral como consecuencia del tratamiento con AH de BPM y DOX en las células EL4 y MDA-MB-231. Las células tumorales EL4 y MDA-MB-231 se trataron con AH de BPM o con la combinación AH de BPM + DOX. Una vez finalizado el tratamiento se colectaron los sobrenadantes para determinar la concentración de AH secretado mediante un ensayo tipo ELISA (A y B). Para realizar el ensayo de exclusión de partículas sobre las células MDA-MB-231, una vez cumplido el tiempo de tratamiento y colectado el sobrenadante, se lavaron las células y se añadieron a cada pocillo 2×10^7 glóbulos rojos fijados. Después de permitir la decantación, se capturaron y analizaron múltiples imágenes utilizando el software ImageJ (C). Las micrografías muestran el más representativo de tres experimentos independientes (D). N=3, como media \pm EEM $*p < 0,05$.

Como parte del AH sintetizado queda retenido en la matriz pericelular de las células en estrecha relación con otros componentes de la MEC, se realizó un ensayo de exclusión de partículas sobre las células MDA-MB-231. Cabe destacar que este tipo de

ensayo no se realizó sobre las células EL4 debido a que su crecimiento en suspensión impidió la realización del mismo. En este ensayo no se observaron diferencias significativas en la matriz pericelular de las células MDA-MB-231 al ser tratadas con AH de BPM, DOX o la combinación de ambos tratamientos (*Figura 29C y 29D*). Estos resultados nos indican que el AH de BPM y la DOX no modificarían la MEC propia de las células tumorales en el modelo de adenocarcinoma mamario, en particular la fracción de AH de dicha matriz, por lo que el efecto observado dependería propiamente de dichos tratamientos exógenos. No obstante, no se podría descartar un efecto modulador del tratamiento con AH de BPM exógeno y DOX sobre la síntesis y/o secreción de AH propio hacia la MEC en el modelo tumoral de linfoma T, hecho que podría estar relacionado con las características diferenciales de estos dos tipos de modelos tumorales.

1.2. Efecto del tratamiento antitumoral combinado de AH de BPM y DOX en modelos tumorales *in vivo*

1.2.1. Efecto del tratamiento combinado con AH de BPM y DOX sobre la angiogénesis tumoral

En línea con los resultados obtenidos en un contexto *in vitro*, y a fin de aproximar las condiciones de los ensayos a un contexto tisular y orgánico, se decidió continuar los estudios generando tres modelos tumorales murinos ectópicos *in vivo*, correspondientes a cada línea celular tumoral utilizada en los ensayos *in vitro*. Para eso, diferentes cepas de ratones se inocularon subcutáneamente con las células EL4, K12 y MDA-MB-231 según correspondiera por la etiología de cada línea, tal como se detalló en la sección de materiales y métodos (*Figura 17*). En el caso de la línea tumoral K12 no se logró el establecimiento ni crecimiento de tumores palpables en ninguno de los animales utilizados dentro de cada grupo experimental, por lo tanto, no se continuó trabajando con dicha línea. Los modelos ectópicos subcutáneos de linfoma T (EL4) y de adenocarcinoma mamario (MDA-MB-231) pudieron ser establecidos correctamente. Una vez que el tumor se estableció subcutáneamente, se realizaron diferentes tratamientos locales con AH de BPM (AH 20 y AH 100), DOX o la combinación de ambos tratamientos (DOX + AH de BPM). Siguiendo el principio de las 3R para la utilización de animales para investigación, se decidió realizar los experimentos *in vivo* utilizando únicamente una concentración de DOX para cada modelo tumoral, seleccionándose acorde a los

resultados observados *in vitro* (1D para EL4 y 0,5D para MDA-MB-231). Luego del sacrificio de los animales y la extracción de los tumores, se usó una tinción fluorescente para determinar la presencia de CEs murinas en el tejido tumoral, así como la presencia de vasos.

En el caso del modelo tumoral de linfoma T (EL4), se pudo determinar un aumento en la presencia de CEs en el MAT *in vivo*, así como mayores estructuras similares a vasos durante el tratamiento con ambas dosis de AH de BPM (AH 20 y AH 100) respecto a los tejidos tumorales que no recibieron tratamiento (Control) ($***p < 0,001$) (Figura 30A-30C). Contrariamente a los resultados obtenidos *in vitro*, cuando se combinó el tratamiento de 1D con ambas dosis de AH de BPM (1D + AH 20 y 1D + AH 100), se observó un aumento en la presencia de CEs y de vasos en el tejido tumoral en comparación con los tumores tratados con 1D únicamente ($***p < 0,001$) (Figura 30A-30C). Por otro lado, resultados similares se encontraron al estudiar el modelo de adenocarcinoma mamario *in vivo*. Los tumores ectópicos de las células MDA-MB-231 tratadas con AH 100 mostraron mayor presencia de CEs en el contexto tumoral y mayor formación de estructuras tipo vasos confirmada por hematoxilina-eosina en comparación con los tumores sin tratar (C) ($*p < 0,05$) (Figura 30D-30F).

A su vez, los tumores tratados con 0,5D y 0,5D + AH 20 mostraron efectos similares, determinando un aumento en la angiogénesis tumoral aún bajo el tratamiento con DOX ($*p < 0,05$) (Figura 30D-30F). Estos resultados hallados en un contexto tumoral *in vivo* determinan el rol de AH de BPM como un modulador de la respuesta a DOX, afectando su eficacia antitumoral y promoviendo la activación de mecanismos pro-tumorales como la angiogénesis. Si bien la modulación angiogénica por parte del AH de BPM no se observó en los experimentos *in vitro*, el AH de BPM logró alterar la acción antitumoral de la droga DOX en el contexto tumoral *in vivo*. Este efecto no solo podría estar mediado por las células tumorales, sino que también el AH de BPM puede remodelar o alterar la MEC del MAT y otros tipos de células asociados, efecto que no se puede contemplar en los experimentos *in vitro*.

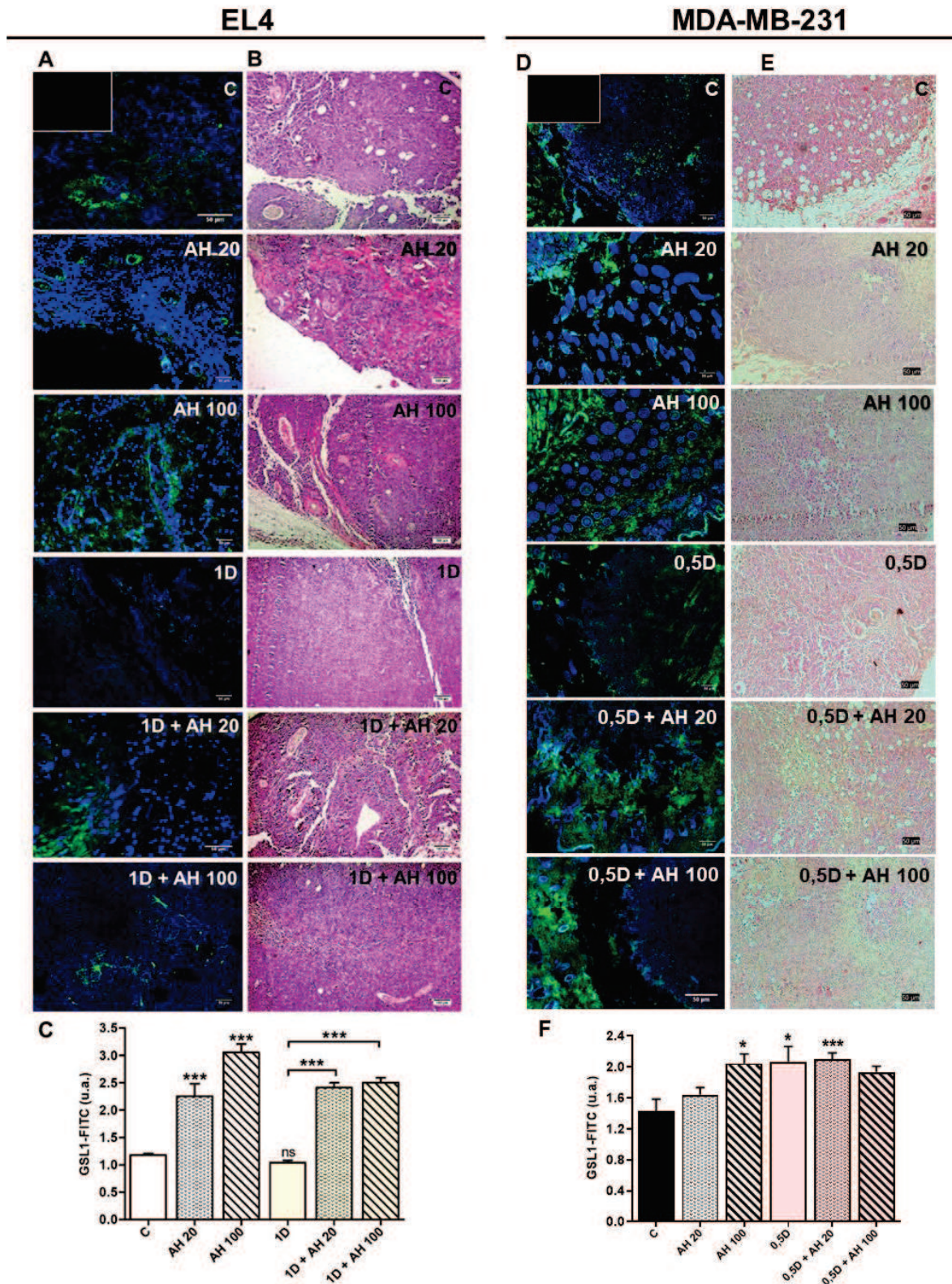


Figura 30. Angiogénesis en modelo *in vivo* de linfoma T y adenocarcinoma mamario. Ratones C57BL/6 o Nu/Nu se inocularon *s.c.* con 1×10^6 células EL4 y 1×10^7 células MDA-MB-231 para establecer modelos tumorales ectópicos. Los tumores formados se trataron localmente con solución salina, AH de BPM, o la combinación AH de BPM + DOX según correspondiera. Una vez sacrificados los animales, los tumores se fijaron y se tiñeron con GSL1-FITC (verde, células endoteliales) y DAPI (azul, núcleos) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (A y D). Por otro lado, se realizó la evaluación histológica del tejido tumoral (B y E). Las micrografías muestran el más representativo de tres experimentos independientes. Las barras representan las medias de las células GSL1-FITC+/campo \pm EEM de diez campos visuales representativos (C y F). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

1.2.2. Efecto del tratamiento combinado con AH de BPM y DOX sobre la modulación de diferentes vías de señalización implicadas en la progresión tumoral

Continuando con el estudio de la modulación del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX en un contexto tumoral *in vivo*, se decidió analizar la expresión génica de distintos mediadores de importantes vías de señalización activadas en la progresión tumoral y la respuesta a drogas.

Para llevarlo a cabo, luego del sacrificio de los animales y la extracción de los tumores, una porción de los mismos se destinó a la extracción de ARN total y la realización de RT-qPCR para detectar niveles de expresión de los genes: VEGF, bombas de expulsión ABC dependientes de ATP, HAS2, HYAL1, SDF1 y CXCR4.

En el tumor de adenocarcinoma mamario proveniente de las células MDA-MB-231, se observó una notoria disminución en los niveles de expresión de dichos ARNm en presencia del tratamiento con 0,5D respecto de los tumores control (*Figura 31A*), efecto que resultaría esperable al tratarse de un tratamiento antitumoral. Sorprendentemente cuando el tratamiento con 0,5D se combinó con ambas dosis de AH de BPM, muchos de estos ARNm mostraron un aumento en su expresión en comparación con el tratamiento único con 0,5D (ABCC1, ABCC2, CXCR4). Más aún, ciertos ARNm revirtieron sus niveles a las condiciones basales del tumor sin tratar (VEGF, HAS1, HYAL1, SDF1) (*Figura 31A*), determinando así que la presencia del AH de BPM revertiría el efecto antitumoral de la DOX sobre estos mecanismos y promueve la activación de procesos celulares que favorecen la resistencia a drogas, la angiogénesis y la migración e invasión *in vivo*.

Al analizar la integridad y cantidad del ARN obtenido a partir de los tumores provenientes de las células EL4, encontramos dificultades técnicas para utilizar dichas muestras y obtener resultados detectables en los ensayos de RT-qPCR en varias de las muestras tumorales utilizadas. Si bien en los tumores control (no tratados) obtuvimos niveles de expresión basales de todos los ARNm analizados (*Figura 31B*), al faltar información del resto de las muestras empleadas, se dificultó realizar comparaciones entre cada condición y concluir sobre los resultados obtenidos.

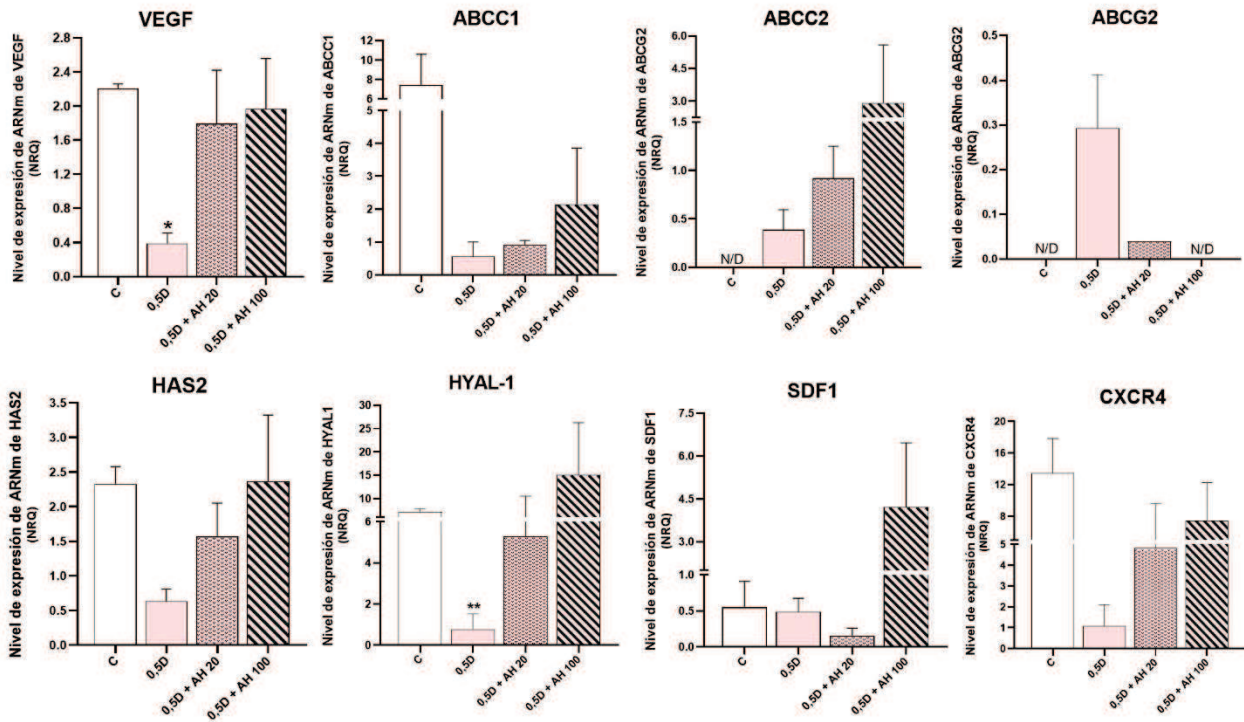
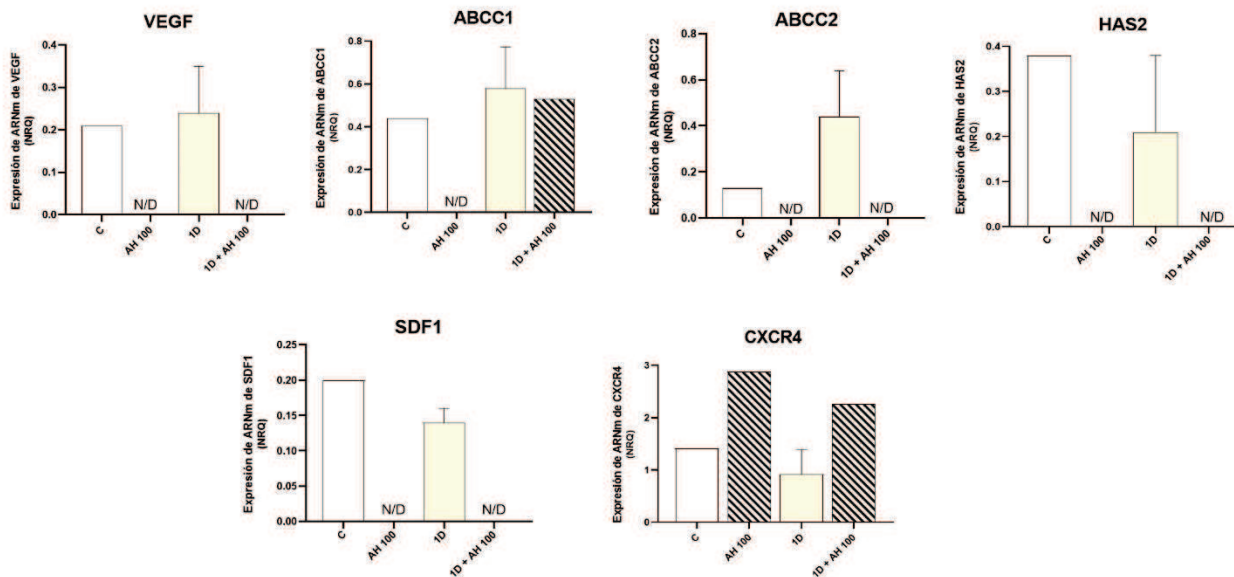
A**MDA-MB-231****B****EL4**

Figura 31. Modulación de la expresión génica en modelo *in vivo* de linfoma T y adenocarcinoma mamario. Ratones C57BL/6 o Nu/Nu se inocularon s.c. con 1×10^6 células EL4 o 1×10^7 células MDA-MB-231 respectivamente para establecer modelos tumorales ectópicos. Los tumores formados se trataron localmente con solución salina, AH de BPM, o la combinación AH de BPM + DOX según correspondiera en cada caso. Una vez sacrificados los animales, una sección de cada tumor se procesó para extraer ARN y sintetizar ADNc mediante RT-PCR. Luego se determinó el nivel de expresión de diferentes genes implicados en la progresión tumoral (MDA-MB-231 – A y EL4 – B) qPCR. Los resultados fueron normalizados usando β -actina (MDA-MB-231) o GAPDH (EL4) como gen de referencia y todas las determinaciones fueron procesadas como duplicados. Las barras representan las medias \pm EEM obtenidos en tres experimentos independientes. $*p < 0,05$. $**p < 0,01$.

SECCIÓN 2: EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE LA SÍNTESIS DE AH ENDÓGENO SOBRE LA RESPUESTA A EPIRRUBICINA

La enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (UGDH) es la responsable de sintetizar el ácido UDP-glucurónico (UDP-GlcUA) en las células. Una vez producido, el UDP-GlcUA actúa como precursor para la síntesis de diversos PGs y GAGs de la MEC. En particular y para nuestro interés, por acción de las enzimas HASs, usando como sustratos a la UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) y este UDP-GlcUA, cataliza la síntesis de AH ¹⁹⁵. A su vez, el UDP-GlcUA está implicado en la eliminación de diferentes drogas quimioterapéuticas a través de reacciones de glucuronidación. Más aún, se ha determinado el rol de la enzima UGDH en cáncer ^{69,70}, mostrando una estrecha relación entre alteraciones en su expresión, la progresión de la enfermedad y sobrevida. En cáncer de próstata se ha propuesto a la enzima UGDH como un nuevo biomarcador candidato para complementar la detección de la transformación tumoral dentro del tejido tumoral adyacente ⁷¹. Aspectos similares se han observado en cáncer de pulmón, determinando que la expresión y localización de la enzima UGDH son un marcador de diagnóstico serológico temprano además de un indicador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón ⁷². Más aún, se ha determinado que la inhibición de la expresión de esta enzima en un modelo de carcinoma colorrectal retrasa la agregación celular ⁶⁹, lo que propone firmemente a la UGDH como un objetivo potencial de estudio para distintos tipos de cáncer.

Dentro de la familia de las antraciclinas, y a diferencia de la DOX, la epirrubicina (EPI) sufre inactivación en el hígado principalmente por una reacción de glucuronidación que adiciona una molécula de UDP-GlcUA generando glucuronil-epirrubicina ¹² y permitiendo de esta forma la eliminación de la droga. A su vez, la EPI es uno de los principales fármacos destinados para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo o resistente a la terapia hormonal. Por dichas causas, hemos considerado importante investigar el efecto del silenciamiento de la enzima UGDH sobre la actividad de la antraciclina EPI, la composición de la MEC y la expresión de AH en un modelo de adenocarcinoma mamario humano triple negativo (MDA-MB-231). Además, nos propusimos determinar la asociación con mecanismos de resistencia a esta droga en los modelos tumorales estudiados.

2.1. Expresión de UGDH y genes asociados con el metabolismo de AH, la angiogénesis y la expulsión de drogas en pacientes con cáncer de mama

En primer lugar, para tener una visión general de la expresión de la enzima UGDH en diferentes tipos de tumores sólidos, analizamos su expresión en muestras del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), lo cual demostró que la enzima UGDH se sobre-expresa en cáncer de pulmón, hígado, próstata y mama, donde se pueden observar alta expresión de esta proteína (*Figura 32A*).

Además, nuestro objetivo también se centró en establecer si esta enzima podría ser propuesta como un nuevo biomarcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama, teniendo en cuenta su estadificación y clasificación molecular según la expresión de los receptores hormonales y HER2. Observamos que, niveles más altos de expresión de UGDH se correlacionaron con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama triple negativo (RE- RP- HER2-) que habían recibido quimioterapia (HR: 1,54 *Figura 32B*).

Continuamos analizando las asociaciones entre la expresión de UGDH y los roles de diferentes genes relacionados con la progresión tumoral para el pronóstico de supervivencia de los mismos pacientes con cáncer de mama mediante el análisis de gráficos de Kaplan-Meier. Específicamente, estudiamos diferentes genes implicados en el desarrollo de resistencia a drogas como los transportadores ABC dependientes de ATP, genes que codifican factores pro-angiogénicos y enzimas implicadas en el metabolismo de AH. Se observó que, el aumento en la expresión de HAS2, HYAL1, HYAL2, VEGF y ABCC2 se relacionaron con peor pronóstico de pacientes con cáncer de mama triple negativo (HR: 1,11 – 1,14 - 1,24 – 1,83 y 1,09 respectivamente, *Figura 32B*). Por otro lado, el resto de los genes analizados (HAS1-3; HYAL3; FGF-2; EGF; ABCG2; ABCCC1) no mostró ningún efecto marcado sobre la supervivencia del paciente, o tuvieron algún efecto protector sobre la misma (*Figura 32B*).

Teniendo en cuenta el concepto de MAT abordado durante este trabajo, el entorno donde se desarrolla un tumor se altera para favorecer su progresión, diseminación y escape inmunológico, siendo el propio tumor o las células asociadas capaces de inducir cambios en este microambiente. En este sentido, tal como se mencionó en la sección materiales y métodos, nuestro laboratorio ha tenido y tiene acceso a muestras de pacientes con cáncer de mama, las cuales fueron previamente clasificadas según el estado expresión de RE, RP, HER2 y Ki67 en nuestro laboratorio (*Figura 33*)¹⁷⁹.

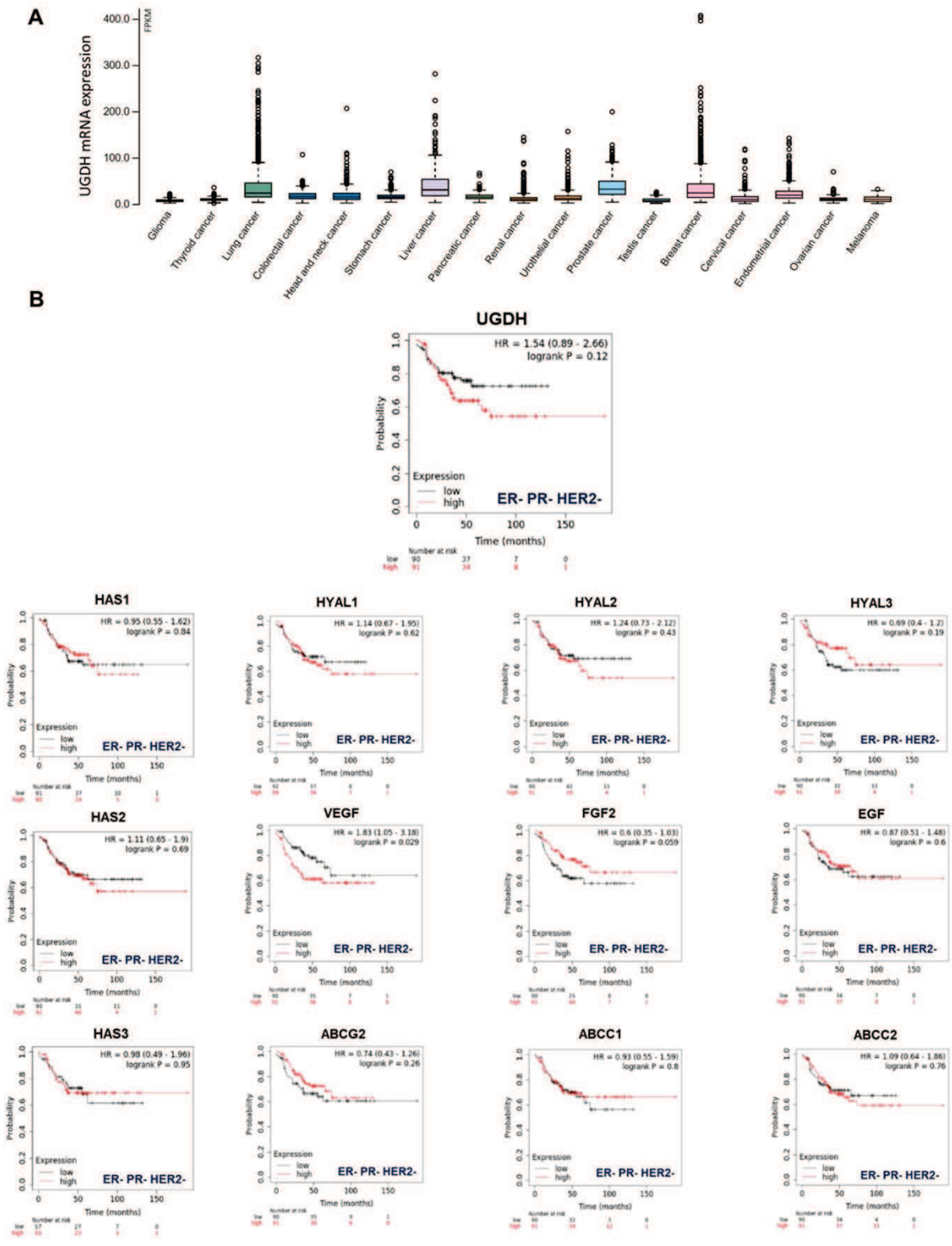


Figura 32. Análisis TCGA de la expresión de UGDH en diferentes tipos de cáncer (A). Los datos de RNA-seq en 17 tipos de cáncer se representan como fragmentos por Kb de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM) generadas por The Cancer Genome Atlas (TCGA). **Análisis de supervivencia relacionado con la expresión de los principales genes implicados en el metabolismo de AH (UGDH, HASs y HYALs), angiogénesis (VEGF, FGF-2, EGF) y resistencia a drogas (transportadores ABC) (B).** Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier libre de recaídas se trazan en función de la expresión de cada gen en pacientes con cáncer de mama triple negativo tratados con quimioterapia (n = 181). Se muestran los valores p de rango logarítmico y los cocientes de riesgos (HR; intervalo de confianza del 95 % entre paréntesis). Los ID de las bases de datos Affymetrix correspondientes son: 203342_at_UGDH; 207316_en_HAS1; 206432_en_HAS2; 223541_en_HAS3; 210619_en_HYAL1; 206855_en_HYAL2; 211728_en_HYAL3; 210512_en_VEGF; 204422_en_FGF-2; 206254_en_EGF; 209735_en_ABCG2; 202804_en_ABCC1 y 205887_en_ABCC2.

Tomando en consideración que el diagnóstico histopatológico de las muestras determinó que se trataban de carcinoma tipo invasivo y entendiendo el rol activo del entorno tisular donde se desarrolla cada tumor en la adquisición de características pro-invasivas, continuamos analizando la expresión del ARNm de UGDH en muestras obtenidas de tejido tumoral (TT) y tejido no tumoral adyacente (NAT) de pacientes con cáncer de mama. Para ello se procesaron los tejidos obtenidos durante la cirugía, se extrajo el ARN total y se analizó como se describió en la sección de materiales y métodos. Todos los resultados muestran la expresión de UGDH en el TT y el NAT. En las pacientes 1, 3 y 4, que se definieron como pacientes HER2-, observamos un aumento en la expresión de UGDH en TT en comparación con NAT (Figura 33). Por otro lado, la paciente número 2, que se definió como PR- y HER2+, mostró una disminución en los niveles de UGDH en TT respecto a NAT (Figura 33), lo que también se relacionó con niveles bajos de AH y HAS-2, tal como se observó previamente en nuestro laboratorio ¹⁷⁹. Los resultados observados tanto en estudios *in silico* como en pacientes con cáncer de mama permitieron plantear la hipótesis de que la enzima UGDH está implicada en la progresión del cáncer de mama triple negativo, incluso en los casos que han recibido tratamiento quimioterapéutico. Por ello decidimos seguir estudiando los mecanismos implicados en la aparición de resistencias a EPI en los que podrían estar implicadas la enzima UGDH y su producto, el UDP-GlcUA.

Paciente	Sexo	Edad a la adquisición de la muestra (años)	Diagnóstico histopatológico	Estadificación TNM	RE	RP	HER2
1	F	53	Carcinoma invasivo de tipo no especificado (NST)	pT1pNo	+	+	-
2	F	63	Carcinoma invasivo de tipo no especificado (NST)	T2pN2a	+	-	+
3	F	61	Carcinoma invasivo de tipo no especificado (NST)	pT2pNo	+	+	-
4 *	F	69	Carcinoma invasivo de tipo no especificado (NST)	T2Nx	+	+	-

* indica un paciente que se sometió a terapia en el pasado por otra enfermedad (paciente 4, 8 años atrás de la toma de la muestra).

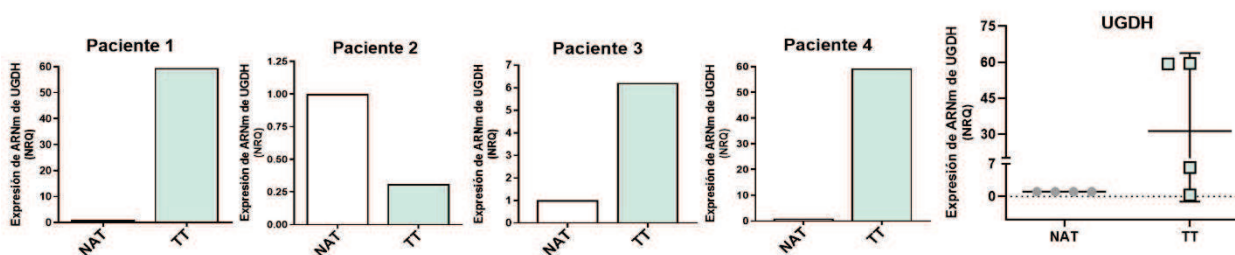


Figura 33. Análisis de la expresión de UGDH en pacientes con cáncer de mama. Los niveles de ARNm de la enzima UGDH se analizaron mediante RT-qPCR normalizándose al gen GAPDH. Los resultados se muestran como la expresión de UGDH en tejido tumoral (TT) en comparación con el tejido no tumoral adyacente al tumor (NAT) de cuatro pacientes con cáncer de mama caracterizados según distintos parámetros clínicos y al estado de RE, RP y HER2 (A y B).

2.2. Análisis de la expresión de UGDH y la sobrevida celular después del silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231

El análisis bibliográfico, bioinformático y las determinaciones realizadas sobre muestras de pacientes con cáncer de mama nos permitieron confirmar el potencial rol de la enzima UGDH durante el desarrollo de la enfermedad y la posible modulación del MAT durante el tratamiento quimioterapéutico. Por lo cual, para determinar los posibles mecanismos moleculares implicados en la función de la enzima UGDH en la progresión del cáncer de mama triple negativo y la resistencia a la EPI, continuamos nuestro estudio realizando experimentos in vitro utilizando la línea celular MDA-MB-231. Para ello, las células de dicha línea celular tumoral fueron transfectadas utilizando un siRNA específico contra UGDH (junto con un siRNA control), y luego de 24 horas post-transfección, se adicionó un tratamiento con una dosis de 1 μM de EPI durante 24 horas tal como se explicó detalladamente en la sección de materiales y métodos. La dosis de EPI utilizada en los ensayos se seleccionaron considerando valores inferiores al IC₅₀ (IC₅₀ MDA-MB-231: 2,59 μM) a fin de evitar posibles efectos de altos niveles de muerte celular por un exceso de EPI utilizada (Figura 34).

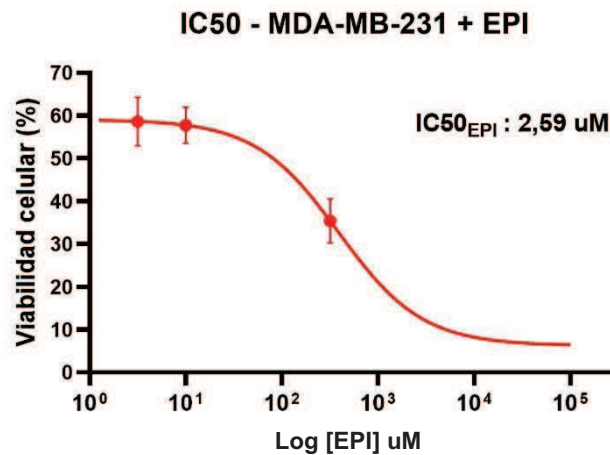


Figura 34. Cálculo de la concentración de epirrubicina (EPI) inhibitoria del 50% de la sobrevida celular (IC₅₀). Para determinar las dosis de EPI a utilizar en los ensayos posteriores, se determinó el valor IC₅₀ para la línea celular MDA-MB-231, las cuales fueron tratadas con dosis crecientes de EPI por 24 horas y posteriormente se realizó un ensayo tipo MTS para determinar la viabilidad celular. El valor IC₅₀ para EPI se calculó interpolando el dato necesario para disminuir en un 50% la viabilidad celular.

En primer lugar, como se usó un sistema de transfección basado en siRNAs para el silenciamiento de la expresión de UGDH, se comprobó que el sistema de transfección utilizado funcionara correctamente. Para ello, se decidió analizar los niveles de expresión

de UGDH tras completar el esquema de transfección con el siRNA específico para UGDH y el post-tratamiento con EPI tal como se describió en la sección de materiales y métodos (*Figura 19*). Como era de esperar, después de 48 horas post-transfección, las células MDA-MB-231 transfectadas con el siRNA específico contra UGDH mostraron una reducción significativa en el nivel de expresión de UGDH (siUGDH, 90% respecto al control). Sorprendentemente, encontramos un aumento significativo en la expresión de UGDH en respuesta al tratamiento con 1 μ M EPI (EPI) en las células sin transfectar (CB vs. EPI, $***p<0,001$). Sin embargo, el silenciamiento de UGDH combinado con el tratamiento con EPI (siUGDH + EPI) produjo una reducción significativa de los niveles de ARNm de UGDH respecto a EPI, lo que indica que el sistema de silenciamiento funcionó correctamente aún en presencia de EPI, donde se había observado un aumento en la expresión de este gen (*Figura 35A*).

Una consideración importante durante los experimentos de transfección es monitorear posibles alteraciones en la integridad celular durante el cultivo celular debido a la nucleofección y al tratamiento antitumoral con EPI. Por esa razón, decidimos evaluar los efectos de la transfección y el tratamiento con EPI sobre la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis. Como era de esperar, solo el tratamiento con EPI disminuyó la viabilidad celular en un 40%, ya que utilizamos una concentración cercana al valor de IC_{50} para obtener células viables para ensayos posteriores ($*p<0,05$) (*Figura 35B*). Por otro lado, cuando se evaluó la citotoxicidad mediante la liberación de la enzima LDH, observamos niveles aumentados en todas las condiciones en las que se transfectaron las células. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos (*Figura 35C*). El ligero efecto observado sobre la citotoxicidad estuvo dentro del rango esperado ya que el método de transfección implica la electroporación de la membrana celular, hecho que puede liberar la enzima LDH al medio de cultivo. Como era esperable, observamos mayor apoptosis después del tratamiento único con EPI en comparación con las condiciones basales (CB vs. EPI, $**p<0,01$). Sin embargo, la inducción de apoptosis al combinar el silenciamiento de UGDH con el tratamiento con EPI arrojó resultados distintivos. Particularmente, se redujo significativamente la inducción de apoptosis en comparación con las células transfectadas con siUGDH que no recibieron tratamiento con EPI (siUGDH + EPI vs. siUGDH $*p<0,05$). Más aún, los niveles de apoptosis en esas condiciones (siUGDH + EPI) permanecieron por debajo de los niveles obtenidos con el tratamiento con 1 μ M EPI (EPI) (*Figura 35D y 35E*). Por lo

tanto, el silenciamiento de la enzima UGDH durante el tratamiento con EPI rescató a las células MDA-MB-231 de la inducción de apoptosis causada por EPI.

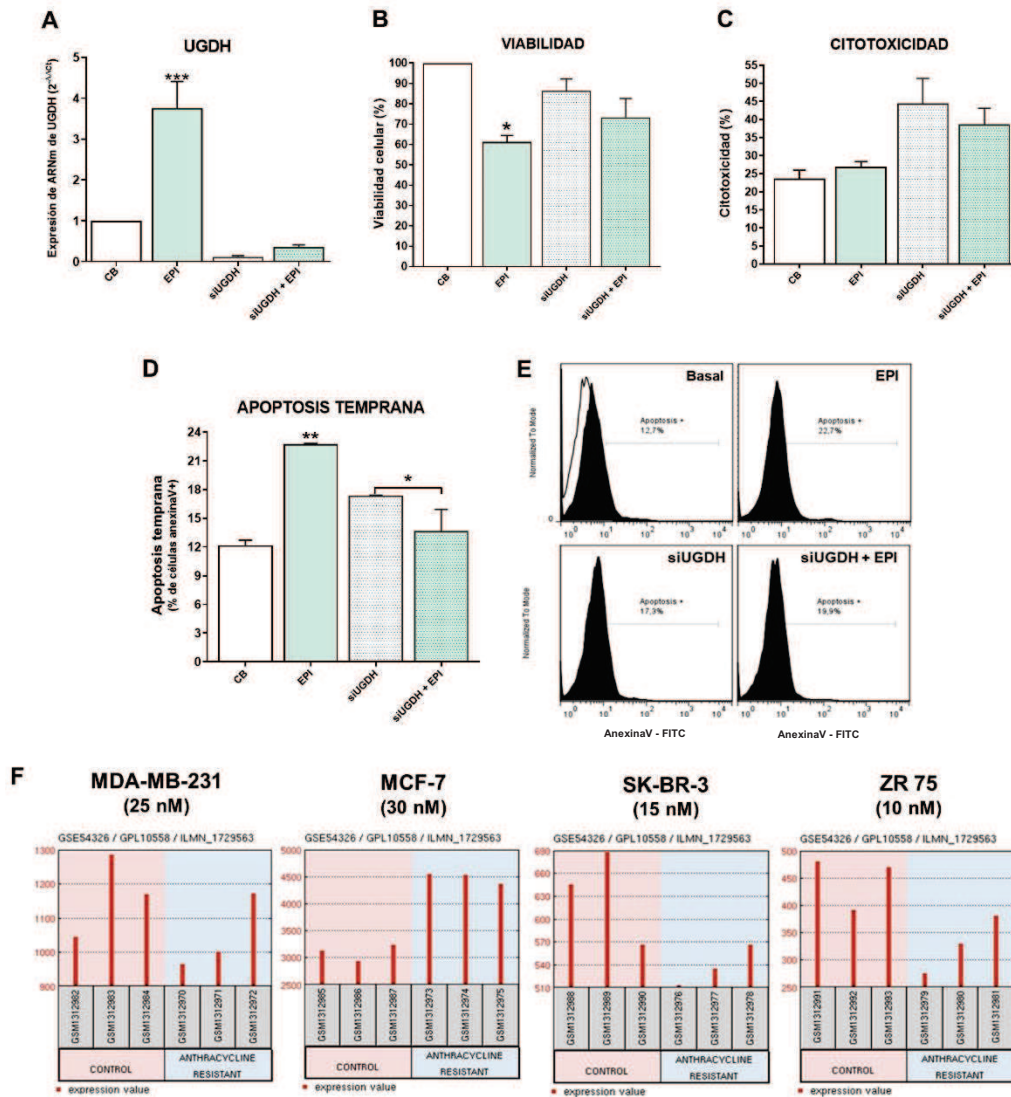


Figura 35. Análisis de las células tumorales MDA-MB-231 tras silenciamiento del gen UGDH y el tratamiento con EPI. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con un siRNA específico contra el gen UGDH (siUGDH) utilizando un siRNA de secuencia aleatoria como control negativo (siSCR). Después de 24 horas, se añadió una solución 1 μ M de EPI (1 EPI) para completar las 48 horas de incubación. Los niveles de ARNm de UGDH se obtuvieron mediante RT-qPCR utilizando sondas Taqman® (A). La viabilidad celular se midió realizando un ensayo MTT (B) y la citotoxicidad se determinó evaluando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes celulares (C). La apoptosis temprana (D) se detectó mediante citometría de flujo utilizando anexinaV-FITC. Los histogramas (E) muestran el experimento más representativo de tres experimentos independientes realizados con 50.000 eventos/condición. N=3, como media \pm EEM * p <0,05 ** p <0,01. Se utilizó el conjunto de datos GSE54326 específico para diferentes líneas celulares de cáncer de mama para comparar los niveles de expresión diferencial de UGDH en células resistentes al tratamiento con antraciclinas y células control. En cada caso, se utilizó la herramienta NCBI GEO2R para analizar los niveles de UGDH (F).

Para complementar los experimentos *in vitro* sobre las células MDA-MB-231, se aplicó la herramienta GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) para evaluar cómo se expresan los ARNm de la enzima UGDH en diferentes líneas celulares de cáncer de

mama ampliamente utilizadas, con diferentes fenotipos agresivos y expresión de receptores hormonales. En este análisis, incluimos resultados de bases de datos públicas de distintas líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 y ZR-75) tratadas o no tratadas con antraciclinas, bajo condiciones de tratamiento similares a las realizadas en nuestro trabajo. Como se mencionó anteriormente, las células MDA-MB-231 son uno de los modelos más utilizados de cáncer de mama triple negativo, con un fenotipo tipo basal y características metastásicas. La línea MCF-7 es una línea celular poco agresiva, no invasiva y caracterizada como RE+ y RP+. La línea celular SK-BR-3 sobre-expresa el producto del gen HER2 (Neu/ErbB-2) y las células ZR-75 se consideran RE+, RP+ y HER2+, con un fenotipo del tipo luminal ¹⁹⁶. En este análisis, encontramos que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 parecen expresar niveles más altos del gen UGDH en comparación con las otras líneas celulares (*Figura 35F*). Este resultado podría estar relacionado con el hecho de que estas dos líneas celulares son HER2-. Resultados similares se encontraron al evaluar la expresión de UGDH en pacientes con cáncer de mama, según el estado de HER2 (*Figura 33*). Además, analizamos la expresión de UGDH cuando las diferentes líneas celulares se expusieron a diferentes concentraciones de EPI (nM) para obtener clones resistentes. En respuesta a EPI, las células de cáncer de mama alteraron la expresión de UGDH, lo que indica que podría actuar como un marcador asociado a este tipo de cáncer. Específicamente, detectamos un aumento significativo en los niveles de UGDH al comparar fenotipos resistentes y no resistentes de la línea celular MCF-7, y en MDA-MB-231 donde se observó una mayor expresión en condiciones de control (*Figura 35F*).

2.3. Efecto del silenciamiento de la enzima UGDH sobre la acumulación intracelular de EPI

La EPI es una molécula capaz de emitir fluorescencia en el espectro visible rojo, que es detectable en ensayos de citometría de flujo. Esto permitió el análisis de la acumulación intracelular de EPI en las células MDA-MB-231 tras la transfección con siUGDH o siSCR. En este sentido, observamos una mayor acumulación intracelular de EPI en las células tumorales que se habían transfectado con siUGDH en comparación con las células no transfectadas que habían sido tratadas con EPI (siUGDH + EPI vs. EPI * $p < 0,05$) (*Figura 36A y 36B*). Además, se observaron dos poblaciones bien diferenciadas de células MDA-MB-231 en términos de acumulación de EPI cuando las

células se transfectaron con siUGDH antes de ser tratadas con EPI (siUGDH + EPI). Este efecto no se encontró en el resto de las condiciones que presentaban tratamiento con EPI (EPI) (Figura 36C). Más aún, esta condición (siUGDH + EPI) condice con una menor activación de la apoptosis celular respecto a las condiciones basales (Figura 35D). Esto nos indica que, aún con mayor acumulación intracelular de EPI, las células MDA-MB-231 no lograron aumentar los niveles de apoptosis y que existen sub-poblaciones de células MDA-MB-231 capaces de responder diferencialmente a la EPI, favoreciendo una menor acumulación del fármaco y evitando la apoptosis en dichas condiciones.

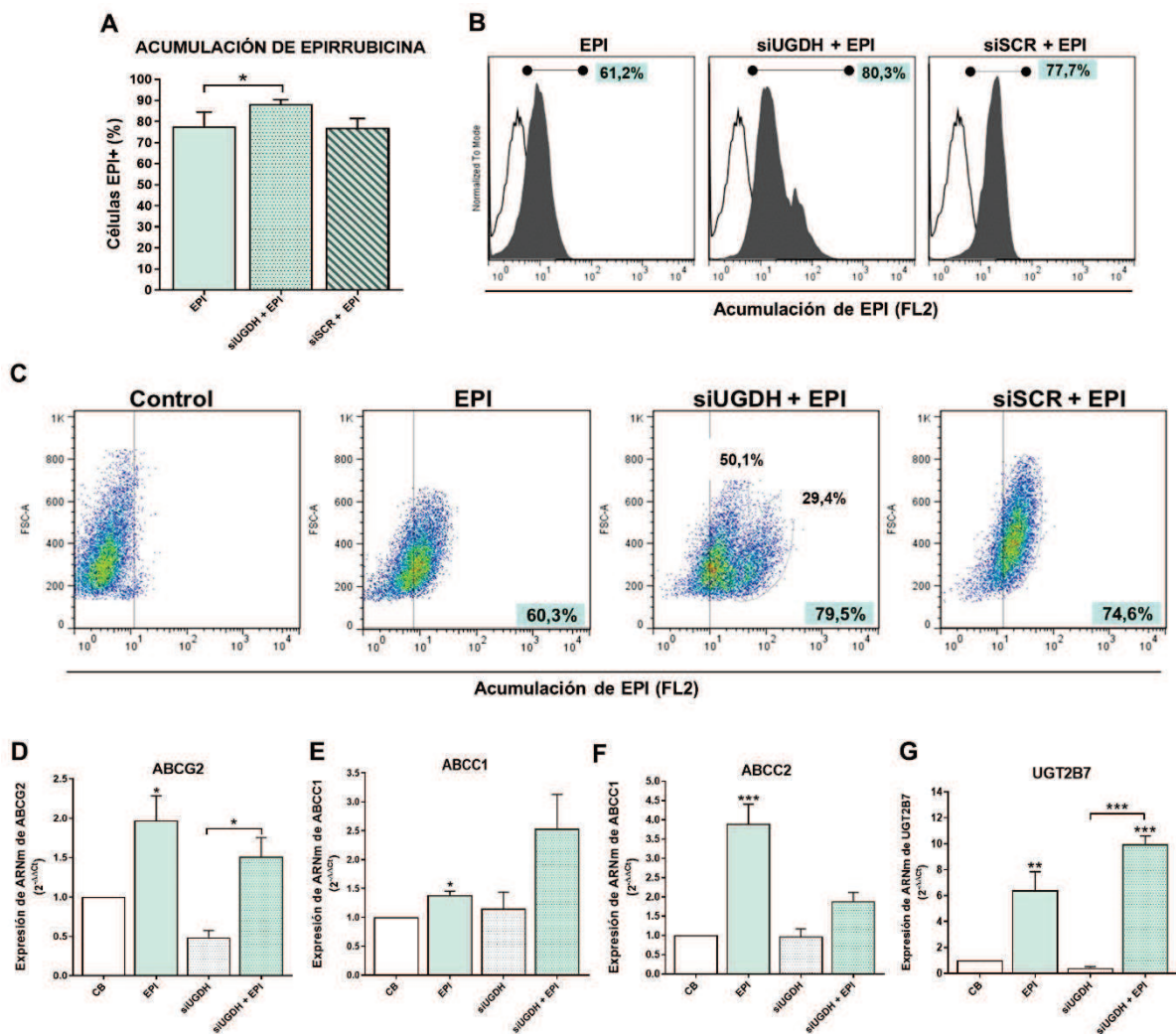


Figura 36. Evaluación de la respuesta tumoral a EPI en células MDA-MB-231 bajo el silenciamiento de UGDH. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con un siRNA específico contra el gen UGDH (siUGDH) utilizando un siRNA de secuencia aleatoria como control negativo (siSCR). Después de 24 horas, se añadió una solución 1 μ M de EPI (1 EPI) para completar las 48 horas de incubación. La acumulación intracelular de EPI se midió por citometría de flujo con el detector FL2. Las barras muestran el porcentaje de células EPI+ determinado por comparación con un control negativo (A). Los histogramas (B) y los diagramas de puntos (C) muestran los más representativos de cuatro experimentos independientes realizados. N = 4, como media \pm EEM * p <0,05. Para evaluar la expresión de ABCG2 (D), ABCC1 (E), ABCC2 (F) y UGT2B7 (G), las bombas de expulsión de drogas ABC y la transferasa específica para EPI UGT2B7, se utilizó RT-qPCR utilizando SYBR Green. Los resultados se normalizaron usando β -actina como gen de referencia y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. N = 3, como media \pm EEM * p <0,05 ** p <0,01 *** p <0,001.

Hipotetizamos que este efecto es causado por la heterogeneidad intrínseca de la línea celular MDA-MB-231 y su fenotipo agresivo. Además, descartamos que fuera efecto del sistema de transfección ya que el control con siSCR no arrojó los mismos resultados. Teniendo en cuenta estos resultados anteriores, decidimos continuar evaluando los posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de la resistencia a drogas que podrían verse involucrados en este efecto observado.

2.4. Modulación de la expresión de genes transportadores de eflujo de drogas ABC y su inactivación después del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI

Para comprender los posibles mecanismos que implican la evasión de los efectos antitumorales de la EPI a pesar de su mayor y diferencial acumulación celular, analizamos la expresión de diferentes genes relacionados con la inactivación de esta antraciclina. Dado que el silenciamiento de UGDH afectó la acumulación intracelular de EPI, esto podría estar relacionado con posibles cambios en la expresión de las bombas de eflujo de drogas implicadas en la expulsión de EPI del interior celular. Por ello, comenzamos analizando la expresión de diferentes transportadores de drogas ABC implicados en el eflujo de EPI: ABCG2, ABCC1 y ABCC2. En dichas condiciones encontramos un aumento significativo en los niveles de ARNm de dichas bombas en respuesta al tratamiento con EPI en comparación con las condiciones basales (CB vs. EPI: ABCG2 y ABCC1 $*p < 0,05$; ABCC2 $**p < 0,01$). Sin embargo, el silenciamiento de UGDH y la combinación con el tratamiento EPI (siUGDH + EPI) no indujeron ninguna modulación significativa de su expresión en comparación con las condiciones basales o el tratamiento con EPI (*Figura 36D, 36E y 36F*). Estos datos podrían explicar que no se produzca un mayor eflujo de la EPI después de la transfección con siUGDH y que la modulación de su expresión depende de la presencia de EPI.

Por otro lado, la enzima UGT2B7 es la transferasa exclusiva responsable de glucuronidar a la EPI por transferencia del GlcUA desde el sustrato UDP-GlcUA. Como se informó anteriormente ¹², después del tratamiento con EPI encontramos una regulación positiva significativa en la expresión de UGT2B7 en comparación con las condiciones basales (CB vs. EPI $**p < 0,01$) (*Figura 36G*). Aún más, observamos niveles aumentados en la expresión de UGT2B7 cuando las células de cáncer de mama se transfectaron con siUGDH antes de tratarlas con EPI (siUGDH + EPI) (*Figura 36G*). Este

resultado indicó que, aunque el flujo de EPI no se activó por completo, las células tumorales aumentaron la expresión de esta enzima en respuesta al tratamiento con EPI, como un nuevo mecanismo de resistencia al fármaco, induciendo su inactivación por glucuronidación y favoreciendo su eliminación.

2.5. Efectos del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI sobre la angiogénesis tumoral, la proliferación celular y la migración

Entre los mecanismos involucrados en la resistencia a drogas, las células tumorales pueden modular la angiogénesis al alterar el comportamiento de las células endoteliales. Las células tumorales pueden secretar diferentes factores pro-angiogénicos, como VEGF, FGF-2 y EGF, entre otros ^{18,189,197}, capaces de promover la migración de CE's y la formación de vasos sanguíneos. Por esa razón, comenzamos analizando los niveles de expresión de ARNm de VEGF y EGF en las células MDA-MB-231 después del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI. Observamos un aumento significativo en la expresión de VEGF en las células tumorales que habían sido tratadas únicamente con EPI respecto de las condiciones basales de cultivo (CB vs. EPI $**p < 0,01$ *Figura 37A*). A su vez, se encontraron niveles aún más altos de ARNm de VEGF cuando las células MDA-MB-231 se transfectaron primero con siUGDH y luego se trataron con EPI (EPI vs. siUGDH + EPI $**p < 0,01$ (*Figura 37A*)). En el caso de EGF, encontramos una tendencia similar de regulación positiva en respuesta al tratamiento con EPI; sin embargo, solo obtuvimos diferencias estadísticamente significativas cuando las células se transfectaron con siUGDH y se trataron con EPI respecto a las células transfectadas que no fueron tratadas con EPI (siUGDH + EPI vs. siUGDH $*p < 0,05$ (*Figura 37B*)).

Posteriormente, analizamos los niveles de biosíntesis y secreción de VEGF por ELISA, donde no observamos cambios significativos en la concentración de VEGF presente en los sobrenadantes de las células MDA-MB-231 transfectadas con siUGDH + EPI (*Figura 37C*). A su vez, FGF-2 es un potente factor de supervivencia celular implicado en la angiogénesis tumoral ^{192,198}. Por lo tanto, a continuación, decidimos evaluar la biosíntesis de FGF-2 mediante la misma técnica. Primero, analizamos la expresión de la proteína FGF-2 usando sobrenadantes de MDA-MB-231 que se transfectaron con siUGDH y se trataron con EPI. Sin embargo, no se encontraron niveles detectables por ELISA en estas condiciones. Dado que el FGF-2 con frecuencia no se detecta en los medios de cultivo de células ya que permanece asociado con PGs de heparán sulfato de la superficie celular ¹⁹⁹⁻²⁰¹, realizamos un ELISA utilizando los extractos proteicos

celulares y logramos detectarlo. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre el tratamiento y las condiciones basales en el momento del ensayo (*Figura 37D*).

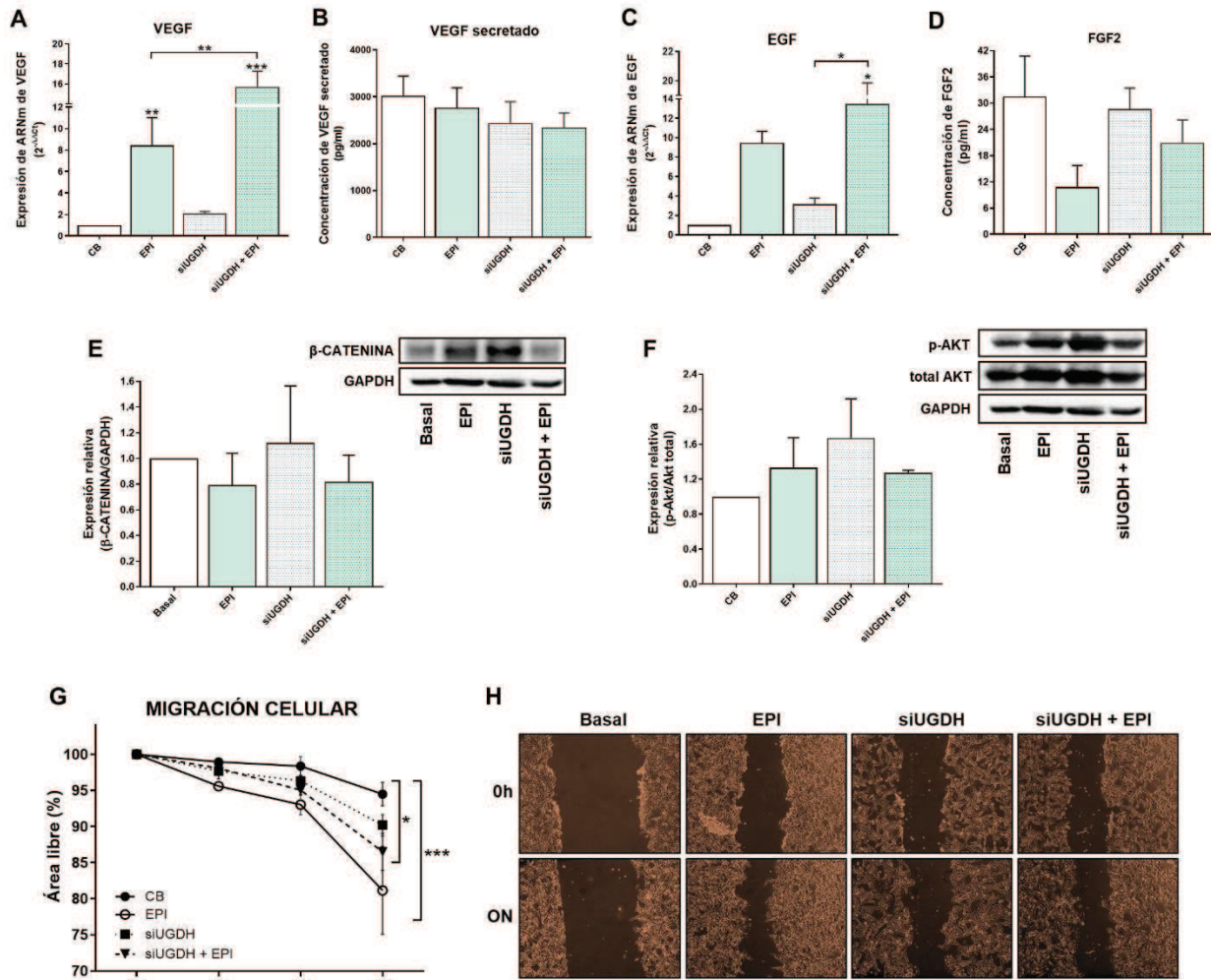


Figura 37. Evaluación de la respuesta angiogénica, proliferación y migración celular tras el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con un siRNA específico contra el gen UGDH (siUGDH) utilizando un siRNA de secuencia aleatoria como control negativo (siSCR). Después de 24 horas, se añadió una solución 1 μ M de EPI (1 EPI) para completar las 48 horas de incubación. La expresión de VEGF (A) y EGF (B) se determinó mediante RT-qPCR usando SYBR Green. Los resultados se normalizaron usando β -actina como gen de referencia y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los niveles de VEGF secretado en sobrenadantes celulares (C) y los niveles intracelulares de FGF-2 en lisados celulares (D) se midieron mediante ELISA. Se extrajeron las proteínas totales y se detectó la expresión de β -catenina (E) y p-AKT (F) por Western blot. Las imágenes muestran el más representativo de los tres experimentos independientes realizados. Para describir la capacidad de migración celular, se hicieron heridas de forma uniforme durante la transfección y el tratamiento con EPI. Se capturaron tres imágenes a las 0, 4, 8 y 22h en las mismas coordenadas. El tamaño de la brecha de las heridas se analizó utilizando el software ImageJ para determinar un área libre de células (G). Las micrografías muestran el más representativo de tres experimentos independientes (H). N = 3, como media \pm EEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Por otra parte, las células tumorales pueden generar resistencia a drogas mediante la modulación de vías de señalización específicas relacionadas con la supervivencia y la proliferación celular. En este sentido, decidimos analizar la posible modulación en las

vías Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt tras el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI. La expresión de las proteínas β -catenina y p-Akt se analizó mediante Western blot a partir de extractos celulares de proteínas totales. Cuando se evaluó la expresión de β -catenina se observó una tendencia a aumentar los niveles de expresión en respuesta al silenciamiento de la enzima UGDH. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en comparación con las condiciones basales o el tratamiento con EPI (*Figura 37E*). Finalmente, cuando estudiamos la expresión de la forma activa de la proteína Akt (p-Akt), no encontramos diferencias significativas entre los distintos tratamientos (*Figura 37F*).

En paralelo, se ha determinado la capacidad de migración de las células tumorales como otro proceso indicador del desarrollo de resistencia a drogas y la capacidad de diseminación durante la quimioterapia. Observamos que, en respuesta al tratamiento con EPI, las células MDA-MB-231 aumentaron su migración en comparación con las condiciones basales (EPI vs. CB $***p < 0,001$) (*Figura 37G y 37H*). El mismo efecto se observó cuando analizamos el silenciamiento de UGDH y el posterior tratamiento con EPI (siUGDH + EPI vs. CB $*p < 0,05$) (*Figura 37G y 37H*). Estos resultados indican que, contrariamente a lo esperado, el tratamiento con EPI promueve la migración de las células tumorales incluso en condiciones en las que se inhibió la enzima UGDH. Estos hallazgos concuerdan con las características agresivas de esta línea celular y su capacidad para desarrollar resistencia a EPI.

2.6.El efecto del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI en la autofagia

Varios estudios han demostrado que la autofagia puede proteger a las células tumorales de la muerte inducida por drogas antineoplásicas, por lo que la autofagia podría estar relacionada con el desarrollo de resistencia a estas drogas ²⁰⁰. Dado que observamos que, a pesar del incremento de la acumulación intracelular de EPI después del silenciamiento de UGDH no se hallaron niveles mayores de apoptosis, decidimos estudiar la modulación de la autofagia como un posible mecanismo involucrado en la resistencia a EPI en las células de cáncer de mama transfectadas con siUGDH. Primero, evaluamos la expresión del ARNm del marcador de autofagosoma, LC3-II (*Figura 38A*), donde observamos una regulación positiva en los niveles de LC3-II en respuesta al tratamiento con EPI en comparación con las condiciones basales (CB vs. EPI $***p < 0,001$). También encontramos un aumento en la expresión de LC3-II cuando las

células MDA-MB-231 se transfectaron con siUGDH y luego fueron tratadas con EPI, en comparación con la transfección con siUGDH (*Figura 38A*).

Dado que las diferencias encontradas en la expresión de LC3-II indican una posible modulación positiva de la autofagia en respuesta al tratamiento con EPI, decidimos continuar analizando la formación de autofagosomas en las células tumorales tras el silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI. Se llevó a cabo un sistema de co-transfección con los siRNA específicos (UGDH o SCR) en conjunto con un vector de expresión de una proteína de fusión LC3-II-GFP (proteína fluorescente verde) (*Figura 38C, 38D*). En línea con los resultados anteriores, detectamos un aumento en la formación de autofagosomas en respuesta al tratamiento antitumoral con EPI en comparación con el control basal (EPI vs. CB **** $p < 0,0001$). Además, encontramos niveles aumentados de autofagosomas positivos para LC3-II en las células MDA-MB-231 que primero habían sido silenciadas para UGDH y luego tratadas con EPI. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de la expresión proteica de LC3-I y LC3-II por Western blot. En tal condición, observamos que los niveles de proteína LC3-II eran relativamente aún más altos cuando se silenciaba la enzima UGDH antes de tratar las células tumorales con EPI (*Figura 38B*). En conjunto, estos resultados indicarían que las células de cáncer de mama responden al tratamiento con EPI favoreciendo la supervivencia del tumor y la adaptación al estrés generado por el tratamiento antitumoral. Además, observamos que la falta de UGDH podría favorecer el desarrollo de resistencia a EPI a través del proceso de autofagia. Cabe destacar que tanto el western blot como los experimentos de GFP-LC3 se realizaron utilizando cloroquina, un inhibidor específico de la autofagia, como control negativo.

Con el fin de establecer si la expresión de los marcadores de autofagia podría tener un impacto en el pronóstico del cáncer de mama, investigamos su relación con la supervivencia libre de recaídas de pacientes con tumores del tipo triple negativos bajo tratamiento quimioterapéutico (*Figura 38E y 38F*). Los datos de expresión génica de muestras tumorales de pacientes con cáncer triple negativo que recibieron quimioterapia (n = 181) se analizaron utilizando la herramienta en línea Kaplan-Meier Plotter ¹⁷⁴. Específicamente, observamos que la expresión de marcadores de autofagia específicos

como ATG16L1 y LC3-B se asoció con una menor sobrevida libre de recaídas (HR 1,58 y 1,04) (Figura 38E y 38F).

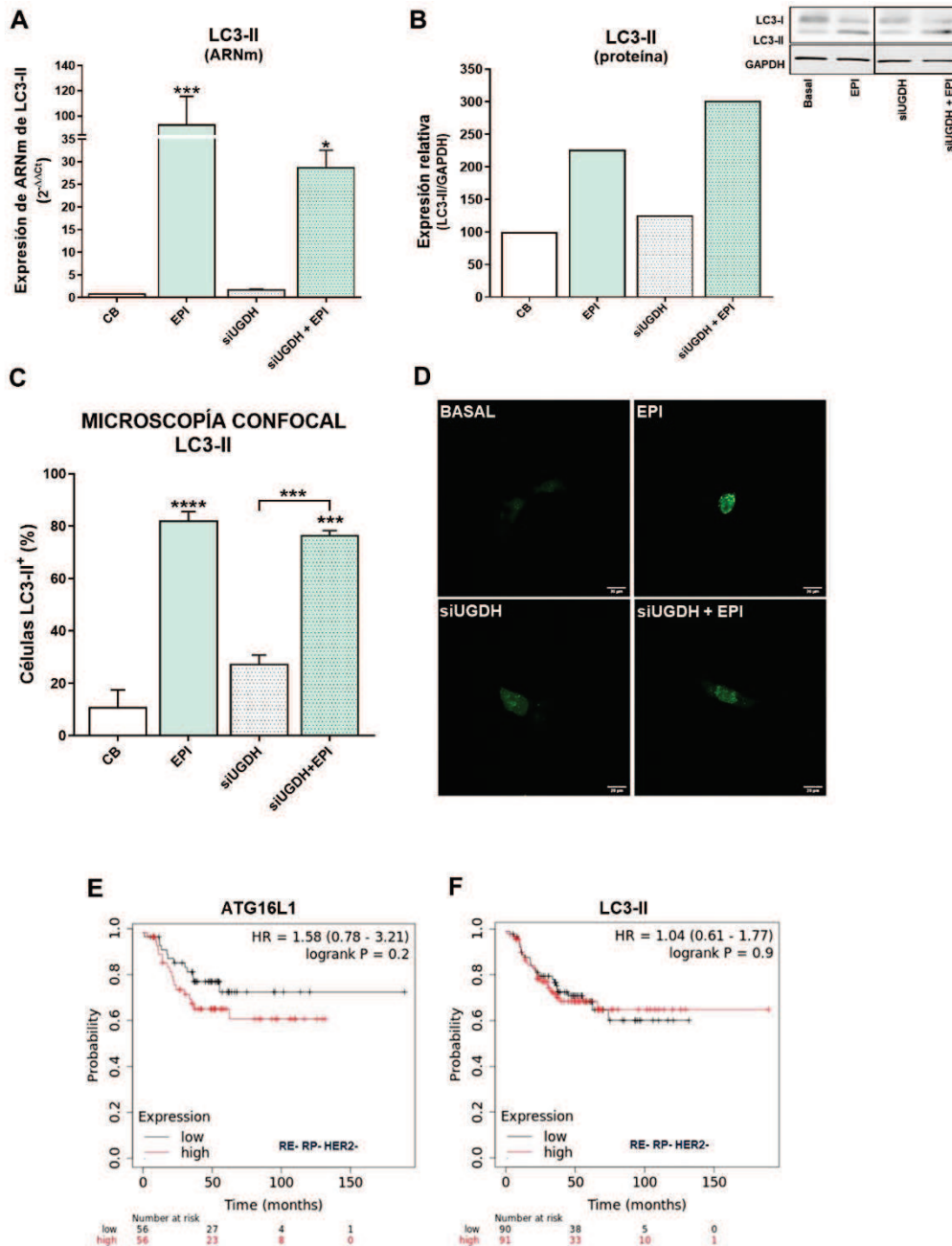


Figura 38. Análisis de la autofagia como mecanismo implicado en la resistencia a EPI. Las células MDA-MB-231 se co-transfectaron con un siRNA específico contra el gen UGDH (siUGDH) o un siRNA de secuencia aleatoria como control negativo (siSCR) y un vector de construcción específico para LC3-GFP. Después de 24 h, se añadió 1 μ M de EPI (1 EPI) para completar 48 h. La expresión de ARNm de LC3-II se determinó por RT-qPCR (A). Los resultados se normalizaron usando β -actina como gen de referencia y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. La transformación de LC3-I en LC3-II se evaluó mediante western blot, comparando ambas con la proteína de referencia GAPDH (B). Para analizar la formación de autofagosomas, se evaluó la fluorescencia emitida por GFP mediante microscopía confocal (D). El análisis de puntos LC3-II+ se realizó utilizando el software ImageJ (C). N=3, como media \pm EEM * p <0,05 *** p <0,001. **Relación entre la sobrevida de pacientes con cáncer de mama triple negativos y la expresión de ATG16L1 (E) y LC3-II (F).** Las curvas de sobrevida Kaplan-Meier se trazan en función de un grupo de pacientes triple negativos y tratados con quimioterapia (n = 181). Se muestran los valores p de rango logarítmico y los cocientes de riesgos (HR; intervalo de confianza del 95 % entre paréntesis). Los ID de Affymetrix correspondientes son: 232612_at_ATG16L1 y 208786_at_LC3-II.

2.7. Efectos del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI en la matriz extracelular y la expresión de AH

Continuamos estudiando los efectos del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI sobre la MEC tumoral y sus componentes, como el AH. Es bien sabido que la MEC tumoral modula el mecanismo de resistencia a drogas^{36,37,202}. Además, el UDP-GlcUA es un precursor para la síntesis de varios GAGs y PGs, y el silenciamiento de UGDH puede modular la producción por depleción de sustrato²⁰³. Para evaluar la capacidad de las células tumorales de generar una matriz intersticial o pericelular, se realizó un ensayo de exclusión de partículas sobre las células MDA-MB-231 durante la transfección con el siUGDH y el tratamiento con EPI.

Sorprendentemente, observamos que el área pericelular de las células MDA-MB-231 permaneció similar a las condiciones basales cuando se silenció la enzima UGDH (CB vs. siUGDH). Cuando las células tumorales se trataron únicamente con EPI como control, se observó un aumento significativo del área pericelular en comparación con las condiciones basales (CB vs. EPI $***p < 0,001$) (*Figura 39A y 39B*). Este efecto también se observó cuando las células tumorales se trataron con EPI luego del silenciamiento de la enzima UGDH, en comparación con el efecto producido por EPI (siUGDH + EPI vs. EPI $***p < 0,001$) (*Figura 39A y 39B*). El agregado de un control específico con una enzima hialuronidasa (HYAL) durante el ensayo nos permitió estimar qué fracción de esta matriz pericelular está compuesta en gran proporción por AH. En este caso, cuando las células tumorales fueron tratadas con HYAL antes de la adición de los glóbulos rojos, se observó una pequeña área pericelular, con una disminución estadísticamente significativa con respecto a las condiciones basales (CB vs. HYAL $***p < 0,001$) (*Figura 39A y 39B*). Todos estos datos indican que después del silenciamiento de la enzima UGDH, si bien las células MDA-MB-231 tenían una disponibilidad disminuida de la enzima UGDH para sintetizar UDP-GlcUA, igualmente se favoreció la síntesis de componentes de la MEC en esta condición.

Por otro lado, no todo el AH sintetizado permanece retenido en la membrana plasmática. Por lo cual, para determinar los niveles de AH que se secretaron al medio celular, realizamos un ensayo similar a ELISA utilizando una proteína de unión a AH específica (HABP). En este caso, no observamos diferencias significativas en la secreción de AH bajo el silenciamiento de UGDH o el tratamiento con EPI (*Figura 39C*).

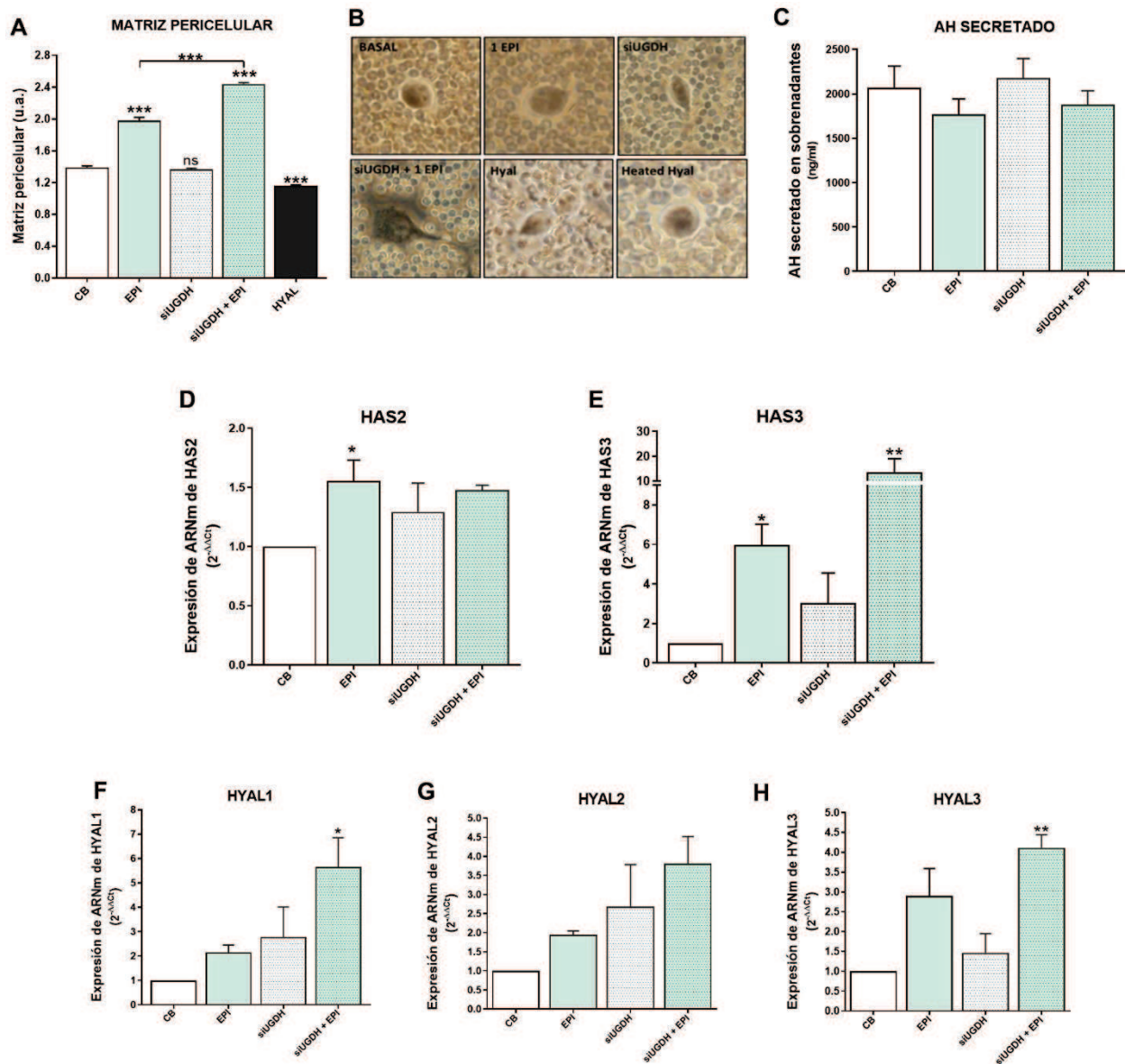


Figura 39. Evaluación de alteraciones en la MEC como consecuencia del silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con un siRNA específico contra el gen UGDH (siUGDH) utilizando un siRNA de secuencia aleatoria como control negativo (siSCR). Después de 24 horas, se añadió una solución 1 μ M de EPI (1 EPI) para completar las 48 horas de incubación. Para realizar el ensayo de exclusión de partículas, se añadieron a cada pocillo 2×10^7 glóbulos rojos fijados. Después de permitir la decantación, se capturaron y analizaron múltiples imágenes utilizando el software ImageJ (A). Las micrografías muestran el más representativo de tres experimentos independientes (B). La concentración de AH secretado en los sobrenadantes celulares se midió mediante un ensayo tipo ELISA (C). La expresión de HAS2 (D), HAS3 (E), HYAL1 (F), HYAL2 (G) y HYAL3 (H) se obtuvo mediante RT-qPCR utilizando SYBR Green o sondas Taqman[®] según correspondiera en cada caso. Los resultados se normalizaron usando β -actina como gen de referencia y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. N=3, como media \pm EEM * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

2.8. Modulación del metabolismo de AH: un equilibrio entre HASs y HYALs

Para continuar analizando la modulación de la síntesis del AH bajo el silenciamiento de UGDH y tratamiento con EPI, decidimos investigar una posible asociación entre los resultados obtenidos anteriormente y el metabolismo del AH, en cuanto a la modulación

de sus enzimas involucradas en su síntesis y degradación. Por esa razón, evaluamos la expresión de ARNm de (i) las enzimas sintetas del AH: HAS2 (Figura 39D) y HAS3 (Figura 39E); y (ii) enzimas degradantes del AH: HYAL1 (Figura 39F), HYAL2 (Figura 39G) y HYAL3 (Figura 39H). Cuando analizamos los niveles de expresión de HAS2 y HAS3, observamos un aumento en la expresión de ambas enzimas en respuesta al tratamiento con EPI (CB vs. EPI * $p < 0,05$). A su vez, el silenciamiento de la enzima UGDH combinado con el tratamiento con EPI aumentó aún más los niveles de expresión de ambas enzimas en comparación con el control basal (Figura 39D y 39E).

Además, se analizaron los niveles de expresión de las principales enzimas degradantes del AH. En todos los casos, observamos un patrón similar de aumento en la expresión de las tres enzimas, donde EPI *per se* pudo regular el aumento en la expresión de las tres HYALs en comparación con las condiciones basales. Más aún, encontramos niveles de expresión aún más altos de las enzimas HYALs cuando las células MDA-MB-231 se transfectaron primero con siUGDH y luego se trataron con EPI (Figura 39F, 39G y 39H). Tomando estos resultados en conjunto, podemos concluir que incluso bajo el silenciamiento de la enzima involucrada en la producción del sustrato de las HAS/HYALS para la síntesis de AH y un tratamiento antitumoral como la EPI, las células de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron capaces de favorecer la síntesis de este GAG. Aún más, las células tumorales respondieron a ambas condiciones aumentando la acumulación de MEC como otro mecanismo de resistencia a drogas.

2.9. Análisis de enriquecimiento funcional para proteínas relacionadas con UGDH

Debido a la importancia de analizar la funcionalidad a nivel de proteína de la UGDH y sus posibles interacciones con otros efectores celulares, utilizamos la herramienta bioinformática en línea STRING ¹⁸⁰ para encontrar redes de interacción funcional de la enzima UGDH y los productos de los distintos mediadores génicos analizados *in vitro* hasta este punto. La herramienta STRING generó redes de interacción de proteínas *in silico* para UGDH, UGT2B7, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2, HYAL3, VEGF, EGF, PI3K, AKT, β -catenina, ABCC1, ABCC2, ABCG2, ATG16L1 y LC3-II. El análisis STRING mostró que la enzima UGDH tiene interacciones cercanas solo con las enzimas UGT2B7, HAS2 y HAS3, lo que indica que está directamente involucrada en la síntesis de AH y las reacciones de glucuronidación. De hecho, la transferasa UGT interactúa con las bombas

de expulsión de drogas estudiadas, mostrando una relación entre las respuestas a la quimioterapia que requiere glucuronidación y la expulsión de dichas drogas (Figura 40A).

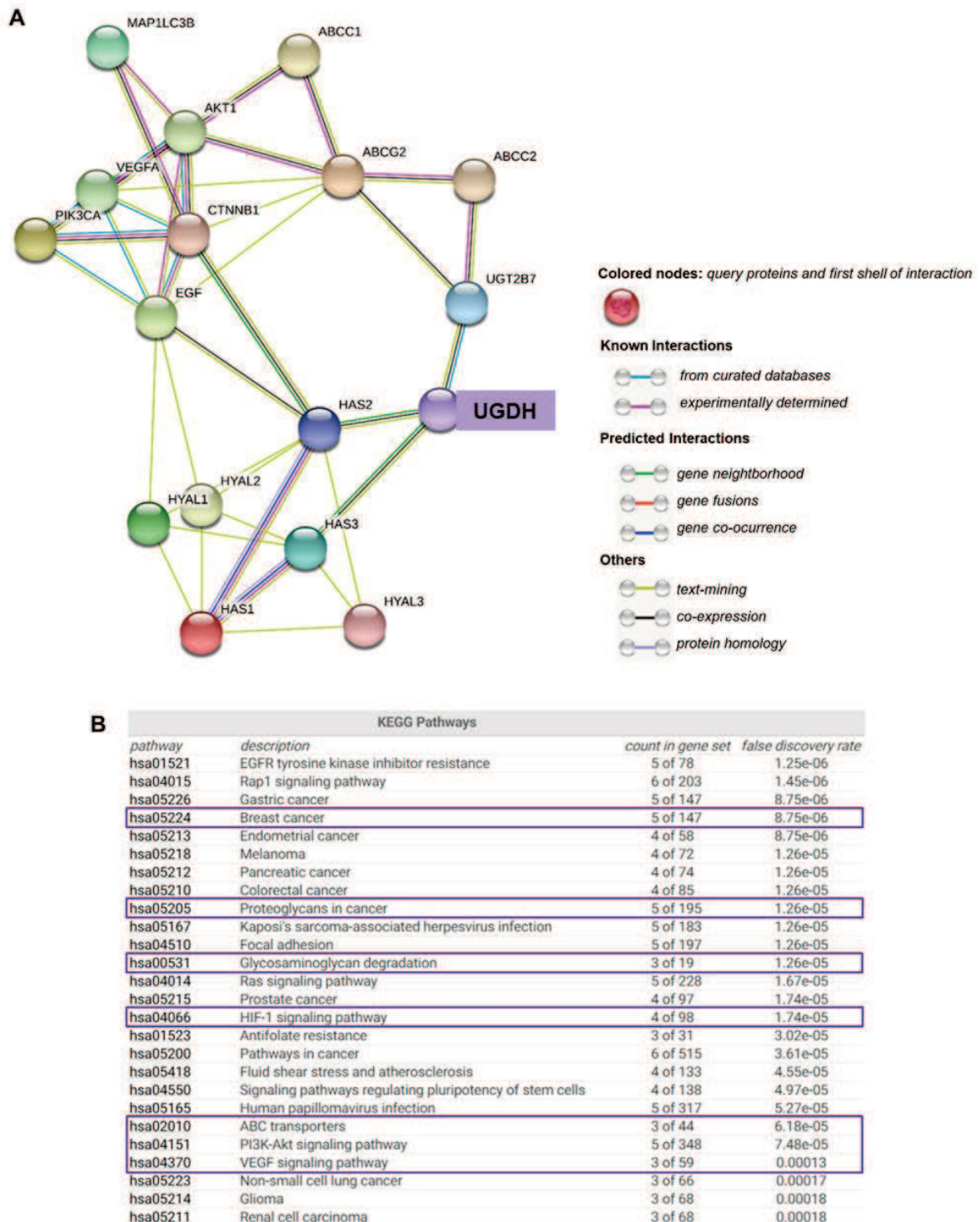


Figura 40. La compleja red de genes involucrados en la resistencia a drogas, el metabolismo del AH y la angiogénesis. Salida de la base de datos STRING® que muestra interactores físicos y funcionales de UGDH, UGT2B7, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2, HYAL3, PI3K (PIK3CA), AKT1, b-CATENINA (CTNNB1), VEGF, EGF, LC3-II (MAP1LC3B), ABCC1, ABCC2 y ABCG2 obtenidos de <http://string-db.org/>. Análisis GO (ontología de genes) (A). Análisis de la vía KEGG (B).

Como era de esperar, las enzimas relacionadas con el metabolismo de AH (HASs y HYALs) se interrelacionaron entre sí, mostrando una regulación estricta. El resto de las moléculas también demostraron estar interconectadas. Además, observamos que tanto las vías de señalización PI3K/AKT como Wnt sirven como enlaces entre los mecanismos evaluados en el presente trabajo: autofagia, angiogénesis, resistencia a drogas y metabolismo de AH (*Figura 40A*). A su vez, STRING implementa sistemas de clasificación conocidos como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Esta herramienta nos permitió analizar y comparar estadísticamente los diferentes procesos celulares en los que están implicados los efectores proteicos analizados por STRING. Curiosamente, el análisis KEGG nos permitió identificar vías de señalización vinculadas a tipos de cáncer altamente agresivos, como la angiogénesis (HIF-1 y VEGF), PI3K/Akt y la expresión diferencial de PGs y GAGs, y transportadores de drogas ABC (*Figura 40B*).



DISCUSIÓN

SECCIÓN 1: EFECTO DEL AH DE BPM SOBRE LA RESPUESTA A DOX Y LA RESISTENCIA A DROGAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

En el cáncer, el desarrollo de resistencia a las drogas utilizadas durante el tratamiento quimioterapéutico es una de las principales causas de progresión, recurrencia y mortalidad de la enfermedad. El MAT es un factor clave regulador del crecimiento y la progresión del tumor. Este MAT está formado por diferentes poblaciones de células (tumorales y células asociadas) así como por diversos componentes de la MEC, cuyas interacciones influyen en la sensibilidad a la muerte celular. Estos afectan consecuentemente a la respuesta farmacológica a drogas quimioterapéuticas, lo que involucra la aparición de mecanismos de resistencia ¹⁹³.

En el presente estudio, primero nos propusimos dilucidar si la interacción del AH, como componente de la MEC, con células tumorales de diferente origen histológico afectaba la respuesta al fármaco antineoplásico DOX. Para este fin, utilizamos líneas celulares tumorales derivadas de células hematológicas (células EL4 de linfoma T), adenocarcinoma basal de mama triple negativo (células MDA-MB-231) y tumores mesenquimales (células K12 de osteosarcoma) tratadas con AH de BPM y DOX. El agregado de AH de BPM se utilizó para adaptar la MEC tumoral al contexto mayoritariamente encontrado durante el desarrollo y progresión tumoral, donde las formas de BPM del AH son predominantes ^{39,42,44}. En ese contexto, se decidió estudiar cómo este entorno tumoral afectaría al tratamiento antineoplásico con la antraciclina DOX, y más aún, su impacto en el proceso de angiogénesis.

En primera instancia, analizamos la expresión del principal receptor del AH, CD44, y la capacidad de unión a AH que presentaban todas las líneas de células tumorales utilizadas, para descartar un comportamiento diferencial como consecuencia de la falta de expresión de CD44, o de una capacidad distinta de unirse al AH. En este sentido, se ha reportado que la interacción AH-CD44 está estrechamente asociada con las características tumorales agresivas de las células MDA-MB-231 ¹⁸¹ y que la expresión de CD44 contribuye a la agresividad en el osteosarcoma ²⁰⁴, así como en las neoplasias malignas hematológicas ^{205,206}. En el presente trabajo, las líneas celulares tumorales evaluadas mostraron altos niveles de expresión de CD44, detectando dos poblaciones

diferenciales en base a la intensidad de expresión del receptor (con expresión de CD44 alta y baja). Cabe destacar, que si bien existen otros receptores de membrana los cuales son capaces de unir AH eficientemente, solo nos centramos en la interacción con CD44 debido a que es considerado el principal receptor involucrado en los procesos mediados por AH que favorecen la progresión tumoral y la resistencia a drogas ^{46,194}. A su vez, CD44 es uno de los principales marcadores de CSC de distintos tipos de tumores ^{139,140}, por lo cual el estudio de su expresión en poblaciones tumorales puede ser un gran indicador del tipo celular utilizado para los estudios. No obstante, también se ha estudiado el rol del receptor de AH llamado RHAMM durante procesos inflamatorios y distintos tipos de cáncer ²⁰⁷ como colorrectal ²⁰⁸, de pulmón ²⁰⁹, estómago ²¹⁰, páncreas ²¹¹, mama ²¹², y también de origen hematológico como linfomas ²¹³. En dicho contexto, se ha demostrado que RHAMM puede mediar procesos como la migración celular y la reparación de heridas, así como también promover la transición epitelial-mesenquimal, mecanismos implicados estrechamente en la capacidad de invasión de las células tumorales y metástasis ²¹⁴. Interesantemente, se ha propuesto que RHAMM actúa generando interacciones con distintas proteínas y receptores de membrana, particularmente con el complejo AH-CD44 mediando así los procesos mencionados previamente ⁹². Es por este hecho que no se puede descartar un potencial rol de este receptor, el cual influir en los resultados hallados. Si bien su estudio no ha sido punto central en el presente estudio, podría ser clave para futuras investigaciones.

En nuestro análisis observamos también que las células tumorales usadas se unen al AH eficientemente, observándose también sub-poblaciones celulares que se unían a este GAG de forma diferencial. Si bien la importancia biológica de este hallazgo no se ha abordado en profundidad en el presente trabajo, esta heterogeneidad en la capacidad de unión a AH podría explicar el comportamiento diferencial de las células tumorales al ser tratadas con AH de BPM, pudiendo afectar la activación de las señales intracelulares (Wnt, PI3K, Rho-GTPasas) y el comportamiento celular. Otro aspecto importante a tener en cuenta es descartar la interferencia con el AH intrínseco sintetizado por cada tipo celular, el cual podría estar afectando los resultados obtenidos. Distintos antecedentes han mostrado que, al tratar diferentes líneas celulares tumorales con inhibidores de la síntesis de AH, se reduce la capacidad pro-angiogénica y proliferativa de dichas células ^{101,215,216}. Estos datos indicarían que no sólo puede intervenir el AH exógeno agregado durante el tratamiento, sino que el AH sintetizado por cada célula puede tener su efecto propio en el microambiente analizado. Por esta razón, decidimos evaluar las posibles

alteraciones de la MEC intrínseca de cada tipo tumoral al realizar el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX. En este punto, observamos que no se modificó la expresión, la secreción ni la acumulación del AH intrínseco de las células tumorales provenientes de un contexto tisular de adenocarcinoma mamario, hecho que permite determinar que los efectos encontrados *a posteriori* estuvieron relacionados con el agregado del AH de BPM exógeno. Sin embargo, el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX mostró ser capaz de aumentar la secreción de la fracción de AH soluble en el modelo de linfoma T en forma dosis dependiente. Esto no nos permite asegurar el AH endógeno propio de las células EL4 no pudiera estar interfiriendo en los resultados obtenidos posteriormente. Este hecho podría estar relacionado con la etiología diferencial de cada línea celular, así como con el método de crecimiento en cultivo. Las células MDA-MB-231 derivan de un tejido glandular mamario mientras que las células EL4 presentan características linfocíticas. Además, se ha demostrado que la interacción AH-CD44 está implicada en la capacidad de migración de linfocitos, tanto en condiciones fisiológicas o patológicas como el cáncer ²¹⁷, por lo cual la modulación de la expresión del AH podría estar sujeta a regulaciones características de este tipo celular. Más aún, se ha determinado un incremento en la concentración sérica de AH en pacientes con linfoma, siendo más altos los mismos en pacientes con enfermedad recurrente/resistente ²¹⁸, hecho que también concuerda con la modulación positiva de los niveles de AH secretados en las células EL4 de linfoma T ante el tratamiento con AH de BPM y DOX.

A su vez, es importante destacar que la MEC que generan las células tumorales es mixta y específica de cada tipo tumoral, en la cual pueden coexistir moléculas de AH en distintos rangos de PM, las cuales pueden cumplir funciones diferenciales dentro de dicho entorno asociadas al rango de PM que presentan ⁴¹. Igualmente, considerando esta posibilidad, el uso de AH de BPM mimetiza el contexto tumoral *in vivo*, donde ocurre una degradación de las formas de AH de APM. Además, las formas de AH de BPM compiten activamente por sitios de unión a sus receptores específicos con la forma de AH de APM. Por ello, en nuestros experimentos hemos utilizado AH considerado de BPM (1×10^5 Da – $3,3 \times 10^5$ Da), capaz de interactuar con CD44 e inducir señalización *per se* asociada a un contexto tumoral, la cual es específica y distinta a la inducida por el AH de APM ⁴³.

En nuestro trabajo, las células tumorales fueron expuestas al tratamiento con DOX debido a que esta droga se usa ampliamente como un fármaco antineoplásico para un

gran espectro de tumores ⁶. Para descartar una acción citotóxica exacerbada del fármaco durante los tratamientos, utilizamos dosis de DOX menores al valor IC₅₀ determinado para cada línea celular en las que los cambios de apoptosis inducida fueron mínimos. La resistencia a drogas desarrollada por las células tumorales puede surgir gracias a múltiples procesos, ya sea a través de la disminución del ingreso de las drogas, la activación de mecanismos de reparación y desintoxicación, el aumento del eflujo del fármaco por proteínas transportadoras dependientes de ATP, entre otros; eventos asociados al desarrollo de fenotipos tumorales resistentes ^{219,220}. Se ha demostrado que componentes de la MEC tales como el AH, son capaces de modular la respuesta a drogas afectando específicamente la expresión y función de diferentes bombas de expulsión de fármacos ^{148,221}. En el presente trabajo, el tratamiento con AH de BPM indujo una disminución en los niveles intracelulares de DOX solo en las células de linfoma T (EL4), sin impactar significativamente en la supervivencia celular ya que, en las condiciones evaluadas, los niveles de apoptosis se mantuvieron similares a las condiciones basales. Sin embargo, pudimos observar que estos resultados se encontraron en relación al aumento de la expresión de transportadores de membrana dependientes de ATP involucrados en el eflujo de la DOX, en particular de la bomba ABCB1, donde se pudo observar un aumento en 2 a 2,5 veces cuando se trataron con DOX en presencia del AH de BPM. Los resultados en conjunto sugieren que los componentes de la MEC de tumores de origen hematopoyético, específicamente el AH, podría impactar en la respuesta a la DOX, generando sub-poblaciones de células resistentes. Más aún, el AH podría estar involucrado en la transformación de células tumorales diferenciadas hacia un perfil de CSC ^{182,222}, caracterizadas por una alta expresión de transportadores dependientes de ATP de la familia ABC y otros marcadores asociados como CD44 ¹⁴⁰.

En contraste, nuestros resultados indicaron que el AH de BPM no modularía directamente la acumulación de DOX en células derivadas de tumores sólidos. Estos resultados apoyan la idea de que, dependiendo del contexto celular o tisular estudiado, las respuestas al tratamiento pueden ser diferentes, y que la MEC presenta un rol activo en dicha función. Cabe destacar que se ha definido el concepto de “resistencia estromal” durante el tratamiento antitumoral, dándole un rol clave a la MEC como mediadora de procesos fisicoquímicos que afectarían a la biodistribución y eficacia de los fármacos utilizados. Por un lado, se ha hallado que un aumento en la presión intersticial de los fluidos cuando la MEC es densa y compacta, efecto que genera que el fármaco no arribe a toda la masa tumoral ²²³. Además, la MEC tumoral ha mostrado ser responsable de

inducir mecanismos de sobrevida claves que evaden la respuesta a dicha droga, y generan en última instancia la reaparición del tumor ^{224,225}. En este sentido, debido a que el efecto modulador sobre la acumulación de DOX fue únicamente observado en las células EL4, las cuales presentan crecimiento en suspensión, decidimos realizar el mismo esquema de experimento en las células MDA-MB-231 siguiendo una estrategia de crecimiento tridimensional en tumorosferas, para simular de forma más acertada el contexto tumoral *in vivo* y contemplar en nuestro estudio a las interacciones entre células tumorales y su MEC. En estas condiciones tridimensionales de cultivo tampoco se encontraron diferencias en la acumulación intracelular de DOX ni en la inducción de apoptosis bajo el agregado de AH de BPM. Sin embargo, observamos una reducción significativa del tamaño de las tumorosferas en dichas condiciones. Este efecto era esperable debido a que el tratamiento con DOX debería estar alterando las señales de sobrevida y el crecimiento celular. Además, hallamos poblacionales diferenciales con distinta capacidad de acumular DOX, las cuales nos permiten hipotetizar un efecto compensatorio entre ambas que no refleja la modulación de este proceso en el porcentaje total de células analizadas. Si bien dichas poblaciones presentaron una capacidad diferencial para acumular DOX (alta y baja acumulación), las mismas mostraron valores similares de inducción de apoptosis. Este hecho nos indicaría que, si bien existen células con mayor capacidad de acumular DOX que otras, esas mismas células no están activando el proceso de apoptosis en tales condiciones, hecho que podría haber afectado al resultado del porcentaje total de células apoptóticas y que indicaría un grado de activación de mecanismos de resistencia mediados por el AH.

Si bien no se pudo determinar un rol activo significativo del AH de BPM durante el tratamiento con DOX en cáncer de mama, recientes estudios determinaron que el uso de nanopartículas cargadas con AH y DOX favoreció la biodistribución y eficacia de la DOX, demostrando marcados efectos antitumorales y antimetastásicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Más aún, se ha observado que el tratamiento favoreció la polarización de macrófagos asociados a tumor hacia un perfil pro-inflamatorio, el cual contribuyó al incremento de la eficacia del tratamiento con DOX ^{226,227}. Estos estudios destacan la importancia del MAT donde se desarrolla la enfermedad, ya que demuestran que el uso de nanopartículas no solo direcciona el tratamiento favoreciendo la distribución de la droga empleada hacia el sitio tumoral, sino que también colabora teniendo un rol activo en la modulación del entorno, lo que favorece aún más el efecto antitumoral. Resultados

semejantes se hallaron al estudiar la distribución y eficacia del tratamiento con DOX conjugado a nanopartículas de AH en distintos modelos de osteosarcoma ^{228,229}.

Otro de los mecanismos involucrados en la aparición de resistencia a drogas y la tumorigénesis es la modulación de vías que activan la supervivencia, la proliferación celular y la muerte celular por apoptosis ^{144,230–232}. Teniendo en cuenta estos conocimientos, estudiamos el efecto del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la activación de las vías Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt. La primera controla la polaridad celular y la auto-renovación, el ciclo celular y la proliferación ¹¹¹, mientras que la vía PI3K/Akt regula el crecimiento celular, la proliferación y la angiogénesis entre otras funciones celulares ²³³. A su vez, se ha demostrado que la vía de señalización Wnt favorece la angiogénesis mediante la regulación de la expresión de VEGF ²³⁴ e IL8 ²³⁵. Además, se ha observado que tras la quimioterapia con DOX en un modelo de cáncer gástrico, se produce la activación de dicha vía lo que promueve la invasión y metástasis ²³⁶. Más aún, la sobre-expresión de β -catenina estaría asociado a un fenotipo más agresivo y metastásico gracias a la activación de mecanismos de migración, observándose características asociadas a CSC ^{110,237,238}. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento con DOX en combinación con el agregado de AH de BPM incrementó la expresión de β -catenina en las células EL4 y MDA-MB-231. Cabe destacar que, en las mismas líneas celulares, tanto el AH de BPM y la DOX presentaron la capacidad de modular la expresión de β -catenina cuando se trataron las células de forma aislada con cada uno, mientras que el tratamiento conjunto con ambos intensificó aún más dicho efecto. Sin embargo, en las células K12 de osteosarcoma, solo el tratamiento combinado produjo aumentos en la expresión de β -catenina. Como se mencionó anteriormente, esto podría ser una consecuencia de la expresión diferencial de CD44 y la capacidad de unión a AH observada en las diferentes líneas celulares estudiadas. No obstante, estos hallazgos mostraron que el AH está involucrado en la respuesta de DOX, lo que altera la acción de la droga y favorece la progresión tumoral mediada por la señalización vía β -catenina.

Además, nos propusimos investigar los niveles de activación de la proteína Akt, evaluando su forma fosforilada, ya que se ha determinado que una activación aberrante y continua de esta vía está relacionada con la progresión y la resistencia a la quimioterapia en distintos tumores humanos ^{239,240}. Tal como fue demostrado y en concordancia con trabajos previos del propio laboratorio, el tratamiento con AH de BPM generó un aumento en la expresión de p-Akt, lo que demuestra la acción positiva de este

GAG sobre esta vía en las células tumorales EL4 y MDA-MB-231. Sin embargo, cuando las células tumorales se trataron con DOX, estas mostraron un comportamiento diferenciado. En el caso de las células EL4, el AH de BPM fue capaz de revertir la acción antitumoral de la DOX evidenciado por un aumento en la expresión de p-Akt. Sin embargo, no observamos una modulación en las células MDA-MB-231 tratadas con DOX en combinación con AH de BPM. Estos resultados podrían verse relacionados con el hecho de que el tratamiento con AH de BPM y DOX aumentó la síntesis y secreción de AH en el modelo de linfoma T, el cual podría estar induciendo una señalización diferencial que active dicha vía intracelularmente; hecho que no ocurrió en el modelo de adenocarcinoma mamario. En concordancia con lo expuesto anteriormente, se ha reportado que el tratamiento con AH fue capaz de favorecer la migración y la invasión de células de linfoma resistentes a DOX y vincristina por un mecanismo dependiente de PI3K ⁹⁹. En el caso de las células K12, la expresión de p-Akt no se logró detectar en nuestras condiciones experimentales, aunque utilizamos un anticuerpo capaz de detectar todas las isoformas activas posibles de p-Akt. Por lo tanto, no podemos dilucidar el papel de la vía de señalización PI3K/Akt en la línea celular de osteosarcoma en asociación con el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX. Existe evidencia que ha demostrado que en el perfil de “quinoma” (conjunto completo de proteínas quinasas codificadas en el genoma) de líneas celulares de osteosarcoma, la vía PI3K/Akt está activa y que su inhibición podría reducir la proliferación celular ²⁴¹. Sin embargo, los resultados expuestos no especifican si la inhibición de la señalización a través de p-Akt puede ser efectiva en el osteosarcoma, dado que se requieren más estudios para determinar si esta vía está activa en sub-poblaciones de este tumor considerado altamente heterogéneo. Más aun, considerando que la línea K12 de osteosarcoma murino se caracteriza por un bajo índice de crecimiento y de generación de metástasis *in vivo* ²⁴², se podría sugerir que el nivel de activación de p-Akt es bajo y no pudo detectarse en las condiciones de nuestros experimentos a diferencia de las otras líneas celulares donde sí fue detectada.

Tal como se mencionó previamente, el MAT es un entorno propicio para el desarrollo y diseminación tumoral caracterizado por la presencia de distintos tipos celulares con roles activos y determinantes dentro de dicho microambiente. Entre las células reclutadas al MAT se encuentran las CEs, mediadoras claves de la angiogénesis tumoral ²⁰. A su vez, ciertos estudios han demostrado que las células tumorales protegen a las CEs asociadas de la apoptosis causada post-radioterapia a través de la secreción de VEGF

y la posterior activación de vías de supervivencia²⁴³. Más aún, ha sido reportado que el tratamiento con DOX en una amplia variedad de tumores es capaz de inducir distintas respuestas en la célula tumoral para revertir su efecto, incluyendo la modulación de la angiogénesis tumoral^{187,244}. Sin embargo, la implicancia de los componentes de MEC en dicha modulación no ha sido estudiada en profundidad.

Teniendo en consideración estos antecedentes, nuestros estudios no se basaron únicamente en el análisis del comportamiento de las células tumorales bajo el tratamiento con AH de BPM y DOX, sino que también se evaluó el efecto de dicho tratamiento sobre las CEs asociadas a cada modelo tumoral *in vitro* e *in vivo*, donde hallamos un efecto no buscado en primera instancia durante el tratamiento quimioterapéutico: la modulación de la angiogénesis tumoral. En el MAT, el AH de la MEC regula la angiogénesis, y específicamente, las moléculas de BPM tienen una acción pro-angiogénica^{245,246}. En nuestro trabajo, presentamos resultados que afirman que el AH de BPM del estroma tumoral también podría afectar la acción anti-angiogénica de la droga DOX observada en las CEs^{247,248}. Diferentes investigaciones han demostrado que la DOX induce una resistencia diferencial en las CEs asociadas a tumores^{186,249}. Sin embargo, los mecanismos involucrados en dicho proceso no han sido ampliamente explorados. Como se esperaba, el AH de BPM optimizó la acción angiogénica propia de las células tumorales y, sorprendentemente, la DOX *per se* mostró un efecto similar. Cuando se combinó el tratamiento utilizando AH de BPM y DOX, se incrementó significativamente tanto la migración como la formación de vasos *in vitro* de las CEs estimuladas. Esto sugiere que el AH de BPM podría favorecer la progresión tumoral y alterar una respuesta al tratamiento quimioterapéutico con DOX aumentando la angiogénesis en tumores de origen epitelial y mesenquimal, como es el caso de osteosarcoma y adenocarcinoma mamario. Estos resultados observados *in vitro* se detectaron también en el modelo de adenocarcinoma mamario *in vivo*, donde se observó un aumento en la formación de vasos en el entorno tumoral cuando los animales fueron tratados con la combinación de DOX y AH de BPM. En el caso de las células K12, no fue posible establecer un modelo tumoral *in vivo*, en concordancia con las características poco tumorigénicas de dicha línea celular²⁴². Por otro lado, al evaluar la modulación del comportamiento de las CEs estimuladas en un entorno *in vitro* de linfoma T, el tratamiento con AH de BPM y DOX no activó mecanismos en las células tumorales que afecten consecuentemente el comportamiento angiogénico de las CEs *in vitro*. No obstante, la detección de la formación de vasos en nuestro modelo *in vivo* reveló que la DOX también podría afectar la

angiogénesis en presencia de AH de BPM en tumores de linfoma T. Este importante hallazgo confirma que la MEC que rodea al tumor puede afectar y reducir el éxito de la quimioterapia con antraciclinas en diferentes tipos de tumores por mecanismos asociados a la angiogénesis y, en consecuencia, favorecer la diseminación del tumor como una acción no deseada de la droga.

Para determinar el mecanismo mediante el cual las células tumorales eran capaces de estimular a las CEs bajo el tratamiento con AH de BPM y DOX, y debido a que VEGF es uno de los factores claves involucrados en la angiogénesis tumoral; primero decidimos investigar si el AH de BPM era capaz de modular los niveles de secreción de VEGF en las células tumorales. Sin embargo, no se halló una modulación positiva significativa en la secreción de dicho factor para las líneas EL4 y MDA-MB-231. De hecho, se observó una disminución en los niveles de secreción de VEGF en todas las condiciones de tratamiento utilizadas en las células K12. Estos resultados podrían explicarse por dos hallazgos. En primer lugar, VEGF165 presenta diferentes isoformas, cuya expresión y proporción son modulables: VEGF165a, la cual se ha demostrado que presenta un rol pro-angiogénico y VEGF165b, con actividad anti-angiogénica. Dado que el ensayo de ELISA utilizado para evaluar la biosíntesis de VEGF detecta indistintamente ambas isoformas sin poder diferenciar una de otra, podemos hipotetizar que los resultados observados en los medios condicionados podrían relacionarse con una compensación entre las isoformas pro y anti-angiogénicas detectadas por la técnica empleada. Más aún, se ha observado que distintas isoformas de VEGF pueden unirse selectivamente a GAGs sulfatados, como el heparán sulfato, interacción necesaria para la activación de receptores específicos y la transducción de la señal mediada por estos factores ²⁵⁰. Además, la unión selectiva de VEGF165a a una forma de AH sulfatado afecta la acción de este factor por retención a la MEC, lo que aumenta el efecto anti-angiogénico de la isoforma VEGF165b ²⁵¹. Este hecho podría indicar la posible unión de este tipo de factores a otros GAGs o PGs sulfatados de la MEC, hecho que afectaría su acción e que impediría observar la modulación de la secreción de este factor en los sobrenadantes tumorales.

En segundo lugar, existen otros factores angiogénicos liberados por las células tumorales que pueden modular el comportamiento de las CEs independientemente de la biosíntesis de VEGF, tales como la familia de FGF, EGF, ILs, entre otros ¹⁹⁰. Por lo tanto, el efecto pro-angiogénico observado podría deberse a algún otro factor capaz de

estimular a las CEs. Particularmente en osteosarcoma, factores específicos como la prolil-hidroxilasa-4, CCL3 y 5, IL34 e IL6 cumplen un importante rol en la angiogénesis y no fueron evaluadas en este trabajo ²⁵². Este hecho podría explicar que las terapias centradas en la disminución de la expresión de VEGF o las señales celulares mediadas por este factor fallen como consecuencia de los cambios en el MAT y la biodisponibilidad de otros factores pro-angiogénicos importantes durante el proceso de angiogénesis ^{188,190}.

En continuidad con lo anteriormente expuesto, se ha demostrado que FGF1 y el FGF-2 están sobre-expresados en tumores que recurren luego del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGFR ²⁵³, probablemente como un mecanismo compensatorio activador de la angiogénesis. En el presente trabajo, pudimos observar que el tratamiento con DOX en combinación con el AH de BPM causó una regulación positiva de la biosíntesis de FGF-2, hecho que podría estar asociado con el efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs. Como es sabido, la mayor parte de la fracción de FGF-2 sintetizada por las células tumorales se secreta hacia el exterior celular y permanece unida a los PGs de heparán sulfato en la membrana plasmática ²⁰⁰. Por lo tanto, es factible detectar este factor en extractos derivados de lisis celular en lugar de sobrenadantes. Por este hecho analizamos la biosíntesis de FGF-2 tanto en sobrenadantes como en extractos celulares de las células tumorales tratadas con DOX y AH de BPM para descartar que la adición del AH de BPM exógeno haya afectado la interacción entre los PGs y FGF-2, liberando a éste último al medio extracelular. Únicamente encontramos niveles detectables de FGF-2 solo en el ensayo realizado a partir de extractos celulares, por lo tanto, nuestros resultados podrían relacionarse con la retención de ciertas isoformas de FGF-2 en la membrana plasmática en interacción con otros componentes de la MEC, hecho que evidenciaría aún más el importante rol de la MEC tumoral. Además del efecto pro-angiogénico de FGF-2, se ha investigado que ciertas isoformas de FGF-2 no se secretan de la célula y se transportan al núcleo donde regulan el crecimiento o el comportamiento celular ^{254,255}. Por otro lado, distintos estudios revelaron que las células tumorales promueven la angiogénesis secretando vesículas extracelulares que pueden ser capturadas por las CEs. Estas vesículas extracelulares derivadas de tumores pueden transportar varios factores de crecimiento como FGF-2, VEGF, IL8 que activan la señalización pro-angiogénica en las CEs. Por lo cual, en este punto no podríamos descartar que el efecto pro-angiogénico observado *in vitro* sobre las CEs estimuladas con los sobrenadantes de las células tumorales estuviera mediado por

la secreción de vesículas extracelulares cargadas con factores de crecimiento, los cuales no es posible detectarlos por las técnicas utilizadas ²⁵⁶⁻²⁵⁸.

En concordancia con los resultados hallados en un contexto tumoral *in vitro*, se siguió la misma estrategia de tratamiento en modelos tumorales ectópicos *in vivo* para determinar la modulación de vías de la progresión tumoral, migración, angiogénesis y resistencia a drogas bajo el tratamiento combinado con AH de BPM y DOX. En este sentido, en el MAT propio de adenocarcinoma mamario bajo el tratamiento con AH de BPM y DOX se observó el favorecimiento del proceso de angiogénesis, la resistencia a drogas y la capacidad de diseminación tumoral. Particularmente, observamos la activación de la expresión de VEGF, efecto que no habíamos podido observar en las condiciones *in vitro*. Más aún, hallamos un incremento en la expresión de bombas de expulsión de antraciclinas dependientes de ATP, previamente asociadas a perfiles tumorales resistentes y menor sobrevida de pacientes con distintos tipos de cáncer ²⁵⁹. Este efecto también se observó al analizar diferentes perfiles de mutaciones presentes en dichos transportadores de membrana sobre-expresados ^{260,261}, hecho que resultaría de interés para futuros estudios. En línea con distintos reportes, observamos también un aumento en la expresión de mediadores del eje SDF1/CXCR4 *in vivo*, determinante de la capacidad de migración y diseminación celular ²⁶². En este sentido, se ha demostrado que fibroblastos asociados a cáncer endometrial promovieron la progresión de tumoral mediante señalización parácrina o autócrina dependiente de SDF1/CXCR4. A su vez, se ha definido a SDF1 α como un nuevo factor de mal pronóstico de sobrevida para dichos pacientes ²⁶³. Más aún, se ha observado que CD44 y CXCR4 interactúan físicamente en presencia de SDF1, lo cual evidencia que la señalización de CXCR4 inducida por SDF1 depende de la unión de AH a CD44 y que consecuentemente interviene en la activación de la migración celular ¹¹⁶. Finalmente, también se encontró una regulación positiva de enzimas implicadas en el metabolismo de AH, lo cual ha sido estrechamente relacionado con la capacidad de invasión en cáncer de mama ¹⁸¹, y el pronóstico y la sobrevida de pacientes con cáncer de vejiga ²⁶⁴, próstata ²⁶⁵ y colon ²⁶⁶. Por lo cual, tomando en conjunto los resultados obtenidos, estos nos brindan valioso conocimiento acerca del comportamiento del MAT *in vivo*, observando ciertas discrepancias con los resultados obtenidos *in vitro*. En estas condiciones no podemos descartar un efecto modulador del tratamiento con AH de BPM y DOX sobre la propia MEC tumoral en un contexto *in vivo*, ya que se observó un aumento en la expresión de enzimas HASs/HYALs. Teniendo en cuenta los antecedentes propios y de otros autores, resultará interesante evaluar la

biosíntesis y características del AH presente en la MEC tumoral *in vivo*, estudio que se retomará en continuidad a este trabajo de tesis.

Los datos previamente expuestos, hallados a partir de experimentos *in vitro* bidimensionales, tridimensionales y experimentos *in vivo* con modelos murinos nos demuestran que existe un efecto modulador del AH de BPM durante el tratamiento con la antraciclina DOX. El hecho de que el MAT fuera un entorno con alta proporción de AH de BPM logró favorecer la activación de señales de sobrevida y progresión tumoral que culminaron afectando la eficacia del tratamiento antineoplásico. Específicamente, el efecto modulador del AH de BPM sobre el tratamiento con DOX demostró ser independiente de una modulación en la biosíntesis de VEGF y mostró favorecer la expresión de factores pro-angiogénicos como FGF-2. Un aumento en la expresión de dicho factor resultaría clave en la angiogénesis tumoral, siendo un potencial responsable del efecto pro-angiogénico observado sobre las CEs tanto en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (Figura 41). Finalmente, estos resultados nos reafirman el rol activo que presenta la MEC en el entorno de desarrollo tumoral, no solo afectando las propias células tumorales sino otros tipos celulares asociados los cuales pueden alterar la eficacia de los tratamientos clásicos generando la llamada “resistencia estromal”.

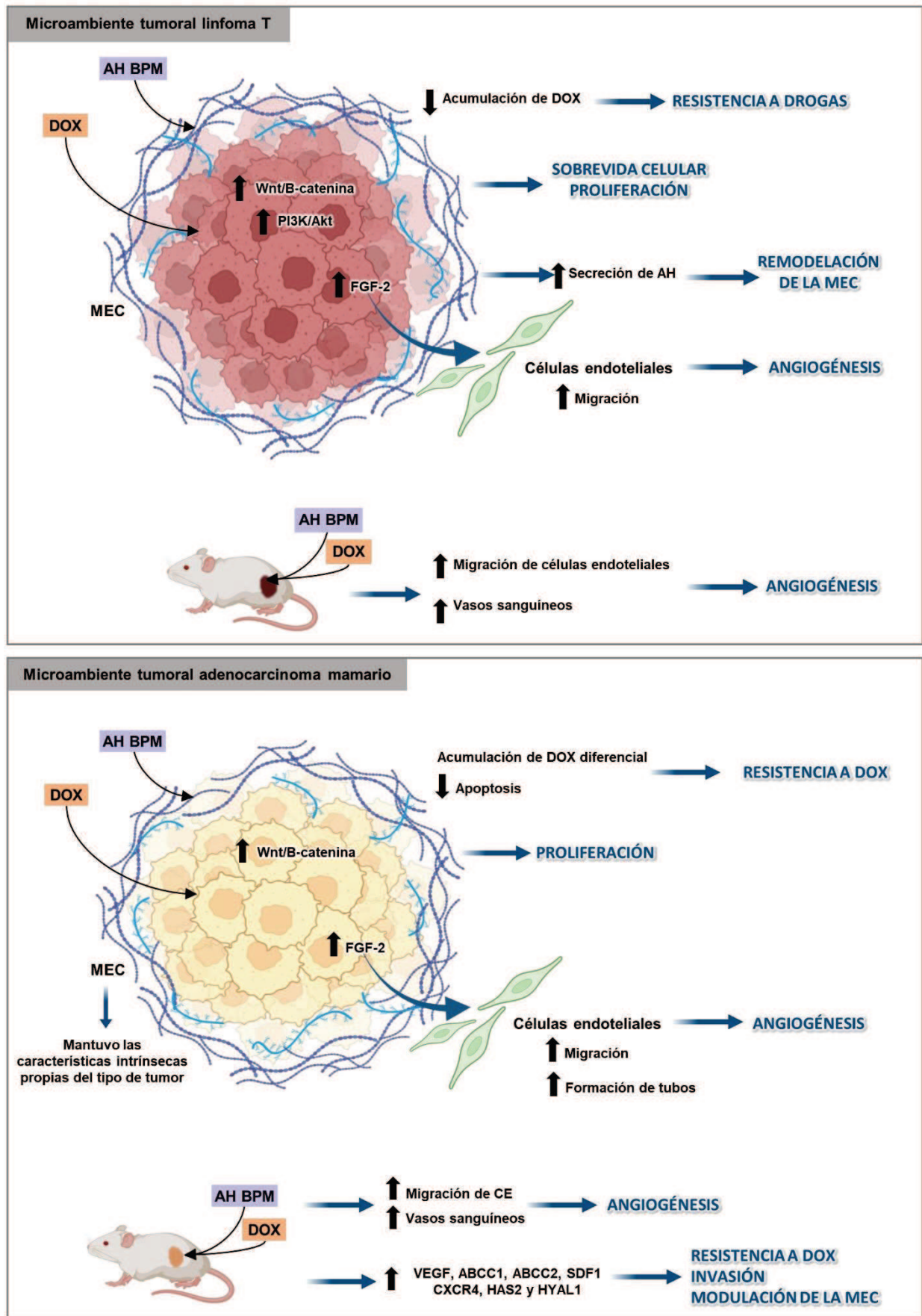


Figura 41. Resumen de los resultados obtenidos bajo el tratamiento tumoral *in vitro* e *in vivo* con AH de BPM y DOX

SECCIÓN 2: EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE LA SÍNTESIS DE AH ENDÓGENO SOBRE LA RESPUESTA A EPIRRUBICINA

La EPI es considerada uno de los fármacos más activos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama resistente a la terapia hormonal o cáncer de mama triple negativo ¹¹. Esta antraciclina es un derivado semisintético de la DOX la cual produce una eficacia similar a dosis equimolares con menos efectos adversos. Este efecto está dado por mecanismo de eliminación diferencial a la observada para la DOX, a través de una reacción de 4-O-glucuronidación ^{2,267}. Dicha reacción se produce principalmente mediante la adición de una molécula de UDP-GlcUA a la EPI, a través de la acción de una única enzima UGT-transferasa llamada UGT2B7 ^{12,268}. La enzima UGDH es la encargada de catalizar la oxidación de UDP-glucosa para formar el UDP-GlcUA, el cual no solo participa en reacciones de glucuronidación de fármacos sino también que actúa como sustrato para la síntesis de distintos GAGs y PGs. Por lo cual, la actividad de esta enzima UGDH está indirectamente influenciada por el nivel de glucosa celular y la síntesis de componentes de la MEC ^{163,195,269}. A su vez, diferentes estudios han analizado el rol de la UGDH como un marcador de progresión tumoral durante la quimioterapia con fármacos que se eliminan por glucuronidación.

En distintos trabajos se han planteado estrategias de silenciamiento de la UGDH en células de cáncer de mama para evaluar el rol como modulador del comportamiento tumoral ²⁷⁰, considerando que este hecho reduciría la disponibilidad de UDP-GlcUA intracelular. Esta reducción en la disponibilidad de UDP-GlcUA alteraría la composición de la MEC tumoral y las reacciones de glucuronidación que dependen del mismo, lo que consecuentemente podría afectar las respuestas a diferentes terapias tumorales. En el presente trabajo estudiamos por primera vez el nivel de expresión de la enzima UGDH y el silenciamiento de su expresión utilizando como modelo tumoral la línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 ²⁷¹. Además, se buscó evaluar el rol de dicha enzima durante la terapia antitumoral realizada con EPI y postular a la enzima UGDH y los genes asociados al metabolismo de AH como posibles biomarcadores pronósticos en cáncer de mama.

En primer lugar, analizamos la frecuencia de expresión de la enzima UGDH a nivel de ARNm en diferentes tipos de tumores sólidos con el objetivo de evaluar la relevancia de esta molécula y validar el uso de nuestro modelo de estudio. Por ello, investigamos en bases de datos públicas el valor pronóstico de sobrevida de pacientes con cáncer de

mama triple negativo en relación con la expresión de la enzima UGDH y de los principales genes implicados en el metabolismo del AH (HASs y HYALs), la angiogénesis (VEGF, FGF-2, EGF) y la resistencia a drogas (transportadores de fármacos ABC). Hemos observado que niveles más altos de expresión de la enzima UGDH se correlacionaban con un peor pronóstico (menor sobrevida) de pacientes con cáncer de mama triple negativo que habían recibido quimioterapia. Estos resultados pueden resultar controversiales con nuestros resultados, dado que el análisis de sobrevida realizado *in silico* se efectuó con un grupo de pacientes que habían recibido algún tipo de quimioterapia, sin poder especificar ni distinguir entre los fármacos utilizados para el tratamiento. Por lo cual, la estrategia de quimioterapia seguida en cada paciente no fue necesariamente realizada con antraciclinas o EPI, la cual se inactiva específicamente por glucuronidación y requiere de la acción de la enzima UGDH. Por otro lado, no hay que descartar el hecho de que los experimentos fueron llevados a cabo con una línea celular obtenida de una muestra proveniente de un único paciente con cáncer de mama triple negativo, lo que podría profundizar los resultados hallados. Por estos motivos, es posible encontrar discrepancias entre los resultados *in silico* y los obtenidos en nuestro estudio a partir de la línea MDA-MB-231. Cuando analizamos la asociación entre la expresión de genes relacionados con la enzima UGDH y la sobrevida de los pacientes, encontramos que, aumentos en la expresión de HAS2, HYAL1-2, VEGF y ABCC2 se relacionaban con un peor pronóstico. Estos resultados denotan la importancia de los procesos estudiados en el presente trabajo durante la progresión y el tratamiento antitumoral.

Ampliamos el estudio empleando muestras obtenidas de pacientes con cáncer de mama, donde analizamos la expresión del ARNm de UGDH en muestras tumorales y de tejido adyacente no tumoral obtenidas de cuatro pacientes con cáncer de mama caracterizados previamente en nuestro laboratorio según el estado de RE, RP, HER2 y Ki67 ¹⁷⁹. En tres de las cuatro pacientes, que fueron definidas como HER2-, observamos un aumento en la expresión de UGDH en el tejido tumoral en comparación con la expresión de esta enzima en el tejido adyacente no tumoral. Este resultado estuvo en concordancia con el aumento en los niveles de expresión de AH, HAS2 y BRCA1 y con datos publicados previamente por nuestro grupo de trabajo ¹⁷⁹. Resultados opuestos se observaron en la única paciente estadiada como HER2+, donde hallamos una disminución en la expresión de UGDH en el tejido tumoral respecto al tejido adyacente no tumoral, hecho que estuvo relacionado con una disminución en la expresión de AH y

en los niveles de HAS2 ¹⁷⁹. Si bien comprendemos que será necesario ampliar la cohorte de pacientes estudiadas para confirmar los resultados, este análisis complementa nuestros ensayos *in vitro* y propone un punto de partida para ampliar el estudio a más pacientes con cáncer de mama e incluso extenderlo a otros tipos de cáncer ²⁷².

Además, para ampliar el estudio a otros modelos *in vitro* de cáncer de mama, investigamos la expresión de ARNm de UGDH a partir de bases de datos públicas de microarrays de cuatro líneas celulares de cáncer de mama con diferente agresividad y estado de expresión de receptores hormonales y HER2. La mayor expresión de la enzima UGDH se observó en las células MDA-MB-231, mostrando además una regulación positiva de la expresión de UGDH en respuesta al tratamiento con EPI. Este hecho se relacionaría estrechamente con el fenotipo tumoral agresivo que presentan estas células (triple negativo - basal), ya que se ha demostrado previamente que en este tipos de pacientes una expresión incrementada de UGDH se relaciona con menor sobrevida ²⁷³. Además, las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (ambas estadificadas como HER2-) mostraron niveles más altos de expresión del gen UGDH en comparación con las otras líneas celulares consideradas HER2+. Todos los análisis realizados anteriormente respaldan nuestro trabajo con estas células como modelo para el estudio del cáncer de mama triple negativo. Y si bien se requieren más estudios para comprender la función de la enzima UGDH en pacientes con cáncer de mama y su relación con el metabolismo del AH, estos resultados en conjunto nos indican que la enzima UGDH se expresa diferencialmente en los distintos tipos de cáncer de mama y que los mecanismos en los que interviene esta enzima podrían estar alterados durante la progresión, el tratamiento y la diseminación de la enfermedad.

En relación con estos resultados, existen antecedentes que relacionaron la expresión de UGDH con distintos perfiles de expresión de HER2 en cáncer de mama. En un estudio realizado a través de datos obtenidos de microarrays con muestras de pacientes de cáncer de mama HER2-, se observó un aumento en la expresión de la enzima UGDH, resultado que se relacionó con la reprogramación metabólica de las células ²⁷⁴. Por otro lado, se reportó un aumento en la expresión de la enzima UGDH en células MCF-7 resistentes a la terapia con paclitaxel a través del análisis proteómico de proteínas relacionadas con el desarrollo de resistencia ²⁷⁵. Estos resultados denotan una relación entre la expresión de HER2 y UGDH. En este sentido, es importante recordar que la señalización AH-CD44 puede activar la familia de receptores de EGF (EGFR - dentro de

los cuales se encuentra HER2) e inducir la activación de la vía PI3K/Akt, mediadora de procesos claves en la progresión tumoral ²³⁹. Más aún, se determinó que la activación del receptor HER1 favorece la activación de UGDH por fosforilación en cáncer de pulmón, hecho que favoreció la metástasis ¹⁶³. Por lo cual podría existir algún mecanismo compensatorio que aumente la expresión de UGDH ante la carencia de HER2 en cáncer de mama, hecho que aún no ha sido abordado en profundidad en nuestra investigación.

Luego, continuamos evaluando el rol de la enzima UGDH durante el tratamiento con EPI utilizando la línea celular tumoral MDA-MB-231. Hemos observado que las células MDA-MB-231 expresan la enzima UGDH, y hemos encontrado un efecto similar al informado anteriormente ⁶⁹, donde la expresión de UGDH se reguló positivamente en respuesta al tratamiento con EPI. La sobre-expresión de UGDH podría promover la eliminación de este fármaco citotóxico de las células tumorales, hecho que podría estar relacionado con una mayor demanda de UDP-GlcUA, el cual es crucial para conjugar EPI y promover su eliminación de las células tumorales.

El punto clave de nuestro estudio fue investigar el efecto del silenciamiento de la enzima UGDH sobre la actividad antitumoral de EPI, estudiando procesos como la apoptosis, la proliferación, la migración, la autofagia y la angiogénesis. De hecho, distintos antecedentes han planteado que la resistencia a la EPI puede ocurrir a través de diferentes mecanismos relacionados, incluida la resistencia mediada por aumento de la expresión de bombas de expulsión dependientes de ATP, cambios en la actividad de la topoisomerasa II, la inducción de proteínas de choque térmico y la inhibición de vías apoptóticas ²⁷⁶⁻²⁸⁰. Sin embargo, son escasos los estudios que asocian el silenciamiento de la enzima UGDH con la generación de una MEC que favorezca el desarrollo y la resistencia del tumor, afectando la actividad antitumoral de la antraciclina EPI. En este sentido, observamos que el silenciamiento de la enzima UGDH combinado con el tratamiento con EPI no modificó la viabilidad celular ni la citotoxicidad, por lo que una posible modulación en el comportamiento de las células MDA-MB-231 podría ser consecuencia únicamente del efecto de la reducción de la expresión de UGDH y no de la mortalidad de las células. Contrariamente a nuestras expectativas, encontramos una disminución significativa en la inducción de apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que habían sido silenciadas para UGDH y luego tratadas con EPI. Aunque las células tumorales transfectadas con el siUGDH acumularon una mayor cantidad de EPI, este hecho no fue suficiente para aumentar los niveles de apoptosis observados en

las mismas condiciones. Resulta importante destacar que mediante el análisis de citometría de flujo encontramos dos poblaciones bien diferenciadas de células tumorales MDA-MB-231 con diferente capacidad de acumular EPI tras silenciar la enzima UGDH, efecto que no fue observado en las condiciones basales ni durante la transfección con un siRNA control. Específicamente se observó una población celular con mayor acumulación de EPI que la otra, resultado que podría indicar algún grado de desarrollo resistencia por parte de la población que acumuló menor EPI. Esta población podría ser la responsable de la disminución del nivel de apoptosis observado en dichas condiciones.

Estos resultados podrían relacionarse con el hecho de que después de silenciar la expresión de la UGDH, habría menos enzima disponible para producir UDP-GlcUA, y el UDP-GlcUA podría encontrarse en una proporción reducida dentro de las células tumorales. Por ello, habría menos glucuronidación de EPI de la necesaria para eliminar el fármaco. Sin embargo, en este punto se hubiera esperado un aumento en los niveles de apoptosis inducida en esas condiciones, por lo cual podríamos pensar que, si bien las células acumularon más EPI, algún proceso celular estaría impidiendo su efecto antitumoral. Existen diferentes aspectos y antecedentes a tener en cuenta que soportan esta conjetura. En primer lugar, el análisis de la acumulación intracelular de EPI mediante citometría de flujo no refleja directamente la actividad de este fármaco ni el grado de glucuronidación, ya que tanto las formas activas como inactivas de esta droga presenta igual capacidad de producir fluorescencia ^{281,282}. Por otro lado, al no haber realizado algún protocolo de fraccionamiento celular, la técnica empleada no nos permite determinar la localización intracelular de la EPI donde debería ejercer su acción. Por lo tanto, podemos plantear la hipótesis de que la droga podría estar fuera del núcleo evitando su principal mecanismo de acción sobre el ADN y, por lo tanto, afectando sus efectos citotóxicos. Otra hipótesis podría ser que la EPI se encuentre en su forma inactiva, ya conjugada al UDP-GlcUA pero que aún no haya sido detectada su eliminación de las células tumorales por los tiempos de ensayo empleados. Este UDP-GlcUA podría provenir de una fuente que no dependa directamente de la enzima UGDH; por ejemplo, a partir de la degradación del AH presente en la MEC tumoral. Además, es necesario tener en cuenta que el silenciamiento del gen UGDH no implica que las enzimas previamente sintetizadas y aún disponibles en dicho momento de la vida de la célula no puedan continuar ejerciendo su acción, produciendo UDP-GlcUA en forma compensatoria a la inhibición de su expresión. Por lo cual, el análisis de los niveles

proteicos y la actividad de la enzima UGDH disponible en las células sería un punto clave para futuros estudios.

Tal como se mencionó anteriormente, unos de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de resistencia a la EPI es la regulación positiva de la expresión de distintos transportadores de membrana asociados al eflujo de fármacos, los cuales son dependientes de ATP. De hecho, el tratamiento de EPI llevado a cabo durante el silenciamiento de la enzima UGDH favoreció un aumento en la expresión de los transportadores ABCC1, ABCC2 y ABCG2 implicados en la expulsión de la EPI desde interior celular. Retomando la idea de que se encontró mayor acumulación de EPI y menor inducción de apoptosis en dichas condiciones, el aumento de la síntesis de las bombas de expulsión podría reforzar la hipótesis de que no se haya logrado visualizar esta modulación positiva del eflujo de EPI por los tiempos de ensayo utilizados. Si bien en el presente estudio no analizamos posibles cambios en la expresión proteica ni la funcionalidad de las bombas, existen antecedentes en cáncer de vejiga que indican que un aumento en la expresión de estas bombas está relacionado con la funcionalidad de las mismas. Más aún, se demostró la estrecha implicancia de la sobre-expresión y funcionamiento de las bombas de expulsión de drogas ABC en el desarrollo de resistencia a EPI empleando la misma metodología empleada en este estudio ²⁸³

A su vez, se observó un incremento en la expresión de la transferasa UGT2B7 (encargada de inactivar a la EPI por transferencia de UDP-GlcUA) bajo el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI. Este resultado se mostró en relación con antecedentes en que demuestran que la sobre-expresión de UGT2B7 en cáncer de hígado resultó ser dependiente de EPI y de la activación de la vía p53, hecho que podría contribuir a la resistencia a la quimioterapia y a la cardiotoxicidad reducida de EPI ²⁶⁸. Otro estudio propone estudiar a esta transferasa como un marcador pronóstico de la eficacia y la toxicidad de la EPI en pacientes con estadios tempranos de cáncer de mama ²⁸⁴. Estos antecedentes expuestos en conjunto con los resultados obtenidos en nuestro modelo de estudio nos indica que bajo el silenciamiento de la enzima UGDH se produjo la activación de un mecanismo de resistencia ante el incremento de la acumulación intracelular de EPI y la falta de activación del proceso apoptótico. No obstante, queda por evaluar cuál es el estado fármaco-bioquímico de la molécula de EPI en el interior celular, que sería responsable de su inactividad y su mayor acumulación.

Es importante destacar que se hallaron resultados similares en cáncer de próstata, donde los andrógenos utilizados como tratamiento antitumoral se inactivan mediante el mismo mecanismo de glucuronidación que la EPI. Particularmente, se observó que las células resistentes al tratamiento con andrógenos mostraban mayor expresión de UGDH y de las transferasas UGT2B15 y UGT2B17 responsables de la glucuronidación en páncreas. Más aún, se informó que el silenciamiento de la enzima UGDH aumentó la producción de UDP-GlcUA, lo cual activó la glucuronidación de los andrógenos intracelulares y su expulsión, observándose mayores niveles de andrógenos glucuronidados en los sobrenadantes de las células tumorales. Este hecho promovió el crecimiento de las células tumorales y el desarrollo de resistencia a dichas drogas ²⁶⁹. Los autores también observaron una remodelación de la MEC tumoral ya que el UDP-GlcUA y otros UDP-azúcares promovieron la expresión alterada de PGs y GAGs en la superficie celular ^{70,269}.

Continuamos evaluamos el rol de la enzima UGDH en la angiogénesis y la migración celular. Al analizar los niveles de ARNm de VEGF y EGF, las células MDA-MB-231 regularon positivamente la expresión de ambos bajo el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI. No obstante, no logramos encontrar una modulación positiva en los niveles de biosíntesis y secreción de VEGF. Este hecho podría relacionarse con que las muestras procesadas para obtener ARN y sobrenadantes fueron tomadas al mismo tiempo, por lo que tal vez el efecto de activación transcripcional no lograría verse al mismo tiempo a nivel proteico. Además, tal como fue discutido previamente, la técnica de ELISA empleada en el trabajo es capaz de detectar las isoformas pro-angiogénicas y anti-angiogénicas de VEGF165a, lo que podría ejercer un efecto compensatorio en los resultados encontrados. A su vez, podrían verse involucrados mecanismos de regulación post-transcripcionales que afecten consecuentemente la síntesis de dichos factores; eventos que no fueron estudiados en el presente trabajo ²⁸⁵. Paralelamente, se observó un aumento en la migración de las células tumorales bajo el silenciamiento de UGDH y el tratamiento con EPI, efecto promotor de la progresión tumoral. En relación con este resultado, tal como se mencionó previamente, a través de la activación de EGFR (familia de los receptores ErbB) la UGDH se fosforila y se activa, lo cual aumenta el consumo de UDP-Glc en la célula. Este mecanismo atenúa la inhibición mediada por UDP-Glc del ARNm del factor SNAI1 involucrado en la transición epitelial-mesénquimal, favoreciendo su traducción, y activando la invasión y metástasis ¹⁶³.

Por otro lado, uno de los procesos recientemente relacionados con la resistencia a drogas es la autofagia ²⁸⁶. Este proceso se activa bajo estrés celular y permite el reciclaje de macromoléculas y organelas, inhibiendo la apoptosis de las células tumorales ²⁸⁷. En el presente estudio se demostró una modulación positiva de la autofagia dada por un aumento en la expresión de marcadores de este proceso (LC3-II) y la presencia de autofagosomas en respuesta al tratamiento con EPI. Dichos efectos también se observaron en respuesta al silenciamiento de UGDH y al posterior tratamiento con EPI. Aún más, observamos que incrementos en la expresión de los marcadores de autofagia ATG16L1 y LC3-II se asociaron con una menor sobrevida libre de recaídas en pacientes con cáncer de mama triple negativo (*in silico*). De acuerdo con los resultados obtenidos, existe evidencia que la autofagia protegió a las células MCF-7 de la apoptosis inducida por EPI y facilitó el desarrollo de resistencia ¹⁵¹. A su vez, se ha demostrado que la inhibición de la autofagia mejoró la respuesta a EPI en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo sensibles y resistentes, por lo que inhibir este proceso podría proponerse como una nueva estrategia de tratamiento eficaz para esta enfermedad ²⁸⁸. Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, la autofagia es un proceso clave involucrado en la respuesta a drogas, la progresión tumoral y la sobrevida de los pacientes con cáncer de mama. Por lo cual, estos resultados y antecedentes indican que, a pesar de estar bajo tratamiento antitumoral con EPI y con menor disponibilidad de la enzima UGDH, las células tumorales fueron capaces de activar varios mecanismos directamente relacionados con la progresión tumoral y la resistencia a drogas, incluida la autofagia.

Por otro lado, consideramos importante resaltar que las células tumorales son capaces de modular sus MAT para evitar la acción de los fármacos utilizados como quimioterapia ²⁸⁹. De acuerdo con la relación entre la enzima UGDH y la síntesis de AH, existen datos controversiales sobre la modulación de la expresión de este GAG. Primero, se ha demostrado que una función disminuida de la enzima UGDH (ya sea por la utilización de un siRNA o por el fármaco 4-MU, que afecta los niveles de UDP-GlcUA) en células de músculo liso aórtico ^{37,195} y queratinocitos humanos ²⁹⁰ redujo significativamente la producción de AH de la MEC. En concordancia, Wang et al. demostraron que la inhibición de la expresión de UGDH disminuyó significativamente la capacidad invasiva de las células de carcinoma colorrectal HCT-8 en combinación con una reducción en la expresión de diferentes GAGs ⁶⁹. Sin embargo, los experimentos se llevaron a cabo sin el uso de un agente quimioterapéutico como una antraciclina.

Teniendo en cuenta la relevancia de la enzima UGDH sobre la expresión de componentes de la MEC, se analizó el efecto del silenciamiento de la UGDH durante el tratamiento con EPI sobre el metabolismo del AH y la matriz pericelular de las células tumorales. Si bien observamos que las células MDA-MB-231 tenían menor disponibilidad de UGDH para sintetizar UDP-GlcUA, las células presentaron una mayor MEC pericelular en dichas condiciones, la cual estaba compuesta principalmente por AH. Sin embargo, no encontramos diferencias en la secreción del AH al medio extracelular de dichas células. Teniendo en cuenta estos resultados, podría existir algún mecanismo compensatorio activado ante el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI que favoreciera la síntesis de los componentes de la MEC que quedan retenidos en el área pericelular de las células tumorales.

Continuamos el estudio analizando la expresión de las enzimas HASs y HYALs como componentes esenciales del metabolismo de AH. El silenciamiento de la UGDH combinado con el tratamiento con EPI incrementó los niveles de expresión de HAS3, pero no de HAS2, guardando estrecha relación con los datos obtenidos al analizar el área pericelular y el AH secretado al medio celular. Esto nos permite hipotetizar y relacionar el hecho de que la enzima HAS3 presenta un rol clave en la síntesis del AH que queda anclado a nivel de la membrana plasmática celular, mientras que HAS2 se encuentra en relación con el AH solubilizado al medio celular ^{36,291}. En este sentido, se correlacionaron mayores niveles de expresión de HAS3 con el aumento en el área pericelular de las células. En el caso de la HAS2, donde observamos menor modulación, correspondiente a que no hallamos una modulación de los niveles de AH solubles. A su vez, resultaría interesante estudiar el peso molecular del AH producido por las células tumorales debido a que las distintas isoformas de las HASs sintetizan diferencialmente cadenas de AH de distintos pesos moleculares ⁵¹ y que según el rango del mismo, el AH podría ejercer funciones bien diferenciadas en el MAT ³⁶.

Si bien fue sorpresivo el incremento en la expresión de las HYALs considerando una mayor área pericelular, estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que, en ausencia de UGDH, las células de cáncer de mama requieren una nueva fuente de UDP-GlcUA para sintetizar AH (y otros GAGs y PGs). Este efecto sobre la síntesis de las enzimas HYALs que degradan el AH podría favorecer este proceso compensatorio, ya que se degradaría el AH y se obtendrían los precursores del mismo (UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc), dejándolos nuevamente disponibles para que puedan ser utilizados en

procesos como la glucuronidación de EPI y la síntesis de GAGs y PGs de la MEC. A su vez, el aumento en la expresión de las enzimas HYALs puede estar relacionado con la modificación del peso molecular del AH, más que en su degradación propiamente dicha. Esto concuerda con un aumento en el área pericelular a pesar de un incremento en la expresión de las HYALs; y con el favorecimiento de formas de AH de BPM altamente promotoras de la resistencia tumoral. No obstante, el aumento en la expresión de dichas enzimas no necesariamente implica un aumento en la actividad de las mismas. Nuestros resultados concuerdan con antecedentes publicados en cáncer de próstata, donde se demostró que, al sobre-expresar la enzima UGDH durante el tratamiento con andrógenos, la síntesis de AH no se vio estimulada ²⁶⁹. Por lo cual, sería sumamente importante determinar el grado de actividad de las enzimas HASs y HYALs más allá de estudiar su expresión, como también el análisis de los UDP-azúcares disponibles en las células MDA-MB-231 de forma de determinar si el aumento en la expresión implica un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de AH.

Si bien en el presente trabajo no se analizó la expresión de UGDH a nivel proteico, se realizó una aproximación mediante herramientas bioinformáticas. Por ello, se realizó el análisis con la herramienta STRING el cual analiza y predice las interacciones y/o relaciones entre distintos efectores proteicos. El mismo mostró que las vías de señalización de PI3K/Akt y Wnt interrelacionan proteínas en la autofagia, angiogénesis, resistencia a drogas y metabolismo del AH evaluados en el presente trabajo. La UGDH está directamente involucrada en la síntesis del AH y en reacciones de glucuronidación. De hecho, la transferasa UGT2B7 mostró interactuar con las bombas de eflujo estudiadas, mostrando una relación entre la respuesta a la quimioterapia que requiere glucuronidación y el eflujo de fármacos. Como era de esperar, las enzimas relacionadas con el metabolismo de AH (HASs y HYALs) se interrelacionaron entre sí, mostrando una regulación estricta. No obstante, sabemos que es necesario realizar más investigaciones para confirmar estos nuevos hallazgos, no solo en cáncer de mama sino en otros tipos de tumores.

En resumen, el resultado esperado luego de disminuir la disponibilidad de la enzima UGDH era obtener una reducción en la MEC y aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la EPI, reduciendo el efecto mencionado como “resistencia estromal”. Por el contrario, observamos que el silenciamiento de UGDH no logró reducir la MEC; y más aún cuando las células carentes de UGDH fueron expuestas al tratamiento con la

antraciclina EPI. Esto nos indica que las células tumorales presentaron un mecanismo de compensación para la producción de AH y para el desarrollo de resistencia a la EPI, activando mecanismo tales como la autofagia, la angiogénesis y la migración celular, y conduciendo a la reorganización de los componentes de la MEC como el AH, eventos que consecuentemente favorecen la progresión tumoral (Figura 42).

En este proceso, el rol de la UGDH es crucial, por lo que se puede proponer como un potencial marcador de progresión tumoral durante la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama.

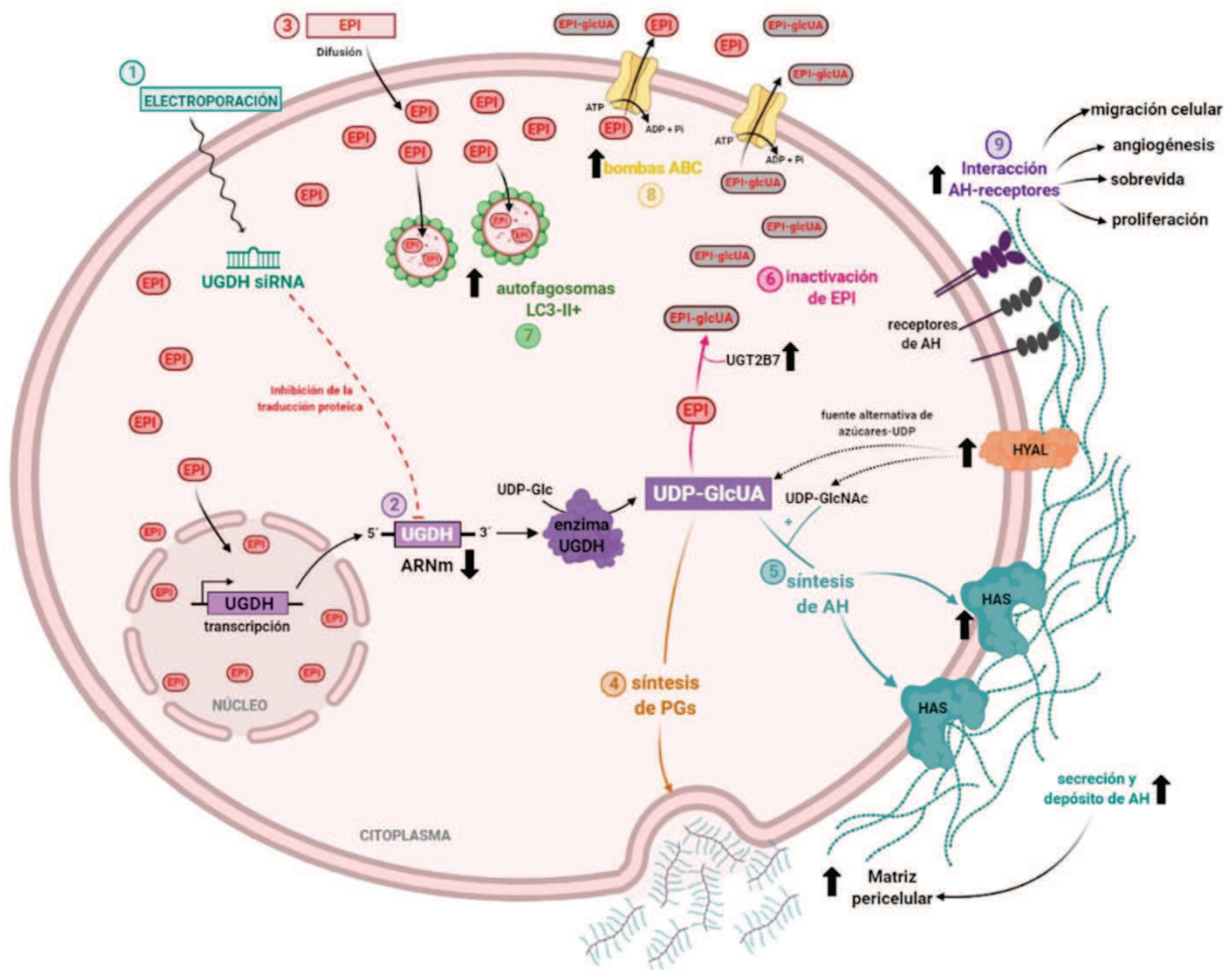


Figura 42. Resumen de los resultados obtenidos bajo el silenciamiento de la enzima UGDH y el tratamiento con EPI en contexto de adenocarcinoma mamario.

CONCLUSIÓN FINAL

Este trabajo aporta nueva y consistente evidencia de que la alteración de los niveles del GAG AH en el MAT de tumores de diversas etiologías, es capaz de generar efectos cruciales que modificarían el tratamiento quimioterapéutico con antraciclinas. En particular, un MAT en el cual hay mayor presencia de formas de AH de BPM (demostrado por la utilización de AH exógeno), favorecería el desarrollo de un fenotipo resistente durante la terapia, lo cual guarda relación con la modulación de la angiogénesis y la activación de vías de señalización que promueven la supervivencia celular y la progresión tumoral. El efecto de agregar AH de BPM durante el tratamiento con DOX mostró estar en relación con la modulación positiva de la expresión del factor FGF-2, que finalmente, favorece un comportamiento pro-angiogénico en las CEs del MAT. Por otro lado, demostramos que al modular negativamente la expresión de la enzima UGDH (directamente relacionada con la síntesis de AH) durante el tratamiento quimioterapéutico con EPI, las células tumorales pudieron compensar esta deficiencia mediante la regulación positiva de la expresión de componentes de la MEC y la activación de mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia, como la migración celular, angiogénesis y autofagia, estrechamente relacionados con fenotipos tumorales agresivos y la aparición de resistencia a drogas. Por lo tanto, impedir la acumulación del AH en la MEC tumoral, a través de la utilización de fármacos que alteren su metabolismo, resultaría clave para evadir los mecanismos de “resistencia estromal” que promueven el desarrollo de resistencia a drogas y, para lograr incrementar la eficacia de los tratamientos antitumorales ampliamente utilizados en nuestra región y país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2). doi:10.1124/pr.56.2.6
2. Robert J. Epirubicin: Clinical Pharmacology and Dose-Effect Relationship. *Drugs.* 1993;45(2). doi:10.2165/00003495-199300452-00005
3. Avila MS, Siqueira SRR, Ferreira SMA, Bocchi EA. Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2019;15(4). doi:10.14797/mdcj-15-4-267
4. Barbosa RR, Bourguignon TB, Torres LD, et al. Anthracycline-associated cardiotoxicity in adults: Systematic review on the cardioprotective role of beta-blockers. *Rev Assoc Med Bras.* 2018;64(8). doi:10.1590/1806-9282.64.08.745
5. Chen W, Liu I, Tomiyasu H, et al. Imatinib enhances the anti-tumour effect of doxorubicin in canine B-cell lymphoma cell line. *Vet J.* 2019;254. doi:10.1016/j.tvjl.2019.105398
6. Cao Y, Eble JM, Moon E, et al. NIH Public Access. 2014;73(20):6230-6242. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1345.Tumor
7. Abraham R, Basser RL, Green MD. A Risk-Benefit Assessment of Anthracycline Antibiotics in Antineoplastic Therapy. *Drug Saf.* 1996;15(6). doi:10.2165/00002018-199615060-00005
8. Carrasco R, Castillo RL, Gormaz JG, Carrillo M, Thavendiranathan P. Role of Oxidative Stress in the Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Effects of Preventive Strategies. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/8863789
9. Mross K, Maessen P, Van Der Vijgh WJF, Gall H, Boven E, Pinedo HM. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol.* 1988;6(3). doi:10.1200/JCO.1988.6.3.517
10. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(7). doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
11. Coukell AJ, Faulds D. Epirubicin. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of breast cancer. *Drugs.* 1997;53(3):453-482. doi:10.2165/00003495-199753030-00008
12. Innocenti F, Iyer L, Ratain MJ. Pharmacogenetics of Anticancer Agents: Lessons from Amonafide and Irinotecan. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(4):596 LP - 600.
13. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1). doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
14. Podar K, Fan F, Schimming A, Jaeger D. Targeting the tumor microenvironment: Focus on angiogenesis. *J Oncol.* Published online 2012. doi:10.1155/2012/281261
15. Cristina Peña-Romero A, Orenes-Piñero E. Dual Effect of Immune Cells within Tumour Microenvironment: Pro-and Anti-Tumour Effects and Their Triggers. Published online 2022. doi:10.3390/cancers14071681
16. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12). doi:10.1038/nrm3904
17. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6). doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
18. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:563-584. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154002
19. Gabhann F Mac, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation.* 2008;15(8). doi:10.1080/10739680802095964
20. Hida K, Maishi N, Annan DA, Hida Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5). doi:10.3390/ijms19051272
21. Bussolati B, Deambrosis I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J.* 2003;17(9). doi:10.1096/fj.02-0557fje
22. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science (80-).* 2003;300(5622). doi:10.1126/science.1082504
23. Xiong YQ, Sun HC, Zhang W, et al. Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells. *Clin Cancer Res.* 2009;15(15). doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2780

24. Akiyama K, Ohga N, Hida Y, et al. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol.* 2012;180(3). doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.029
25. Maishi N, Ohba Y, Akiyama K, et al. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep28039
26. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2019;36(3). doi:10.1007/s10585-019-09966-1
27. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
28. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802. doi:10.1007/978-94-7-7893-1_3
29. Chang TT, Thakar D, Weaver VM. Force-dependent breaching of the basement membrane. *Matrix Biol.* 2017;57-58. doi:10.1016/j.matbio.2016.12.005
30. Halfter W, Oertle P, Monnier CA, et al. New concepts in basement membrane biology. *FEBS J.* 2015;282(23). doi:10.1111/febs.13495
31. Crotti S, Piccoli M, Rizzolio F, Giordano A, Nitti D, Agostini M. Extracellular Matrix and Colorectal Cancer: How Surrounding Microenvironment Affects Cancer Cell Behavior? *J Cell Physiol.* 2017;232(5). doi:10.1002/jcp.25658
32. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1). doi:10.1042/BST20160387
33. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* 2015;33(4). doi:10.1016/j.tibtech.2015.01.004
34. Stroka KM, Konstantopoulos K. Physical biology in cancer. 4. Physical cues guide tumor cell adhesion and migration. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2014;306(2). doi:10.1152/ajpcell.00289.2013
35. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 2005;97(11). doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
36. Tavianatou AG, Caon I, Franchi M, Piperigkou Z, Galesso D, Karamanos NK. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J.* 2019;286(15). doi:10.1111/febs.14777
37. Vitale D, Kumar Katakam S, Greve B, et al. Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance. *FEBS J.* 2019;286(15):2870-2882. doi:10.1111/febs.14967
38. Itano N, Zhuo L, Kimata K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci.* 2008;99(9). doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00885.x
39. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and function. *Biomolecules.* 2020;10(11). doi:10.3390/biom10111525
40. Gribbon P, Heng BC, Hardingham TE. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochem J.* 2000;350(1). doi:10.1042/0264-6021:3500329
41. Spinelli FM, Vitale DL, Demarchi G, Cristina C, Alaniz L. The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clin Transl Immunol.* 2015;4(12):e52-9. doi:10.1038/cti.2015.35
42. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 2002;21(1). doi:10.1016/S0945-053X(01)00184-6
43. Toole BP. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7). doi:10.1038/nrc1391
44. Chanmee T, Ontong P, Itano N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 2016;375(1). doi:10.1016/j.canlet.2016.02.031
45. Chanmee T, Ontong P, Izumikawa T, et al. Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(46). doi:10.1074/jbc.M116.751263
46. Boregowda RK, Appaiah HN, Siddaiah M, et al. Expression of Hyaluronan in human tumor progression. *J Carcinog.* 2006;5:1-9. doi:10.1186/1477-3163-5-2
47. Spinelli FM, Vitale DL, Icardi A, et al. Hyaluronan preconditioning of monocytes/macrophages affects their angiogenic behavior and regulation

- of TSG-6 expression in a tumor type-specific manner. *FEBS J.* 2019;286(17):3433-3449. doi:10.1111/febs.14871
48. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.* 2019;40(4). doi:10.1016/j.it.2019.02.003
 49. Heldin P, Lin CY, Koliopoulos C, Chen YH, Skandalis SS. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biol.* 2019;78-79:100-117. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.017
 50. Mende M, Bednarek C, Wawryszyn M, et al. Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. *Chem Rev.* 2016;116(14). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00010
 51. Stridh S, Palm F, Hansell P. Renal interstitial hyaluronan: Functional aspects during normal and pathological conditions. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302(11). doi:10.1152/ajpregu.00332.2011
 52. Goentzel BJ, Weigel PH, Steinberg RA. Recombinant human hyaluronan synthase 3 is phosphorylated in mammalian cells. *Biochem J.* 2006;396(2). doi:10.1042/BJ20051782
 53. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, et al. Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. *J Biol Chem.* 2012;287(42). doi:10.1074/jbc.M112.402347
 54. Karousou E, Kamiryo M, Skandalis SS, et al. The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J Biol Chem.* 2010;285(31). doi:10.1074/jbc.M110.127050
 55. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, et al. Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *J Biol Chem.* 2014;289(42). doi:10.1074/jbc.M114.597401
 56. Jokela TA, Makkonen KM, Oikari S, et al. Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1. *J Biol Chem.* 2011;286(38). doi:10.1074/jbc.M111.265637
 57. Passi A, Vigetti D, Buraschi S, Iozzo R V. Dissecting the role of hyaluronan synthases in the tumor microenvironment. *FEBS J.* 2019;286(15). doi:10.1111/febs.14847
 58. Bernert B, Porsch H, Heldin P. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1). *J Biol Chem.* 2011;286(49). doi:10.1074/jbc.M111.278598
 59. Yabushita H, Noguchi M, Kishida T, et al. Hyaluronan synthase expression in ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2004;12(4). doi:10.3892/or.12.4.739
 60. Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res.* 2008;68(2). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2140
 61. de Sá VK, Rocha TP, Moreira AL, et al. Hyaluronidases and hyaluronan synthases expression is inversely correlated with malignancy in lung/bronchial pre-neoplastic and neoplastic lesions, affecting prognosis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48(11). doi:10.1590/1414-431X20154693
 62. Li Y, Li L, Brown TJ, Heldin P. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2007;120(12). doi:10.1002/ijc.22550
 63. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* 2000;113(2). doi:10.1242/jcs.113.2.193
 64. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8). doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
 65. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581
 66. Zaya MJ, Hines RN, Stevens JC. Epirubicin glucuronidation and UGT2B7 developmental expression. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(12). doi:10.1124/dmd.106.011387
 67. Zimmer BM, Barycki JJ, Simpson MA. Integration of Sugar Metabolism and Proteoglycan Synthesis by UDP-glucose Dehydrogenase. *J Histochem Cytochem.* 2021;69(1). doi:10.1369/0022155420947500
 68. Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, et al. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33281-33289. doi:10.1074/jbc.M405918200
 69. Wang TP, Pan YR, Fu CY, Chang HY. Down-regulation of UDP-glucose dehydrogenase affects glycosaminoglycans synthesis and motility in HCT-8 colorectal carcinoma cells. *Exp*

- Cell Res.* 2010;316(17). doi:10.1016/j.yexcr.2010.07.017
70. Zimmer BM, Howell ME, Ma L, et al. Altered glucuronidation deregulates androgen dependent response profiles and signifies castration resistance in prostate cancer. *Oncotarget.* 2021;12(19). doi:10.18632/ONCOTARGET.28059
 71. Huang D, Casale GP, Tian J, et al. UDP-glucose dehydrogenase as a novel field-specific candidate biomarker of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2010;126(2). doi:10.1002/ijc.24820
 72. Hagiuda D, Nagashio R, Ichinoe M, et al. Clinicopathological and prognostic significance of nuclear ugdh localizatiion lung adenocarcinoma. *Biomed Res.* 2019;40(1). doi:10.2220/biomedres.40.17
 73. Krupkova O, Greutert H, Boos N, Lemcke J, Liebscher T, Wuertz-Kozak K. Expression and activity of hyaluronidases HYAL-1, HYAL-2 and HYAL-3 in the human intervertebral disc. *Eur Spine J.* 2020;29(3). doi:10.1007/s00586-019-06227-3
 74. Alaniz L, García MG, Gallo-Rodriguez C, et al. Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF- κ B transcription factor. *Glycobiology.* 2006;16(5):359-367. doi:10.1093/glycob/cwj085
 75. Singleton PA, Mirzapoiazova T, Guo Y, et al. High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(5). doi:10.1152/ajplung.00405.2009
 76. Schmaus A, Klusmeier S, Rothley M, et al. Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 2014;111(3). doi:10.1038/bjc.2014.332
 77. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278(34). doi:10.1074/jbc.M300347200
 78. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006;106(3):818-839. doi:10.1021/cr050247k
 79. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, et al. HYAL-1 Hyaluronidase: A Potential Prognostic Indicator for Progression to Muscle Invasion and Recurrence in Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2010;57(1). doi:10.1016/j.eururo.2009.03.057
 80. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, et al. Stromal and Epithelial Expression of Tumor Markers Hyaluronic Acid and HYAL1 Hyaluronidase in Prostate Cancer. *J Biol Chem.* 2001;276(15). doi:10.1074/jbc.M008432200
 81. Hanna S, Mari P, Kristiina TK, Reijo S, Sanna PS. Inverse expression of hyaluronidase 2 and hyaluronan synthases 1-3 is associated with reduced hyaluronan content in malignant cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 2013;13. doi:10.1186/1471-2407-13-181
 82. Morera DS, Hennig MS, Talukder A, et al. Hyaluronic acid family in bladder cancer: Potential prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Br J Cancer.* 2017;117(10). doi:10.1038/bjc.2017.318
 83. Posey JT, Soloway MS, Ekici S, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res.* 2003;63(10).
 84. Junker N, Latini S, Petersen LN, Kristjansen PEG. Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol Rep.* 2003;10(3).
 85. Velesiotis C, Vasileiou S, Vynios DH. A guide to hyaluronan and related enzymes in breast cancer: biological significance and diagnostic value. *FEBS J.* 2019;286(15). doi:10.1111/febs.14860
 86. Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P, Freger P. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res.* 2002;22(4).
 87. Victor R, Chauzy C, Girard N, et al. Human breast-cancer metastasis formation in a nude-mouse model: Studies of hyaluronidase, hyaluronan and hyaluronan-binding sites in metastatic cells. *Int J Cancer.* 1999;82(1). doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990702)82:1<77::AID-IJC14>3.0.CO;2-Q
 88. Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4585-4588. doi:10.1074/jbc.R100036200
 89. Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem.* 2002;277(43). doi:10.1074/jbc.M109443200
 90. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(9):1033-1043. doi:10.5966/sctm.2015-0048

91. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(MAR). doi:10.3389/fcell.2017.00018
92. Garantziotis S, Savani RC. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol.* 2019;78-79:1-10. doi:10.1016/j.matbio.2019.02.002
93. Johnson LA, Banerji S, Lawrance W, et al. Dendritic cells enter lymph vessels by hyaluronan-mediated docking to the endothelial receptor LYVE-1. *Nat Immunol.* 2017;18(7). doi:10.1038/ni.3750
94. Bauer J, Rothley M, Schmaus A, et al. TGF β counteracts LYVE-1-mediated induction of lymphangiogenesis by small hyaluronan oligosaccharides. *J Mol Med.* 2018;96(2). doi:10.1007/s00109-017-1615-4
95. Bourguignon LYW, Ramez M, Gilad E, et al. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6). doi:10.1038/sj.jid.5700260
96. Bourguignon LYW, Wong G, Earle CA, Xia W. Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NF κ B signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion. *Cytoskeleton.* 2011;68(12). doi:10.1002/cm.20544
97. Vitale DL, Spinelli FM, Del Dago D, et al. Co-treatment of tumor cells with hyaluronan plus doxorubicin affects endothelial cell behavior independently of VEGF expression. *Oncotarget.* 2018;9(93):36585-36602. doi:10.18632/oncotarget.26379
98. Misra S, Ghatak S, Toole BP. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20310-20315. doi:10.1074/jbc.M500737200
99. Cordo-Russo RI, Alaniz LD, Saccodossi N, et al. Hyaluronan induces migration of multidrug-resistant lymphoma cell lines in vitro through Tiam1 activation by a PI3K-dependent mechanism. *Leuk Res.* 2010;34(11):1525-1532. doi:10.1016/j.leukres.2010.02.020
100. Alaniz L, Garcia M, Rizzo M, Piccioni F, Mazzolini G. Altered Hyaluronan Biosynthesis and Cancer Progression: an Immunological Perspective. *Mini-Reviews Med Chem.* 2010;9(13):1538-1546. doi:10.2174/138955709790361485
101. Lokeshwar VB, Lopez LE, Munoz D, et al. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70(7):2613-2623. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3185
102. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(4):288-295. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.005
103. Auvinen P, Tammi R, Kosma VM, et al. Increased hyaluronan content and stromal cell CD44 associate with HER2 positivity and poor prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer.* 2013;132(3). doi:10.1002/ijc.27707
104. Josefsson A, Adamo H, Hammarsten P, et al. Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome. *Am J Pathol.* 2011;179(4). doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.005
105. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjänen KJ, Saarikoski S V., Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000;60(1). doi:10.1002/1097-0215(20010120)60:1<12::AID-IJC1002>3.0.CO;2-E
106. Pirinen R, Tammi R, Tammi M, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2001;95(1). doi:10.1002/1097-0215(20010120)95:1<12::AID-IJC1002>3.0.CO;2-E
107. Jimenez C, Jones DR, Rodríguez-Viciano P, et al. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 1998;17(3). doi:10.1093/emboj/17.3.743
108. Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep.* 2020;47(6). doi:10.1007/s11033-020-05435-1
109. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;4. doi:10.3389/fnmol.2011.00051
110. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phosphoregulation of β -catenin adhesion and signaling functions. *Physiology.* 2007;22(5):303-309. doi:10.1152/physiol.00020.2007
111. Schade B, Lesurf R, Sanguin-Gendreau V, et al. β -catenin signaling is a critical event in ErbB2-mediated mammary tumor progression.

- Cancer Res.* 2013;73(14). doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3925
112. Bourguignon LYW, Peyrollier K, Gilad E, Brightman A. Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes actin polymerization and ErbB2 activation leading to β -catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells. *J Biol Chem.* 2007;282(2). doi:10.1074/jbc.M604672200
 113. Bourguignon LYW, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem.* 2007;282(27). doi:10.1074/jbc.M610054200
 114. Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, et al. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene.* 2012;31(22). doi:10.1038/onc.2011.455
 115. Mani M, Carrasco DE, Yunyu Z, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(19). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0773
 116. Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP, Orian-Rousseau V. Opposing effects of high-and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell Death Dis.* 2013;4(10). doi:10.1038/cddis.2013.364
 117. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006;107(5). doi:10.1182/blood-2005-08-3182
 118. Schwertfeger KL, Cowman MK, Telmer PG, Turley EA, McCarthy JB. Hyaluronan, inflammation, and breast cancer progression. *Front Immunol.* 2015;6(JUN). doi:10.3389/fimmu.2015.00236
 119. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11). doi:10.1038/nm.2537
 120. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(7). doi:10.1038/nrc2868
 121. Vong S, Kalluri R. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. *Genes and Cancer.* 2011;2(12). doi:10.1177/1947601911423940
 122. Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS. Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. *Lab Invest.* 1996;75(2).
 123. Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest.* 1998;78(8).
 124. Lennon FE, Mirzapioazova T, Mambetsariev N, Mambetsariev B, Salgia R, Singleton PA. Transactivation of the receptor-tyrosine kinase ephrin receptor A2 is required for the low molecular weight hyaluronan-mediated angiogenesis that is implicated in tumor progression. *J Biol Chem.* 2014;289(35). doi:10.1074/jbc.M114.554766
 125. West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res.* 1989;183(1). doi:10.1016/0014-4827(89)90428-X
 126. Koyama H, Hibi T, Isogai Z, et al. Hyperproduction of hyaluronan in Neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: Possible involvement of versican/PG-M. *Am J Pathol.* 2007;170(3). doi:10.2353/ajpath.2007.060793
 127. Olofsson B, Porsch H, Heldin P. Knock-down of CD44 regulates endothelial cell differentiation via NF κ B-mediated chemokine production. *PLoS One.* 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0090921
 128. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(39). doi:10.1074/jbc.M102273200
 129. Slevin. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and γ -adducin. *Int J Oncol.* 2009;35(4). doi:10.3892/ijo_00000389
 130. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res.* 2010;70(18):7073-7083. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4687
 131. Spinelli FM, Vitale DL, Icardi A, et al. Hyaluronan preconditioning of monocytes/macrophages affects their angiogenic behavior and regulation of TSG-6

- expression in a tumor type-specific manner. *FEBS J.* 2019;286(17). doi:10.1111/febs.14871
132. Tsuyada A, Chow A, Wu J, et al. CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2012;72(11). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3567
 133. Ueno T, Toi M, Saji H, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8).
 134. Ito TK, Ishii G, Chiba H, Ochiai A. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene.* 2007;26(51). doi:10.1038/sj.onc.1210535
 135. Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett.* 2014;347(2). doi:10.1016/j.canlet.2014.03.013
 136. Ali S, Bonnet D. *Chapter 26 Cancer Stem Cells.*; 2020.
 137. Jiang W, Peng J, Zhang Y, Cho WCS, Jin K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12). doi:10.3390/ijms131216636
 138. Stockler M, Wilcken NRC, Ghersi D, Simes RJ. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2000;26(3). doi:10.1053/ctrv.1999.0161
 139. Skandalis SS, Karalis TT, Chatzopoulos A, Karamanos NK. Hyaluronan-CD44 axis orchestrates cancer stem cell functions. *Cell Signal.* 2019;63. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109377
 140. Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol.* 2015;5(Aug):1-11. doi:10.3389/fonc.2015.00180
 141. Bourguignon LYW. Matrix hyaluronan promotes specific microRNA upregulation leading to drug resistance and tumor progression. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4). doi:10.3390/ijms17040517
 142. Wang SJ, Bourguignon LYW. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am J Pathol.* 2011;178(3):956-963. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.077
 143. Slomiany MG, Dai L, Tolliver LB, Grass GD, Zeng Y, Toole BP. Inhibition of functional hyaluronan-CD44 interactions in CD133-positive primary human ovarian carcinoma cells by small hyaluronan oligosaccharides. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24). doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2317
 144. Russo RIC, García MG, Alaniz L, Blanco G, Alvarez E, Hajos SE. Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *Int J Cancer.* 2008;122(5):1012-1018. doi:10.1002/ijc.23122
 145. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9). doi:10.1038/nrc1692
 146. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* 2007;14(3). doi:10.1038/sj.cdd.4402039
 147. Bijnsdorp I V., Peters GJ, Temmink OH, Fukushima M, Kruyt FA. Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2010;126(10). doi:10.1002/ijc.24943
 148. Liu D, Yang Y, Liu Q, Wang J. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol.* 2011;28(1). doi:10.1007/s12032-009-9397-3
 149. Samaddar JS, Gaddy VT, Duplantier J, et al. A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9). doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0447
 150. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One.* 2009;4(7). doi:10.1371/journal.pone.0006251
 151. Sun WL, Chen J, Wang YP, Zheng H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy.* 2011;7(9). doi:10.4161/auto.7.9.16521
 152. Kasai S, Furuichi Y, Ando N, et al. Triggering of CD44 by Ultra-Low-Molecular-Weight Hyaluronan Induces Cell Death by Autophagy Via Endoplasmic Reticulum Stress in Acute Lymphoblastic Leukemia with MLL Gene Rearrangements. *Blood.* 2012;120(21).

doi:10.1182/blood.v120.21.1361.1361

153. Yan T, Chen X, Zhan H, et al. Interfering with hyaluronic acid metabolism suppresses glioma cell proliferation by regulating autophagy. *Cell Death Dis.* 2021;12(5). doi:10.1038/s41419-021-03747-z
154. Huang L, Hu C, Di Benedetto M, et al. Cross-drug resistance to sunitinib induced by doxorubicin in endothelial cells. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1287-1292. doi:10.3892/ol.2014.2819
155. Ajithkumar GS, Vinitha A, Binil Raj SS, Kartha CC. Drug Resistance of Endocardial Endothelial Cells is Related to Higher Endogenous ABCG2. *Cardiovasc Toxicol.* 2016;16(4). doi:10.1007/s12012-015-9351-x
156. Shiina M, Bourguignon LYW. Selective Activation of Cancer Stem Cells by Size-Specific Hyaluronan in Head and Neck Cancer. *Int J Cell Biol.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/989070
157. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3). doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001
158. Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(9). doi:10.1038/s41568-020-0273-y
159. Boedtker E, Pedersen SF. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol.* 2020;82. doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034627
160. Sattler UGA, Meyer SS, Quennet V, et al. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2010;94(1). doi:10.1016/j.radonc.2009.11.007
161. Li X, Michael Shepard H, Cowell JA, et al. Parallel accumulation of tumor hyaluronan, collagen, and other drivers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2018;24(19). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3284
162. Slomiany MG, Daniel Grass G, Robertson AD, et al. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009;69(4). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2491
163. Wang X, Liu R, Zhu W, et al. UDP-glucose accelerates SNAI1 mRNA decay and impairs lung cancer metastasis. *Nature.* 2019;571(7763). doi:10.1038/s41586-019-1340-y
164. Shen X, Yue M, Meng F, Zhu J, Zhu X, Jiang Y. Microarray analysis of differentially-expressed genes and linker genes associated with the molecular mechanism of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(5). doi:10.3892/ol.2016.5122
165. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp.* 2011;(51). doi:10.3791/2720
166. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv.* 2016;34(8). doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
167. Eder T, Eder IE. 3D hanging drop culture to establish prostate cancer organoids. In: *Methods in Molecular Biology.* Vol 1612. ; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7021-6_12
168. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-333. doi:10.1038/nprot.2007.30
169. Xie D, Ju D, Speyer C, Gorski D, Kosir MA. Strategic endothelial cell tube formation assay: Comparing extracellular matrix and growth factor reduced extracellular matrix. *J Vis Exp.* 2016;2016(114):1-6. doi:10.3791/54074
170. Simpson MA. Hyaluronan pericellular matrix: Particle exclusion assay. In: *Methods in Molecular Biology.* Vol 1952. ; 2019. doi:10.1007/978-1-4939-9133-4_9
171. Piccioni F, Fiore E, Bayo J, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis. *Glycobiology.* 2015;25(8):825-835. doi:10.1093/glycob/cwv023
172. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014;1180. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
173. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009;58(3). doi:10.2337/db08-1098
174. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(3). doi:10.1007/s10549-009-0674-9
175. Györfy B, Benke Z, Lanczky A, et al. RecurrenceOnline: An online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data.

- Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3). doi:10.1007/s10549-011-1676-y
176. Li Q, Birkbak NJ, Gyorffy B, Szallasi Z, Eklund AC. Jetset: Selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. *BMC Bioinformatics.* 2011;12. doi:10.1186/1471-2105-12-474
 177. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1). doi:10.1038/nprot.2006.4
 178. Viola M, Bartolini B, Vigetti D, et al. Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2013;288(41). doi:10.1074/jbc.M113.508341
 179. Sevic I, Spinelli FM, Vitale DL, et al. Hyaluronan metabolism is associated with DNA repair genes in breast and colorectal cancer. Screening of potential progression markers using qPCR. *Biomedicines.* 2020;8(8). doi:10.3390/BIOMEDICINES8070183
 180. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1). doi:10.1093/nar/gky1131
 181. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res.* 2005;310(1):205-217. doi:10.1016/j.yexcr.2005.07.026
 182. Ricciardelli C, Ween MP, Lokman NA, Tan IA, Pyragius CE, Oehler MK. Chemotherapy-induced hyaluronan production: A novel chemoresistance mechanism in ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2013;13. doi:10.1186/1471-2407-13-476
 183. Fang XJ, Jiang H, Zhu YQ, Zhang LY, Fan QH, Tian Y. Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Rep.* 2014;31(6):2735-2742. doi:10.3892/or.2014.3131
 184. Rayner DM, Cutts SM. Anthracyclines. *Side Eff Drugs Annu.* 2014;36:683-694. doi:10.1016/B978-0-444-63407-8.00045-9
 185. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14(5). doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6
 186. Cao Y, Eble JM, Moon E, et al. Tumor cells upregulate normoxic HIF-1 α in response to doxorubicin. *Cancer Res.* 2013;73(20). doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1345
 187. Kibria G, Hatakeyama H, Sato Y, Harashima H. Anti-tumor effect via passive anti-angiogenesis of PEGylated liposomes encapsulating doxorubicin in drug resistant tumors. *Int J Pharm.* 2016;509(1-2). doi:10.1016/j.ijpharm.2016.05.047
 188. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(1):21-26. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.003
 189. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69(SUPPL. 3). doi:10.1159/000088478
 190. Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes and Cancer.* 2011;2(12):1085-1096. doi:10.1177/1947601911432334
 191. Xu Q, Zhang Q, Ishida Y, et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect. *Oncotarget.* 2017;8(6):9557-9571. doi:10.18632/oncotarget.13771
 192. Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, et al. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7683-7691. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0771
 193. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(19):1441-1454. doi:10.1093/jnci/djm135
 194. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):275-284. doi:10.1038/nrc1590
 195. Vigetti D, Ori M, Viola M, et al. Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. *J Biol Chem.* 2006;281(12):8254-8263. doi:10.1074/jbc.M508516200
 196. Chavez KJ, Garimella S V., Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010;32(1-2). doi:10.3233/BD-2010-0307
 197. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS.* 2005;(94):209-231. doi:10.1007/3-7643-7311-3_15
 198. Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Peterson LE, et al. Fibroblast growth factor 2 promotes tumor

- progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res.* 2003;63(18).
199. Trudel C, Faure-Desire V, Florkiewicz RZ, Baird A. Translocation of FGF-2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol.* 2000;185(2). doi:10.1002/1097-4652(200011)185:2<260::AID-JCP11>3.0.CO;2-X
200. Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schäfer T, Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(42). doi:10.1073/pnas.0605997103
201. Backhaus R, Zehe C, Wegehingel S, Kehlenbach A, Schwappach B, Nickel W. Unconventional protein secretion: Membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J Cell Sci.* 2004;117(9). doi:10.1242/jcs.01027
202. Caon I, Bartolini B, Parnigoni A, et al. Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:9-19. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.007
203. Caon I, Parnigoni A, Viola M, Karousou E, Passi A, Vigetti D. Cell Energy Metabolism and Hyaluronan Synthesis. *J Histochem Cytochem.* 2021;69(1):35-47. doi:10.1369/0022155420929772
204. Zhao H, Ma B, Wang Y, et al. miR-34a inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by repressing the expression of CD44. *Oncol Rep.* 2013;29(3). doi:10.3892/or.2013.2234
205. Zou GM. Cancer stem cells in leukemia, recent advances. *J Cell Physiol.* 2007;213(2). doi:10.1002/jcp.21140
206. Rajasagi M, von Au A, Singh R, Hartmann N, Zöller M, Marhaba R. Anti-CD44 induces apoptosis in T lymphoma via mitochondrial depolarization. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6 B). doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00909.x
207. Messam BJ, Tolg C, McCarthy JB, Nelson AC, Turley EA. Rhamm is a multifunctional protein that regulates cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19). doi:10.3390/ijms221910313
208. Mele V, Sokol L, Kölzer VH, et al. The hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM promotes growth, invasiveness and dissemination of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(41). doi:10.18632/oncotarget.19904
209. Song JM, Im J, Nho RS, Han YH, Upadhyaya P, Kassie F. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells. *Mol Carcinog.* 2019;58(3). doi:10.1002/mc.22930
210. Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. *Int J Oncol.* 2000;17(5). doi:10.3892/ijo.17.5.927
211. Aßmann V, Kern HF, Elsässer HP. Differential Expression of the Hyaluronan Receptors CD44 and RHAMM in Human Pancreatic Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9).
212. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008;133(4). doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
213. Enemark MB, Hybel TE, Madsen C, et al. Tumor-Tissue Expression of the Hyaluronic Acid Receptor RHAMM Predicts Histological Transformation in Follicular Lymphoma Patients. *Cancers (Basel).* 2022;14(5). doi:10.3390/cancers14051316
214. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. *Front Immunol.* 2015;6(MAY). doi:10.3389/fimmu.2015.00201
215. Nagy N, Kuipers HF, Frymoyer AR, et al. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol.* 2015;6(MAR):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00123
216. Piccioni F, Malvicini M, Garcia MG, et al. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. *Glycobiology.* 2012;22(3):400-410. doi:10.1093/glycob/cwr158
217. Sionov RV, Naor D. Hyaluronan-independent lodgment of CD44+ lymphoma cells in lymphoid organs. *Int J Cancer.* 1997;71(3). doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970502)71:3<462::AID-IJC26>3.0.CO;2-G
218. Hasselbalch H, Hovgaard D, Nissen N, Junker P. Serum hyaluronan is increased in malignant lymphoma. *Am J Hematol.* 1995;50(4). doi:10.1002/ajh.2830500402
219. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009;14(1):3-9. doi:10.1007/s10911-009-9109-9
220. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE.

- Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48-58. doi:10.1038/nrc706
221. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett*. 2007;252(2):225-234. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.025
222. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan: A constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(4). doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.009
223. Provenzano PP, Hingorani SR. Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(1):1-8. doi:10.1038/bjc.2012.569
224. van der Spek YM, Kroep JR, Tollenaar RAEM, Mesker WE. Chemotherapy resistance and stromal targets in breast cancer treatment: a review. *Mol Biol Rep*. 2020;47(10). doi:10.1007/s11033-020-05853-1
225. Belli C, Trapani D, Viale G, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018;65:22-32. doi:10.1016/j.ctrv.2018.02.004
226. Gong T, Dong Z, Fu Y, Gong T, Deng L, Zhang Z. Hyaluronic acid modified doxorubicin loaded Fe₃O₄ nanoparticles effectively inhibit breast cancer metastasis. *J Mater Chem B*. 2019;7(38). doi:10.1039/c9tb01250h
227. Wang Q, Zhong Y, Liu W, et al. Enhanced chemotherapeutic efficacy of the low-dose doxorubicin in breast cancer via nanoparticle delivery system crosslinked hyaluronic acid. *Drug Deliv*. 2019;26(1). doi:10.1080/10717544.2018.1507057
228. Zhang Y, Wang F, Li M, et al. Self-Stabilized Hyaluronate Nanogel for Intracellular Codelivery of Doxorubicin and Cisplatin to Osteosarcoma. *Adv Sci*. 2018;5(5). doi:10.1002/advs.201700821
229. Zhang Y, Cai L, Li D, et al. Tumor microenvironment-responsive hyaluronate-calcium carbonate hybrid nanoparticle enables effective chemotherapy for primary and advanced osteosarcomas. *Nano Res*. 2018;11(9). doi:10.1007/s12274-018-2066-0
230. Li L, Liu HC, Wang C, et al. Overexpression of β -Catenin Induces Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/5378567
231. Makin G, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1). doi:10.1007/s004419900160
232. O'Gorman DM, Cotter TG. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia*. 2001;15(1). doi:10.1038/sj.leu.2401998
233. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003;17(3):590-603. doi:10.1038/sj.leu.2402824
234. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001;61(16):6050-6054.
235. Masckauchán TNH, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J. Wnt/ β -catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*. 2005;8(1):43-51. doi:10.1007/s10456-005-5612-9
236. Han R, Xiong J, Xiao R, et al. Activation of β -catenin signaling is critical for doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition in BGC-823 gastric cancer cell line. *Tumor Biol*. 2013;34(1):277-284. doi:10.1007/s13277-012-0548-3
237. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-850. doi:10.1038/nature03319
238. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells - An integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9). doi:10.1038/nrc1694
239. Ghayad S, Cohen P. Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway: New Hope for Breast Cancer Patients. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2009;5(1):29-57. doi:10.2174/157489210789702208
240. Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7). doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3913
241. Kuijjer ML, Van Den Akker BEWM, Hilhorst R, et al. Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy. *BMC Med Genomics*. 2014;7(1). doi:10.1186/1755-8794-7-4
242. Hong ES, Burkett SS, Morrow J, et al. Characterization of the metastatic phenotype of a panel of established osteosarcoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(30). doi:10.18632/oncotarget.5177

243. Brown CK, Khodarev NN, Yu J, et al. Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett.* 2004;565(1-3):167-170. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.099
244. Liu F, Wang P, Jiang X, et al. Antisense hypoxia-inducible factor 1 α gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99(10). doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00905.x
245. Wu M, Du Y, Liu Y, et al. Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways. *PLoS One.* 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092857
246. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.* 2007;26(1):58-68. doi:10.1016/j.matbio.2006.08.261
247. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33585-33592. doi:10.1074/jbc.M003890200
248. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor- κ B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: The role of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 2002;367(3):729-740. doi:10.1042/BJ20020752
249. Hida K, Akiyama K, Ohga N, Maishi N, Hida Y. Tumour endothelial cells acquire drug resistance in a tumour microenvironment. *J Biochem.* 2013;153(3):243-249. doi:10.1093/jb/mvs152
250. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(5). doi:10.1007/s00018-005-5426-3
251. Lim DK, Wylie RG, Langer R, Kohane DS. Selective binding of C-6 OH sulfated hyaluronic acid to the angiogenic isoform of VEGF165. *Biomaterials.* 2016;77. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.074
252. Li Y sheng, Liu Q, Tian J, He H bo, Luo W. Angiogenesis Process in Osteosarcoma: An Updated Perspective of Pathophysiology and Therapeutics. *Am J Med Sci.* 2019;357(4). doi:10.1016/j.amjms.2018.12.004
253. Cristina C, Luque GM, Demarchi G, et al. Erratum: Angiogenesis in pituitary adenomas: Human studies and new mutant mouse models (International Journal of Endocrinology (2014) 2014 (608497) DOI: 10.1155/2014/608497). *Int J Endocrinol.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/8978014
254. Hortalá M, Estival A, Pradayrol L, Susini C, Clemente F. Identification of c-Jun as a critical mediator for the intracrine 24 kDa FGF-2 isoform-induced cell proliferation. *Int J Cancer.* 2005;114(6):863-869. doi:10.1002/ijc.20744
255. Thomas-Mudge RJ, Okada-Ban M, Vandenbroucke F, et al. Nuclear FGF-2 facilitates cell survival in vitro and during establishment of metastases. *Oncogene.* 2004;23(27):4771-4779. doi:10.1038/sj.onc.1207638
256. Lang HL, Hu GW, Chen Y, et al. Glioma cells promote angiogenesis through the release of exosomes containing long non-coding RNA POU3F3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(5).
257. Xavier CPR, Caires HR, Barbosa MAG, Bergantim R, Guimarães JE, Vasconcelos MH. The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance. *Cells.* 2020;9(5). doi:10.3390/cells9051141
258. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1). doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.007
259. Nakanishi T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2007;4(3):241-254.
260. Dlugosz A, Janecka A. ABC Transporters in the Development of Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Curr Pharm Des.* 2016;22(30). doi:10.2174/1381612822666160302103646
261. Kadioglu O, Saeed MEM, Munder M, Spuller A, Greten HJ, Efferth T. Effect of ABC transporter expression and mutational status on survival rates of cancer patients. *Biomed Pharmacother.* 2020;131. doi:10.1016/j.biopha.2020.110718
262. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11). doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2329
263. Teng F, Tian WY, Wang YM, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1).

doi:10.1186/s13045-015-0231-4

264. Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*. 2011;117(6). doi:10.1002/cncr.25565
265. Ekici S, Cerwinka WH, Duncan R, et al. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44V6 and microvessel density for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2004;112(1). doi:10.1002/ijc.20368
266. Bouga H, Tsouros I, Bounias D, et al. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10. doi:10.1186/1471-2407-10-499
267. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(6):431-444. doi:10.2165/00003088-200241060-00004
268. Hu DG, Rogers A, Mackenzie PI. Epirubicin upregulates UDP glucuronosyltransferase 2B7 expression in liver cancer cells via the p53 pathway. *Mol Pharmacol*. 2014;85(6). doi:10.1124/mol.114.091603
269. Wei Q, Galbenus R, Raza A, Cerny RL, Simpson MA. Androgen-stimulated UDP-glucose dehydrogenase expression limits prostate androgen availability without impacting hyaluronan levels. *Cancer Res*. 2009;69(6). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3083
270. Huh JW, Choi MM, Yang SJ, Seung YY, Soo YC, Cho SW. Inhibition of human UDP-glucose dehydrogenase expression using siRNA expression vector in breast cancer cells. *Biotechnol Lett*. 2005;27(16). doi:10.1007/s10529-005-0022-z
271. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer*. 2017;8(16). doi:10.7150/jca.18457
272. Wang Q, Karvelsson ST, Johannsson F, et al. UDP-glucose dehydrogenase expression is upregulated following EMT and differentially affects intracellular glycerophosphocholine and acetylaspartate levels in breast mesenchymal cell lines. *Mol Oncol*. 2022;16(9). doi:10.1002/1878-0261.13172
273. Teoh ST, Ogrodzinski MP, Lunt SY. UDP-glucose 6-dehydrogenase knockout impairs migration and decreases in vivo metastatic ability of breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2020;492. doi:10.1016/j.canlet.2020.07.031
274. Shao N, Yuan K, Zhang Y, Cheang TY, Li J, Lin Y. Identification of key candidate genes, pathways and related prognostic values in ER-negative/HER2-negative breast cancer by bioinformatics analysis. *J BUON*. 2018;23(4).
275. Fujioka H, Sakai A, Tanaka S, et al. Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2017;13(1). doi:10.3892/ol.2016.5455
276. Ravdin PM. Anthracycline resistance in breast cancer: Clinical applications of current knowledge. *Eur J Cancer*. 1995;31(1007). doi:10.1016/0959-8049(95)00307-5
277. Davey RA, Longhurst TJ, Davey MW, et al. Drug resistance mechanisms and MRP expression in response to epirubicin treatment in a human leukaemia cell line. *Leuk Res*. 1995;19(4). doi:10.1016/0145-2126(94)00159-8
278. Zhang LH, Yang AJ, Wang M, et al. Enhanced autophagy reveals vulnerability of P-gp mediated epirubicin resistance in triple negative breast cancer cells. *Apoptosis*. 2016;21(4). doi:10.1007/s10495-016-1214-9
279. Chrisanthar R, Knappskog S, Løkkevik E, et al. CHEK2 mutations affecting kinase activity together with mutations in TP53 indicate a functional pathway associated with resistance to epirubicin in primary breast cancer. *PLoS One*. 2008;3(8). doi:10.1371/journal.pone.0003062
280. Vulsteke C, Lambrechts D, Dieudonné A, et al. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (abcc1/mrp1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-)adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (fec). *Ann Oncol*. 2013;24(6). doi:10.1093/annonc/mdt008
281. Camaggi CM, Comparsi R, Strocchi E, Testoni F, Pannuti F. HPLC analysis of doxorubicin, epirubicin and fluorescent metabolites in biological fluids. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1988;21(3). doi:10.1007/BF00262773
282. Robert J, David M, Granger C. Metabolism of epirubicin to glucuronides: relationship to the pharmacodynamics of the drug. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1990;27(2). doi:10.1007/BF00689100
283. Diiffy PM, Hayes MC, Cooper A, Smart CJ. Determination and reversal of resistance to epirubicin intravesical chemotherapy. A flow cytometric model. *Br J Urol*. 1996;77(6). doi:10.1046/j.1464-410x.1996.09038.x
284. Sawyer MB, Pituskin E, Damaraju S, et al. A Uridine Glucuronosyltransferase 2B7 Polymorphism Predicts Epirubicin Clearance

- and Outcomes in Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2016;16(2). doi:10.1016/j.clbc.2015.09.006
285. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell*. 2004;96(7). doi:10.1016/j.biocel.2004.05.002
286. Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*. 2017;36(1). doi:10.1186/s40880-017-0219-2
287. Udristioiu A, Nica-Badea D. Autophagy dysfunctions associated with cancer cells and their therapeutic implications. *Biomed Pharmacother*. 2019;115. doi:10.1016/j.biopha.2019.108892
288. Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(12). doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2060
289. Mohan V, Das A, Sagi I. Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020;62. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.004
290. Rilla K, Pasonen-Seppänen S, Rieppo J, Tammi M, Tammi R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth. *J Invest Dermatol*. 2004;123(4). doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23409.x
291. Itano N, Sawai T, Atsumi F, et al. Selective Expression and Functional Characteristics of Three Mammalian Hyaluronan Synthases in Oncogenic Malignant Transformation. *J Biol Chem*. 2004;279(18). doi:10.1074/jbc.M313178200

ANEXO

0,5D	MFI Acumulación de DOX	MFI Apoptosis
Población DOX +	1337	339
Población DOX -	229	352

0,5D + AH 20	MFI Acumulación de DOX	MFI Apoptosis
Población DOX +	1334	380
Población DOX -	204	357

0,5D + AH 100	MFI Acumulación de DOX	MFI Apoptosis
Población DOX +	1242	334
Población DOX -	213	330

Figura 1 Anexo. Efecto del AH de BPM sobre la acumulación de DOX y la apoptosis en diferentes subpoblaciones de un modelo tridimensional de cultivo. Las células tumorales MDA-MB-231 se cultivaron para formar tumorosferas tridimensionales y se incubaron con 0,5 μ M de DOX (0,5D) o en combinación con 20 o 100 μ g/ml de AH de BPM (AH 20 y AH 100 respectivamente). Los niveles de acumulación intracelular de DOX y la apoptosis inducida (anexina-V) se detectaron mediante citometría de flujo, determinando la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada parámetro en poblaciones celulares diferenciadas.

CONTROLES RESIDUALES (Ensayo de cierre de herida sobre HMEC-1)

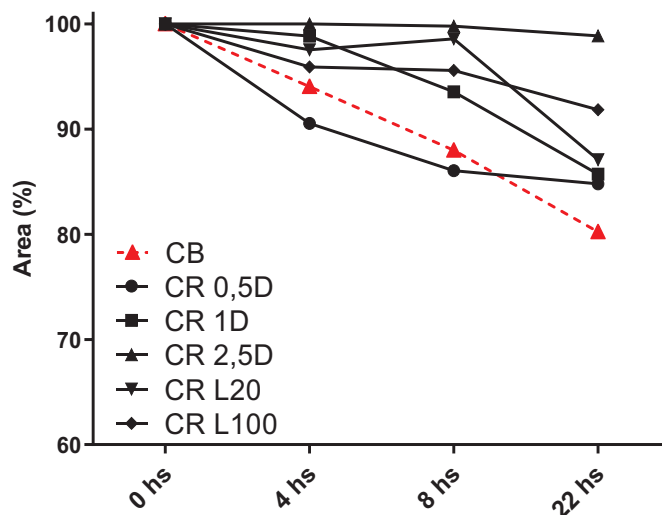


Figura 2 Anexo. Modulación de la migración de células endoteliales. Efecto directo observado sobre controles residuales de AH de BPM y DOX. Las células microendoteliales humanas HMEC-1 se estimularon con los medios de cultivo condicionados provenientes de las células EL4, K12 y MDA-MB-231 que habían sido tratadas con AH de BPM y DOX. En paralelo se realizaron controles residuales (CR) para descartar cualquier efecto directo del AH de BPM o la DOX residual que pudiera haber quedado presente en los sobrenadantes de las células tumorales. Para ello, se utilizaron controles con medio de cultivo que contenían las mismas dosis de AH de BPM (AH 20 y 100) y DOX (0,5D, 1D y 2,5D) utilizadas para tratar a las células tumorales. Se respetaron los tiempos de cultivo e incubación y luego se utilizaron como medio de estímulo para las CEs HMEC-1. Se realizó una herida en el centro de cada pocillo y se tomaron micrografías cada 4 horas para evaluar el cierre de dicha herida como medida de la capacidad migratoria de las células HMEC-1. Los gráficos muestran el área libre de células generada durante el ensayo, medida cada 4 horas. Los datos obtenidos se compararon a las condiciones basales de cierre de herida (CB) como referencia.

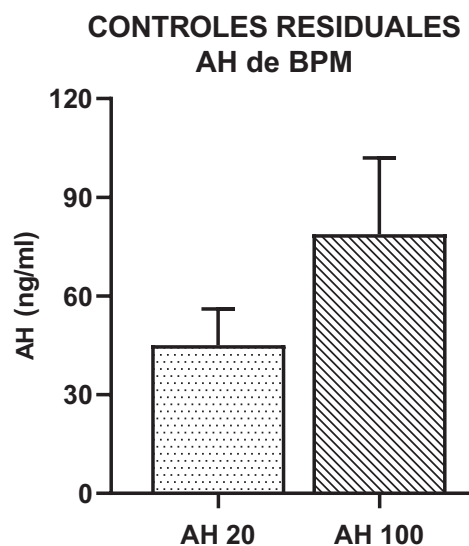


Figura 3 Anexo. Ensayo tipo ELISA para determinar la concentración de AH en sobrenadantes. Análisis de controles residuales con ambas dosis de AH de BPM. Se realizaron controles residuales (CR) para descartar cualquier señal inespecífica del AH de BPM que pudiera haber quedado presente en los sobrenadantes de las células tumorales utilizados para realizar el ensayo tipo ELISA para AH. Para ello, se utilizaron controles con medio de cultivo que contenían las mismas dosis de AH de BPM (AH 20 y 100) utilizadas para tratar a las células tumorales. Se respetaron los tiempos de cultivo e incubación y luego se utilizaron como controles durante los ensayos.

NOTA: El presente documento corresponde a la versión final de la Tesis Doctoral presentada ante la UNSAM, en la cual se han considerado las correcciones y sugerencias de los integrantes del jurado.

A handwritten signature in blue ink, consisting of three vertical strokes and a horizontal line at the bottom.

Lic. Daiana L. Vitale
Tesisista

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized, cursive script with a prominent diagonal stroke.

Dra. Laura Alaniz
Directora de Tesis