

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, NATURALES Y AMBIENTALES**

**FORMULARIO IV**

**PRESENTACIÓN DEL INFORME DEL TRABAJO FINAL PARA  
LICENCIATURA EN GENÉTICA**

Sr. Director de la Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales:

De mi consideración:

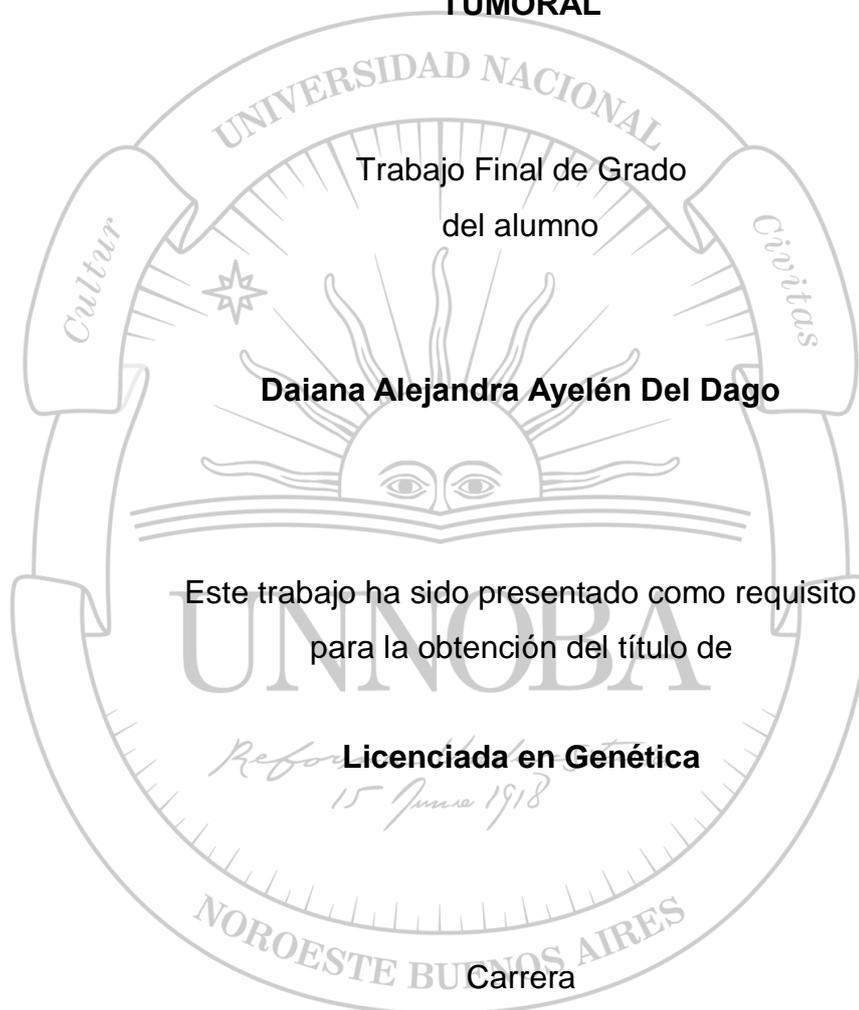
Habiendo considerado las correcciones sugeridas por el Tribunal Evaluador, adjunto la nueva versión de mi Trabajo Final.

Pergamino, 13/04/19

Firma del Estudiante: .....

Visto Bueno del Director .....

**LA INTERACCIÓN ENTRE ÁCIDO HIALURÓNICO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y  
CD44 COMO MODULADORA DE LA RESISTENCIA A DROGAS EN EL TRATAMIENTO  
TUMORAL**



Trabajo Final de Grado  
del alumno

**Daiana Alejandra Ayelén Del Dago**

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del título de

**Licenciada en Genética**

Carrera

**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 13 de abril de 2019

---

## *Agradecimientos*

---

En primer lugar, agradezco a toda mi familia y en especial a mi mamá por acompañarme en este camino y por confiar en mí incondicionalmente desde el primer momento e impulsarme a seguir todos los días.

Quiero agradecer especialmente a mi directora Laura Alaniz, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, enseñarme y guiarme durante todo este tiempo para poder realizar este trabajo de tesis.

A mis compañeras del laboratorio, Anto, Fio y Dai por ayudarme e integrarme en su grupo y hacer mis días más alegres dentro y fuera del mismo.

A todo el grupo del Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas, por recibirme con cariño y hacer más fáciles mis días dentro del laboratorio. Especialmente a los técnicos, Nati y Gastón por ayudarme y darme una mano siempre.

A mis amigos de la vida, especialmente a Priscila y Francina, que estuvieron cuando las necesité, por su apoyo y su amistad incondicional.

A mis compañeros de cursada, por haber compartido mates, cursadas, risas, nervios y todos los momentos vividos durante estos años.

---

# Índice General

---

|  | Página |
|--|--------|
| ➤ ÍNDICE DE FIGURAS  | 5      |
| ➤ ABREVIATURAS   | 6      |
| ➤ RESUMEN  | 8      |
| <br>   |        |
| ➤ INTRODUCCIÓN   | 10     |
| ❖ AH: estructura, función y sus receptores   | 13     |
| ❖ CD44 y cáncer  | 17     |
| ❖ Células madre tumorales (CSCs)   | 21     |
| ❖ Resistencia a la apoptosis y supervivencia celular                                   | 23     |
| ❖ Resistencia a múltiples drogas (MDR)   | 24     |
| ❖ Factores pro-angiogénicos  | 25     |
| ❖ Doxorubicina: estructura química y mecanismo de acción                               | 27     |
| <br>   |        |
| ➤ HIPÓTESIS y OBJETIVOS  |        |
| ❖ Hipótesis  | 30     |
| ❖ Objetivo general   | 30     |
| ❖ Objetivos específicos  | 30     |
| <br>   |        |
| ➤ MATERIALES Y MÉTODOS   |        |
| ❖ Líneas celulares y reactivos   | 32     |
| ❖ Cultivo celular  | 33     |
| ❖ Tratamiento celular y ensayos experimentales   | 33     |
| ❖ Evaluación de la expresión de CD44 en la superficie celular                          | 34     |
| • Citometría de flujo  |        |
| ❖ Modulación del eflujo de DOX por AH BPM-CD44 en distintas líneas celulares tumorales | 34     |
| ❖ Análisis de expresión del gen CD44   | 35     |
| • Extracción de ARN y RT-PCR   |        |

|  |    |
|--|----|
| • RT-qPCR  |    |
| ❖ Evaluación de la generación de células resistentes a drogas por el tratamiento con AH BPM  | 36 |
| • Apoptosis celular  |    |
| • Funcionalidad de bombas de expulsión   |    |
| • Expresión de CD90  |    |
| ❖ Evaluación de la expresión de proteínas pro-angiogénicas en las células tumorales  | 37 |
| • ELISA  |    |
| • Ensayo de zimografía   |    |
| ❖ Estadística  | 38 |
| ➤ RESULTADOS   |    |
| ❖ Expresión de CD44 en la membrana celular   | 40 |
| ❖ Modulación del eflujo de DOX por AH BPM-CD44 en distintas líneas celulares tumorales   | 42 |
| • Acumulación intracelular de DOX  |    |
| • Evaluación de la expresión del ARNm de CD44  | 49 |
| ❖ Evaluación de mecanismos celulares indicativos de resistencia a drogas   | 51 |
| • Modulación de la apoptosis celular   |    |
| • Expresión de marcadores tipo células madre tumoral   | 53 |
| • Funcionalidad de las bombas de expulsión de DOX  | 57 |
| ❖ Evaluación de la expresión de proteínas pro-angiogénicas y de matriz extracelular en estas células tumorales asociadas a resistencia a drogas. | 59 |
| • Expresión de VEGF  |    |
| • Actividad de MMPs  | 61 |
| ➤ DISCUSIÓN  | 65 |
| ➤ CONCLUSIÓN   | 74 |
| ➤ BIBLIOGRAFÍA   | 75 |

---

## Índice de Figuras

---

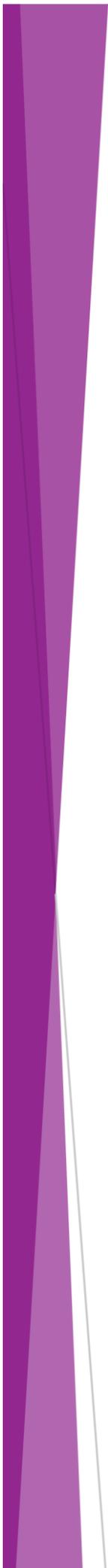
|  | Página |
|--|--------|
| ✚ Figura 1: Microambiente tumoral  | 11     |
| ✚ Figura 2: Matriz extracelular (MEC)  | 13     |
| ✚ Figura 3: Estructura del ácido hialurónico   | 15     |
| ✚ Figura 4: Estructuras genómica y proteica de CD44  | 18     |
| ✚ Figura 5: Interacción AH-CD44 en cáncer  | 20     |
| ✚ Figura 6: Respuesta de las células tumorales a las diferentes terapias antitumorales       | 22     |
| ✚ Figura 7: Estructura química de doxorubicina   | 28     |
| ✚ Figura 8: Expresión de CD44 en la membrana celular   | 41     |
| ✚ Figura 9: Análisis de la acumulación intracelular de DOX                                   | 44     |
| ✚ Figura 10: Acumulación intracelular de DOX en presencia del inhibidor de la síntesis de AH | 48     |
| ✚ Figura 11: Análisis de la expresión de CD44  | 50     |
| ✚ Figura 12: Modulación de la apoptosis celular  | 52     |
| ✚ Figura 13: Análisis de la expresión de CD90  | 54     |
| ✚ Figura 14: Análisis de la funcionalidad de las bombas de expulsión                         | 58     |
| ✚ Figura 15: Análisis de la concentración de VEGF  | 60     |
| ✚ Figura 16: Actividad de MMPs   | 62     |

---

## *Abreviaturas*

---

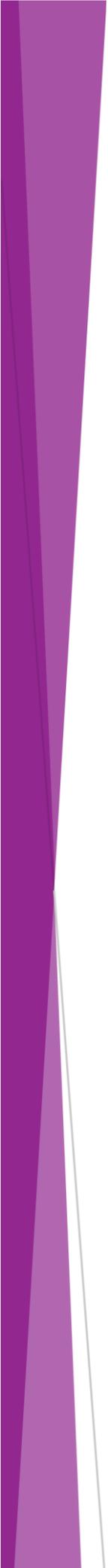
- AH: Ácido hialurónico
- AH APM: Ácido hialurónico de alto peso molecular
- AH BPM: Ácido hialurónico de bajo peso molecular
- MEC: Matriz extracelular
- CSCs: Células madre tumorales
- MDR: Resistencia a múltiples drogas
- DOX: doxorubicina
- 4-Mu: 4 metilumbeliferona
- CsA: Ciclosporina A
- VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular
- MMPs: Metaloproteinasas de matriz



# Resumen

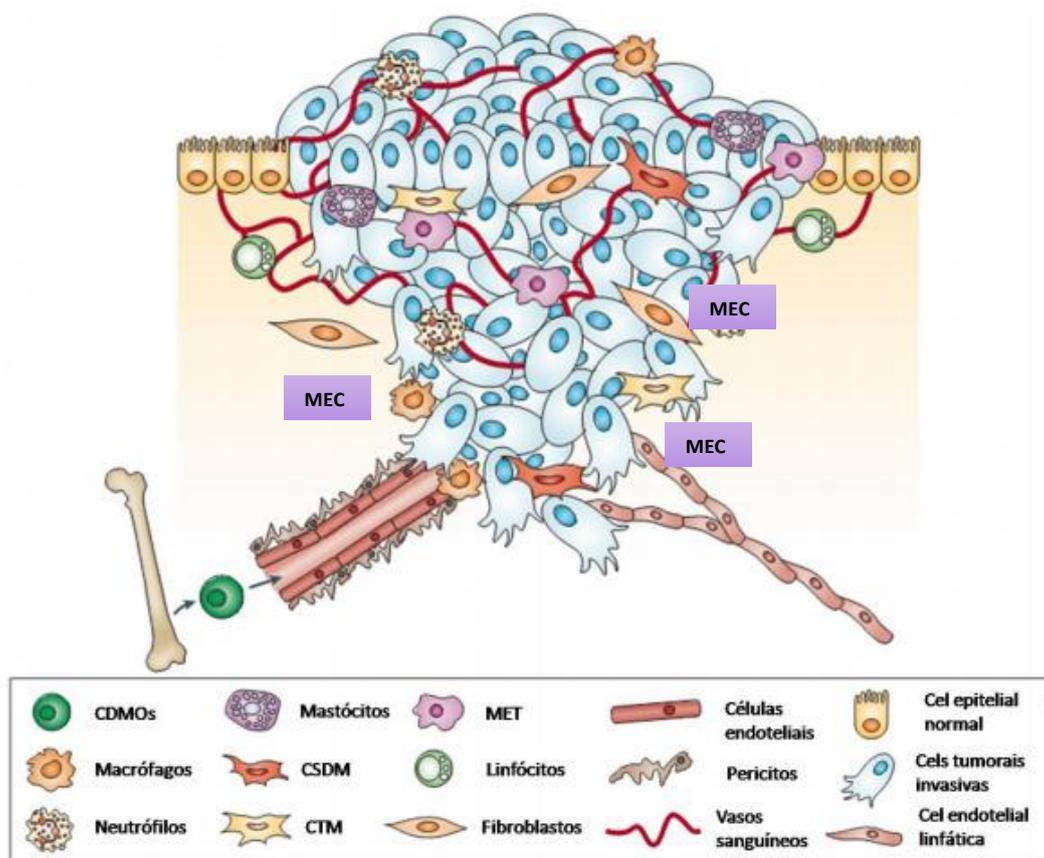
Aunque en los últimos tiempos se han realizado varios avances en la terapia contra el cáncer, las muertes relacionadas con la enfermedad siguen ocurriendo de acuerdo con fallas en el tratamiento dado. La causa del fracaso en el intento de eliminar las células tumorales se debe a que las mismas desarrollan resistencia a múltiples drogas utilizadas en la terapia clínica y como consecuencia, se produce recurrencia del tumor luego de la remisión del mismo. Más aún, este efecto se acompaña con un mayor grado de malignidad y diseminación a otros tejidos. El desafío de poder encontrar los mecanismos moleculares responsables que están involucrados en tal efecto y erradicar por completo el tumor es de suma importancia. Las evidencias acumuladas muestran que las células madre tumorales, el microambiente tumoral y la matriz extracelular que forma parte del microambiente son responsables de la progresión del cáncer, la resistencia a los medicamentos y, por último, la metástasis. El ácido hialurónico, como componente principal de la matriz extracelular, se expresa de manera abundante en la mayoría de los tumores, y la interacción con su principal receptor CD44, induce señales que modularían el comportamiento de las células tumorales y la respuesta a los tratamientos antineoplásicos.

El objetivo de este trabajo de tesis fue analizar la modulación de la respuesta a la droga terapéutica doxorubicina a través de la interacción entre ácido hialurónico-CD44 implicada en la generación de células tumorales multirresistentes y productoras de factores pro-angiogénicos. Utilizando distintos modelos tumorales (H1299 y MDA-MB-231) se estudió el rol del ácido hialurónico de bajo peso molecular en la modulación de la capacidad de respuesta a doxorubicina, como así también en la apoptosis, expresión de marcadores de células madre tumoral, incluso en la producción de factores que promueven la angiogénesis. El tratamiento con ácido hialurónico exógeno de bajo peso molecular moduló en una de las líneas celulares la acumulación intracelular de doxorubicina en las distintas poblaciones que componen el tumor, sin embargo, no hubo diferencias en la apoptosis. Incrementó la expresión del gen de CD44, además de un aumento en la población de células que expresan CD90 resistentes a doxorubicina y modulación de la expresión de factores pro-angiogénicos como las metaloproteinasas de matriz. A pesar de que más ensayos son necesarios, en este trabajo hubo evidencia de que la acción del ácido hialurónico y su interacción con CD44, depende de la etiología del tumor y del contexto tumoral.



# Introducción

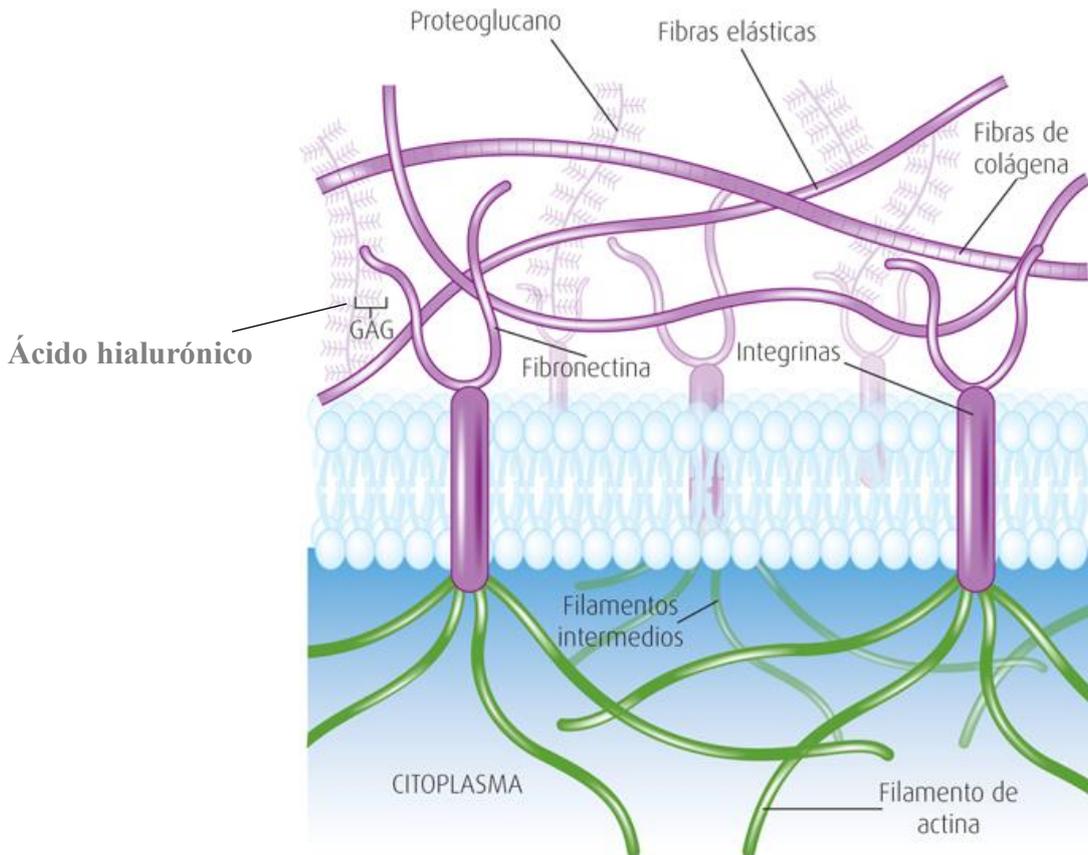
El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, según la Organización mundial de la salud (OMS). Cerca del 70% de las muertes por esta enfermedad se debe a la falta de diagnóstico precoz y el tratamiento correspondiente. Varios tratamientos antineoplásicos han fracasado debido a la recurrencia del tumor en consecuencia al desarrollo de resistencias a múltiples drogas, por lo que el estudio de los mecanismos que conducen a las fallas del tratamiento y que favorecen la progresión tumoral es de suma importancia. Las células tumorales son capaces de modificar el ambiente en el cual crecen, originando un microambiente especial favorable para su desarrollo llamado “microambiente tumoral” (Bissell *et al.* 2011) (Figura 1). La homeostasis de este ambiente se halla desregulada, permitiendo la proliferación sostenida de las células del tumor, resistencia a la apoptosis, reprogramación del metabolismo celular, evasión a la respuesta inmune antitumoral, angiogénesis o formación de nuevos vasos e inducción de resistencia a drogas, siendo este último punto objeto de estudio en este trabajo. El microambiente tumoral está formado por un componente celular (fibroblastos, células del sistema inmune, células mesenquimales) y uno no celular: la Matriz Extracelular (MEC) (Lu *et al.* 2012). A su vez los componentes de la MEC son los que favorecen los procesos mencionados. Pueden encontrarse factores que influyen en el crecimiento y desarrollo tumoral, como citoquinas y quemoquinas, factores de crecimiento, enzimas degradantes de la MEC, especies reactivas del oxígeno y otras moléculas activas. Entre los componentes de la MEC que interactúan con las células tumorales se encuentran: fibronectina, laminina, colágeno, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Figura 2); entre estos últimos se distingue el Ácido Hialurónico (AH) (Slevin *et al.* 2014), molécula objeto de nuestro estudio. En los tejidos normales la síntesis y la degradación de AH está estrictamente equilibrada entre la actividad de AH sintetasas (HAS) y hialuronidasas (HYALs), predominando la forma AH de alto de peso molecular ( $0,5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  Da) y cumpliendo propiedades hidrodinámicas en los tejidos. Mientras que la forma de bajo peso molecular ( $10^4$  a  $0,5 \times 10^6$  Da) predomina durante procesos inflamatorios o tejidos injuriados (Spinelli *et al.* 2015).



**Figura 1: Microambiente tumoral.** Las células tumorales se rodean de diferentes tipos celulares que incluyen células endoteliales de la sangre y la circulación linfática, fibroblastos estromales y una variedad de células derivadas de la médula ósea (CDMOs), incluidos los macrófagos, las células supresoras de origen mieloide (CSDM), células madre mesenquimales, entre otras; y de un componente no celular, la matriz extracelular (MEC). Tomado y modificado de Joyce and Pollard. Nat Rev Cancer. 2009.

En tumores, la concentración de AH se altera por lo general en relación con los tejidos normales y en algunos tumores el nivel de AH podría ser considerado un predictor de malignidad (Tammi *et al.* 2008). Los fragmentos de AH  $< 10^4$  Da son capaces de promover la invasión tumoral mediante la estimulación de la angiogénesis (Tammi *et al.* 2008, Koyama *et al.* 2007). Por otro lado, el AH de alto peso molecular (APM) podría promover un efecto protector durante la progresión del tumor; se ha observado que retrasa el crecimiento tumoral en carcinoma de colon (Mueller *et al.* 2010) y la migración celular en fibrosarcoma (Berdiaki *et al.* 2009). Más aún, varios trabajos han demostrado que un tipo

de AH de APM es capaz de mediar la resistencia a desarrollar cáncer en una especie de roedor llamado Naked Mole-Rat o rata topo desnuda. (Tian *et al.* 2013). Además, se demostró que el tratamiento con oligosacáridos de AH (oAH) puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con drogas y disminuir la progresión tumoral (Zeng *et al.* 1998; Alaniz *et al.* 2006; Russo *et al.* 2008). Contrariamente se ha observado que la activación de CD44 al interactuar con AH puede promover la resistencia a múltiples drogas (MDR, del inglés, multi-drug-resistant) en las células cancerosas, permitiendo la aparición de resistencia a la terapia. No es sorprendente que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra CD44 inhiban el crecimiento del tumor de manera efectiva y evitan la remisión del tumor después de la quimioterapia en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano (Marangoni *et al.* 2009). Resultados similares se han observado en tumores de cabeza y cuello (Bourguignon *et al.* 2012). Por lo tanto, se requieren investigaciones que determinen exactamente el rol de la interacción AH-CD44 en los mecanismos de procesos asociados a la generación de células tumorales resistentes e inclusive promotoras de la angiogénesis tumoral. El bloqueo de esta interacción clínicamente tendría impacto en la sobrevida de los pacientes con cáncer, al evitar la aparición de resistencia y la diseminación tumoral por vía vascular a otros tejidos. En este sentido, la progresión tumoral no solo depende de las células tumorales propiamente dichas sino también el microambiente que las rodea, principalmente el AH como componente importante de la MEC y su implicancia a través de diferentes mecanismos, en el mantenimiento y promoción del tumor, frente a las diferentes terapias antitumorales como el tratamiento quimioterapéutico.



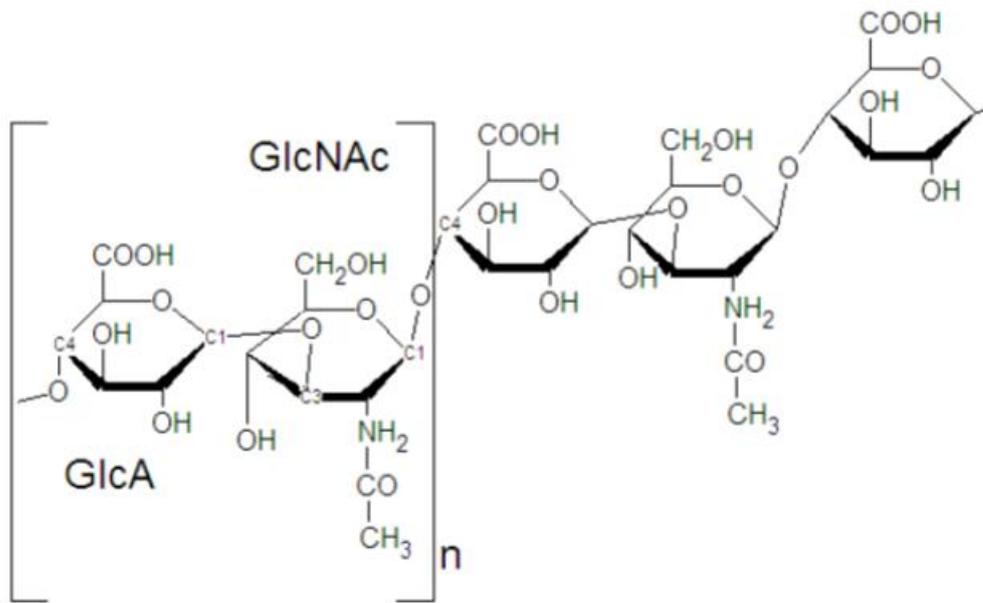
**Figura 2: Matriz extracelular (MEC).** La MEC está compuesta por diferentes componentes entre los que se encuentran: fibronectina, colágeno, elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAGs) como el ácido hialurónico. Tomado y modificado de Julio Sepúlveda Saavedra, Texto atlas de Histología: Biología celular y tisular, (2° edición) 2014.

❖ **AH: estructura, función y sus receptores**

El Ácido Hialurónico es un glicosaminoglicano (GAG) lineal que se compone de unidades repetidas de disacárido unidas por enlace  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), que forma el ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) y constituyendo largas cadenas que pueden llegar de cientos a miles de unidades repetidas de disacárido, con una masa molecular en el orden de los megadaltons (MDa) (Figura 3).

Es un polisacárido que se distribuye ampliamente en todo el organismo, presente en la matriz extracelular de las todas las células, especialmente en los tejidos conectivos y está concentrado mayoritariamente en los tejidos en desarrollo y especializados como el cordón umbilical, el humor vítreo, la dermis, tejido subcutáneo, fluido sinovial de las articulaciones, el cartílago y en las cuerdas vocales (Ward *et al.* 2002), cumpliendo varias funciones biológicas y mecánicas. Puede unirse a otros GAGs o a diferentes proteoglicanos (agrecanos, versicanos, neurocanos, brevicanos, entre otros) que forman agregados para cumplir determinadas funciones, en el cartílago o hasta tejidos más blandos como el cerebro (Fraser *et al.* 1997). Debido a sus características fisicoquímicas y al ser no inmunogénico se ha utilizado en varias aplicaciones terapéuticas y en la cosmética (Saranraj and Naidu 2013). Provee a los diferentes tejidos, viscosidad, elasticidad, lubricación, cubriendo espacios (Ogston *et al.* 1953) y participa en importantes funciones biológicas como la inflamación y cierre de heridas (Weigel *et al.* 1986), homeostasis del agua tisular, regulación del transporte de otras macromoléculas, exclusión de moléculas del espacio extracelular, entre otras funciones (Laurent C. *et al.* 1995).

La síntesis del AH es producida principalmente por los fibroblastos y es llevada a cabo por la enzima que se localiza en la membrana plasmática, denominada ácido hialurónico sintasa (HAS). Esta enzima añade unidades de monosacáridos de GlcA y GlcNAc a la cadena de AH naciente que crece hacia el exterior celular, utilizando UDP-GlcA y UDP-GlcNAc como sustratos. Existen tres isoformas diferentes: HAS1, HAS2 y HAS3, las cuales se diferencian en la longitud del producto. Las enzimas HAS1 y HAS2 sintetizan preferentemente moléculas de AH de alto peso molecular (AH APM), mientras que la forma HAS3, sintetiza AH de bajo peso molecular (AH BPM), dependiendo su actividad a diferentes factores (Ward *et al.* 2002).



**Figura 3: Estructura del Ácido Hialurónico.** Molécula compuesta por  $n$  repeticiones del disacárido que se unen por enlace  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3). Tomado y adaptado de Alaniz *et al.* Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2009.

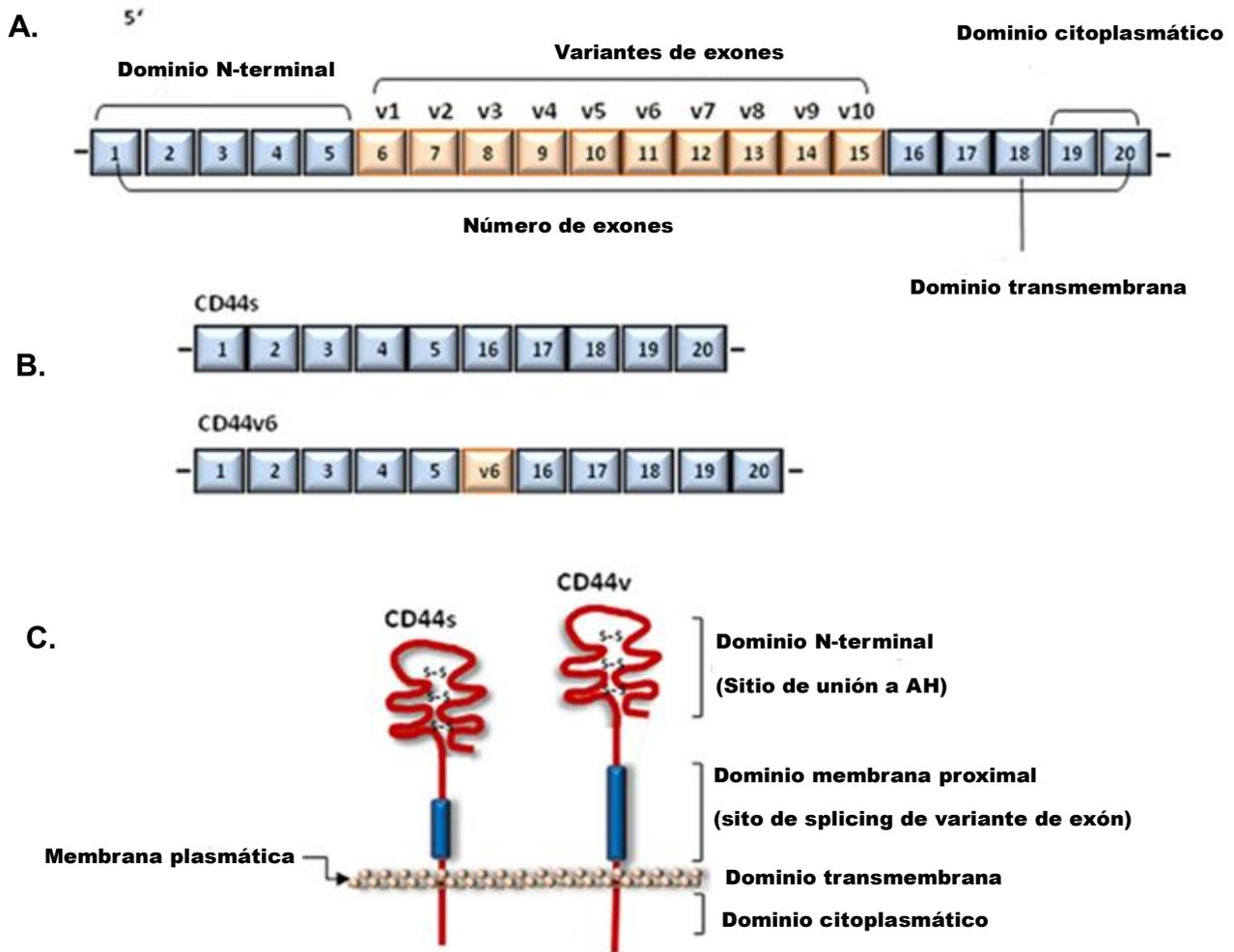
El control de la síntesis de AH es importante para el mantenimiento de la homeostasis tisular y depende de la degradación del mismo, que es llevada a cabo por la enzima Hialuronidasa (Hyal). Hay siete isoformas diferentes, siendo las más estudiadas Hyal1 y Hyal2, que producen fragmentos de AH de distinto tamaño a partir del clivaje de AH APM (Necas *et al.* 2008; Alaniz *et al.* 2009). Además de su degradación, el AH puede removerse por vía linfática y vascular, a través de la endocitosis mediada por receptor y ser eliminado en el hígado y en menor medida en el riñón, e incluso en el bazo (Laurent C. and Fraser 1992; Necas *et al.* 2008). Uno de los receptores que se unen al AH, es el receptor endotelial del vaso linfático 1 (LYVE-1), el cual es homólogo del receptor CD44, se expresa en los ganglios linfáticos y está involucrado en su internalización y degradación. Otro de los receptores, es el receptor endocítico para AH (HARE) que se expresa en los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo (Banerji *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2000). Ha sido reportado, además, que el receptor CD44 participa también en la captación y degradación de AH (Culty *et al.* 1992). Como se mencionó anteriormente, el tipo de AH encontrado en el medio, define la función que cumple en un momento determinado, siendo el AH APM encontrado mayormente durante los procesos normales y el AH BPM en procesos como la inflamación,

tejidos injuriados y en el microambiente de un tumor, favoreciendo los procesos tumorales (McKee *et al.* 1996; Bollyky *et al.* 2009).

El AH posee importantes funciones biológicas al interactuar con distintos receptores específicos de membrana como RHAMM, CD44, TLR, Layilin, entre otras proteínas como proteína asociada a hialurónico, derivada de suero (SHAP), la cadena pesada del inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina (ITI) (Aruffo *et al.* 1990; Huang *et al.* 1993; Bono *et al.* 2001; Nedvetzk *et al.* 2004; Sato *et al.* 2009). Está involucrado en diferentes procesos celulares como el crecimiento celular, la proliferación, apoptosis, migración, adhesión, diferenciación y angiogénesis, que favorecen la progresión tumoral. A través de su interacción con los diferentes receptores actúa como una molécula señal y activa las vías de señalización como MAP quinasa y vías PI3K / AKT, que induce señales de supervivencia y estimula la proliferación y la resistencia a la apoptosis; a través de la expresión de las metaloproteinasas induce la invasión y migración celular, modula la actividad multirresistente a través de la estimulación de la expresión de los genes MDR o MRP, promueve la angiogénesis a través de la vía FAK y ERK, entre otras señales (Alaniz *et al.* 2009). Sin embargo, el rol que pueda tener el AH en un tejido parece depender tanto del peso molecular como su concentración, el tipo de tejido y su localización. Hay evidencia de que existe una concentración elevada de AH en los tejidos tumorales y en el nivel sérico, que se correlaciona con la malignidad en muchos tipos de cáncer (Toole *et al.* 2002), además, de que su acumulación proporciona un microambiente favorable para la infiltración de fibroblastos al tumor, actuando como un quimioatrayente de células estromales y estableciéndose interacciones complejas entre células tumorales y células estromales que se infiltran. Se ha demostrado que este reclutamiento se debe a señales intracelulares a través de sus receptores como, CD44 y RHAMM, implicados en la migración e invasión de las células, además de la acción de otras moléculas de unión al AH (Itano and Kimata 2009). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos mediante los cuales el AH influye en el crecimiento y desarrollo del tumor durante la terapia antineoplásica es indispensable.

## ❖ CD44 y cáncer

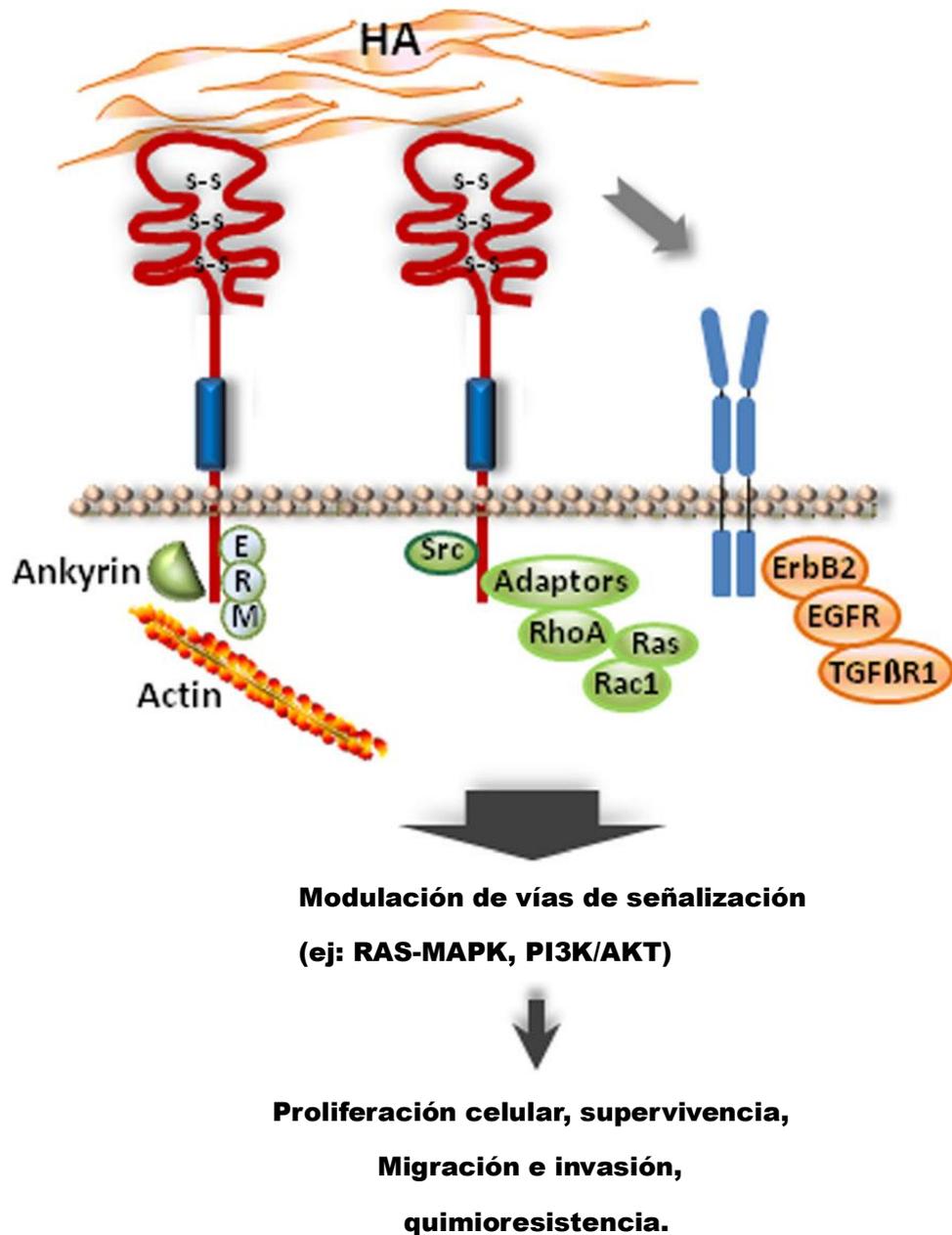
El receptor principal del AH, CD44, es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa ampliamente en diferentes tipos celulares y participa en varias funciones celulares, como la adherencia célula-célula y célula-matriz, la migración celular, la proliferación y la extravasación de linfocitos al sitio de injuria (Naor *et al.* 1997). El gen que codifica la proteína CD44, está compuesto de 20 exones, lo que da lugar a múltiples variantes de CD44 a través del splicing alternativo y el cual está regulado. La molécula varía entre 80 y 200 kDa, debido a las N y O-glicosilaciones y al splicing alternativo que permite la inserción de los exones variables. La existencia de diferentes isoformas del CD44, es evidencia del amplio rango de funciones que este posee y las funciones principales no son procesos separados, sino que están interconectados. La molécula de CD44 está compuesta de un dominio citoplasmático (cola citoplasmática) importante para la transducción de señales, un dominio transmembrana y varios dominios extracelulares. Se compone de regiones distintas; una región NH<sub>2</sub>-terminal, de unión al AH y una región de unión a otra molécula, por lo que puede unirse a varios ligandos distintos de acuerdo con su función, además de sitios para glicosilaciones (Figura 4). La cola citoplasmática está asociada a proteínas adaptadoras como anquirina y las proteínas ERM que se anclan a la actina del citoesqueleto, que tiene importancia en la participación de CD44 durante migración celular y funciona como una molécula accesoria en la transducción de señales, además de otras, debido a su asociación con las fosfoquinasas y puede asociarse con otras proteínas como Rho GTPasas, Rac y Ras. El CD44 puede asociarse con quinasas transmembranas importantes en la progresión del tumor, como la familia de las tirosinas quinasas ERBB, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2 y otros (Figura 5). Esta interacción con diferentes moléculas, además de las características morfológicas, es la causa de toda la gama de funciones de CD44. La capacidad de unión del CD44 al AH está finamente regulada. Existen diferentes estados de activación del receptor: una forma activa de unión al ligando o inactiva que no une el AH y ambos estados pueden ser regulados por cambios en la glicosilación, la inserción de variantes de exones, agrupación en la membrana o modulación del dominio citoplásmico (Isacke and Yarwood 2002; Marhaba and Zoller 2003).



**Figura 4: Estructuras genómicas y proteicas de CD44.** A) El gen CD44 humano consiste en 20 exones y codifica para los diferentes dominios de CD44. B) El ARNm de la forma estándar (CD44s) y la una forma variante (CD44v6). C) Glucoproteína transmembrana de un solo paso con sus cuatro dominios funcionales. Tomado y adaptado de Cortes-Dericks and Schmid. Respiratory Research 2017.

El receptor se expresa en muchos tipos de células, incluidos leucocitos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos y algunas células endoteliales, siendo la forma estándar, CD44s, la más abundantemente expresada. Las formas variantes se producen solo en determinados tipos de células, estados de activación y confiere a las células tumorales un fenotipo metastásico, como CD44v6 (CD44 exón variante 6), una de las principales

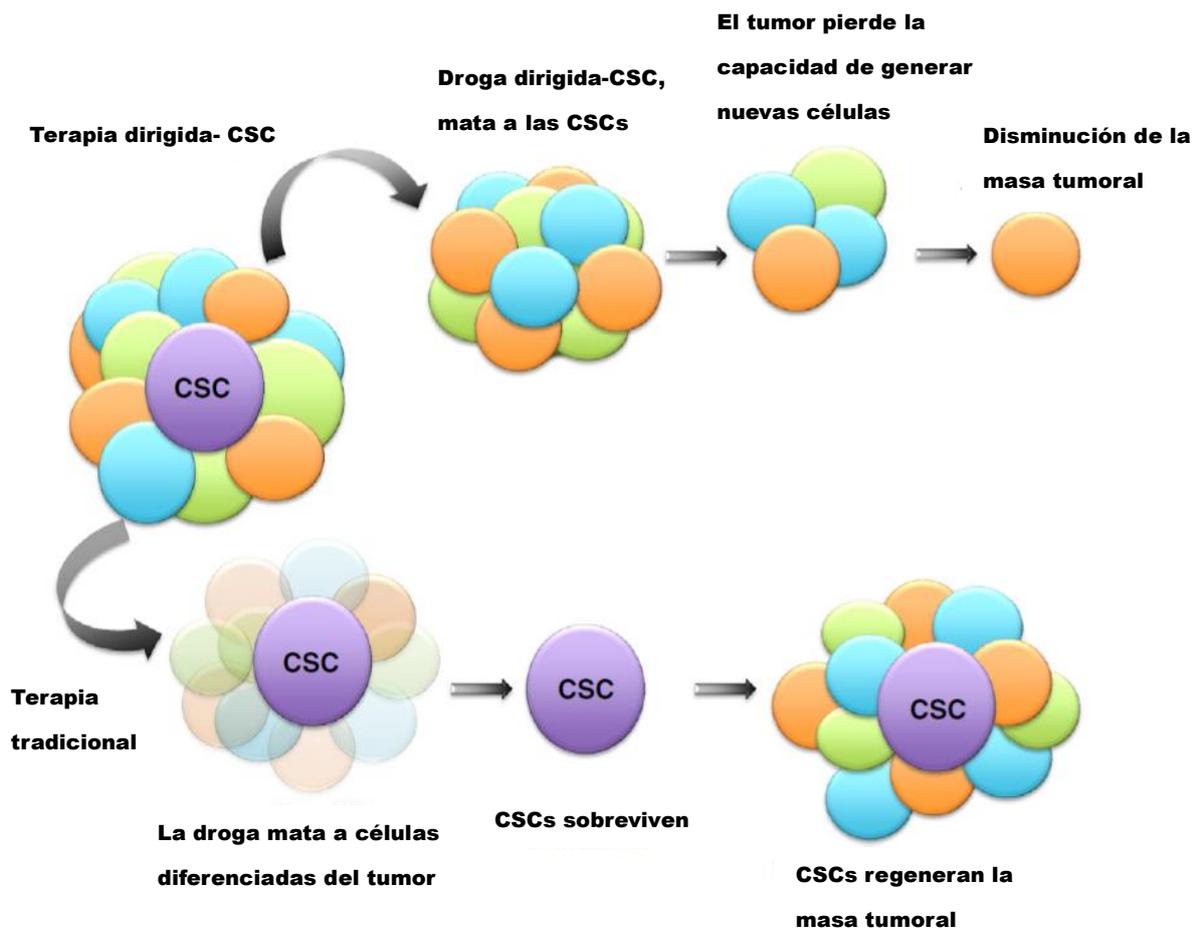
isoformas de CD44 que regula la invasión, progresión y metástasis del tumor (Senbanjo and Chellaiah 2017). El receptor CD44 está involucrado en múltiples procesos fisiopatológicos, como la proliferación celular, diferenciación, migración, angiogénesis. Además, el CD44 considerado como marcador de células madre tumorales, está involucrado en la resistencia a drogas terapéuticas y a la migración e invasión de múltiples tipos de tumores (Chanmee *et al.* 2015; Thapa and Wilson 2016). Estudios demostraron que la interacción entre el AH y CD44, activa diferentes vías de señalización como la vía PI3K-AKT, Wnt/ $\beta$ -catenin y otros, que lleva a distintos procesos de progresión tumoral. Por ejemplo, la interacción de AH con CD44, en una línea celular de cáncer de mama (MCF-7) resistente a doxorubicina, indujo la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP)-2 y MMP-9, que aumentó la capacidad invasiva de las células a través de la vía de señalización Ras/MAPK y esta interacción se relacionó también con el desarrollo de MDR en el cáncer (Fang *et al.* 2014). El receptor unido a AH, puede anclar la forma activa de MMP-9 en la superficie celular de las líneas tumorales y modular la secreción y activación de pro-MMP-2 por la metaloproteinasa de matriz tipo 1 transmembrana (MMP-1TM), quien cliva a CD44 generando un fragmento del dominio extracelular soluble, incrementando la diseminación del tumor por inducción de la migración celular (Isacke and Yarwood 2002). Se ha observado que, en cáncer de ovario, la quimioterapia con carboplatino indujo una sobreproducción de AH que a través de las vías de señalización por la interacción con CD44, contribuyó a la quimioresistencia por la regulación de la expresión de transportadores ABC (Ricciardelli *et al.* 2013). Esto confirma la importancia que tiene el estudio de la interacción AH-CD44 en el desarrollo de la quimioresistencia en las células tumorales y los mecanismos involucrados durante el tratamiento antitumoral.



**Figura 5: Interacción AH-CD44 en tumor.** La unión del AH, provoca una interacción de CD44 con ErbB2, EGFR y TGFβR1 a través del dominio citoplásmico. Puede unirse con diversas proteínas del citoesqueleto, como la proteína adaptadora del citoesqueleto de actina, anquirina, ezrin-redixina-moesina (ERM), componentes de señalización intracelular que incluyen las GTPasas de la familia Rho, quinasas Src y moléculas asociadas que transmiten señales intracelulares, activando vías como la de MAPK y PI3K/ AKT y modulando diferentes procesos celulares. Tomado y adaptado de Cortes-Dericks and Schmid. Respiratory Research 2017.

### ❖ **Células madre tumorales (CSCs)**

Las Células madre tumorales (CSC, de sus siglas en inglés, Cáncer Stem Cells), representan una subpoblación que impulsan la progresión del cáncer, y se han identificado en muchos tumores malignos. Aunque el origen de estas células sigue siendo foco de estudio, la heterogeneidad de los tumores y la presencia de pequeñas poblaciones de células con propiedades características similares a las células madre somáticas se han establecido en la mayoría de los tipos de tumores. Estudios indican que el origen de estas incluye, la fusión celular, la transferencia horizontal de genes, el microambiente celular y las mutaciones. La expansión de las CSCs está altamente influenciada por cambios en el microambiente, así como por alteraciones genéticas y epigenéticas. Algunas de las propiedades que pueden presentar estas células son: autorenovación, diferenciación multipotente, potencial tumorigénico, expresión de marcadores de células madre, resistencia a la quimioterapia, resistencia a la apoptosis (Bu and Cao 2012; Prabavathy *et al.* 2018). Uno de los marcadores tipo células madre, que se utilizó en este trabajo, es el CD90. Este marcador se ha identificado como un marcador de las CSCs en varios tipos de tumores y su expresión está asociada con el grado de malignidad y promueve la proliferación, resistencia a drogas y diseminación del cáncer. De esta forma, la expresión de CD90 a través de la técnica de citometría de flujo nos permitiría poder caracterizar el subconjunto resistente dentro de una población heterogénea (Yan *et al.* 2013). Las CSCs generalmente muestran una activación persistente de una o más vías de transducción de señales altamente conservadas involucradas en el desarrollo y la homeostasis tisular, incluidas las vías Notch, Hedgehog y Wnt (Takebe *et al.* 2015). La desregulación de estas vías de señalización desempeña un papel importante para permitir que las CSCs conserven sus propiedades y son cruciales para la tumorigenicidad de estas células, además de la expresión de los factores de transcripción específicos de células madre como Sox2, Klf4, Oct4 y Nanog. Están involucradas en el desarrollo de la heterogeneidad de las células tumorales, una característica clave de la resistencia y fracaso a los tratamientos antitumorales, de la terapia convencional como la quimioterapia y la radioterapia (Figura 6). La interacción de AH con CD44, genera las señales requeridas y proporciona un microambiente favorable para la autorenovación y el mantenimiento de las células madre.



**Figura 6: Respuesta de las células tumorales a las diferentes terapias.** Las terapias tradicionales contra el cáncer eliminan las células diferenciadas que se dividen rápidamente dentro de la masa tumoral. Sin embargo, las CSCs dentro de este microambiente tumoral sobreviven, continúan proliferando y poseen la capacidad de regenerar el tumor. En contraste, las terapias específicas que se dirigen y eliminan el subconjunto de CSCs dan como resultado un menor crecimiento del tumor y la disminución de la masa tumoral. Tomado y adaptado de Leon et al. *Pharmacology & Therapeutics* 2016.

El CD44, además de estar implicado en los procesos que mantienen la fuente de esta subpoblación característica, actúa como un marcador común de estas células en la mayoría de los tipos tumorales. El AH afecta directa e indirectamente a la autorenovación de las CSCs al influir en el comportamiento tanto del cáncer como de las células estromales (Chanmee *et al.* 2015). La resistencia a múltiples drogas en las CSCs es un obstáculo

importante para una terapia eficaz contra el cáncer y se puede atribuir parcialmente a la inducción de señales de supervivencia/antiapoptóticas y el aumento de la actividad de transportadores de membrana como consecuencia de esta interacción.

### ❖ **Resistencia a la apoptosis y supervivencia celular**

Las células tumorales desarrollan distintas estrategias para evadir la muerte celular y progresar en su desarrollo. A través de señales de supervivencia y antiapoptóticas en las células tumorales, el CD44 desempeña un papel clave en la resistencia a la apoptosis de las células tumorales. La interacción AH-CD44 desencadena la activación de la Src, una quinasa asociada a CD44, la fosforilación de ezrin, molécula adaptadora de la familia ERM y la activación de PI3K. Además, los receptores tirosina quinasa (RTK) promueven la supervivencia celular de forma cooperativa con CD44 (Ghatak *et al.* 2005), que además de la inducción de señales de supervivencia, puede conferir resistencia a la apoptosis. El CD44 también promueve la evasión de la apoptosis a través de la modulación de factores pro y antiapoptóticos, como en un estudio de células de colon donde la expresión de CD44 se correlacionó con alteraciones en caspasa 9, caspasa 3, Bcl-xL y Bak (Lakshman *et al.* 2004). En otro estudio, en las células de leucemia linfocítica crónica que mostraron altos niveles de CD44 en la superficie celular, la interacción con AH activó las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK para inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas y promover la supervivencia (Fedorchenko *et al.* 2013). Estos estudios indican que el CD44 desempeña un papel importante en la supervivencia de las células cancerosas que de manera dependiente a AH, confieren resistencia a la apoptosis, mecanismo importante en la resistencia a drogas.

### ❖ **Resistencia a múltiples drogas (MDR)**

La resistencia de las células tumorales a diferentes drogas antitumorales puede manifestarse como una característica innata o adquirida, y limita de manera crítica los resultados del tratamiento para los pacientes, lo que presenta un problema importante en el contexto clínico (Chang, 2011). Se han identificado varios mecanismos que son responsables, al menos en parte, del fenotipo resistente de la célula tumoral. Estos mecanismos se asocian a reducción en la captación de drogas, aumento del eflujo de drogas, alteraciones en las vías de reparación del ADN, alteraciones en las proteínas pro y antiapoptóticas como Bax, Bcl-2 y caspasas, entre otras. El aumento del eflujo de las drogas es debido a la sobreexpresión de genes de la familia de transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC (del inglés ATP-binding cassette) en la membrana celular, los cuales son responsables de la expulsión de la droga fuera de la célula en varios tipos de tumores (Gottesman *et al.* 2002). Existen 49 miembros conocidos de la familia de estos transportadores que transportan una variedad de sustancias a través de las membranas celulares. Los transportadores ABC se subdividen a su vez en siete clases o subfamilias (A-G) según la homología de su secuencia (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCG). Sin embargo, tres principales transportadores están implicados en la resistencia a drogas en muchos tumores: la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), también denominada Glicoproteína P (Pgp), de la subfamilia del gen ABCB1, la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1) relacionada con ABCC1 y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) relacionada con ABCG2, que poseen una amplia especificidad de sustrato y pueden expulsar muchos xenobióticos, incluidos los alcaloides de la vinca, las epipodofilotoxinas, las antraciclinas, los taxanos y los inhibidores de la quinasa de las células (Dean *et al.* 2005). En un estudio, se demostró que el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (DOX) indujo la regulación positiva de la expresión del gen de la proteína de resistencia al cáncer de mama (gen ABCG2) en las células endoteliales, lo que resultó en un aumento de 4-5 veces la resistencia al fármaco y una menor eficacia del tratamiento, al mismo tiempo que presentó una resistencia cruzada *in vitro* en líneas celulares HMEC para fármacos anti-angiogénicos, como sunitinib (Huang *et al.* 2015). En

otro estudio, de cáncer de mama, la expresión de Pgp se asoció con los niveles de resistencia in vitro a doxorubicina (Mechetner *et al.* 1998). La activación de CD44 promueve la resistencia a múltiples drogas en las células tumorales. En un estudio previo, las interacciones AH-CD44 indujeron la asociación de los factores Nanog y Stat-3 para estimular la expresión del gen MDR1 dependiente de Stat-3 (Bourguignon *et al.* 2008). Además, en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, la interacción AH-CD44 no solo indujo la expresión de MDR1 sino también la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) (Ohashi *et al.* 2007). En conjunto, los estudios revelan que existen mecanismos intrínsecos y adquiridos de la sobreexpresión de los transportadores ABC y el CD44 ocupa un rol destacado en el desarrollo de MDR de células tumorales y de las CSCs.

#### ❖ Factores pro-angiogénicos

Además de los mecanismos de resistencia a drogas, la angiogénesis sostenida por factores pro-angiogénicos también es considerado otros de los “Hallmarks” del cáncer que permiten la progresión tumoral, y este punto también fue objeto de estudio de este trabajo. El proceso de angiogénesis tumoral, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, es un paso fundamental en el crecimiento y la progresión del tumor, a través de la activación de varios factores angiogénicos, siendo los más importantes: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2). Otros factores angiogénicos incluyen angiopoyetinas, metaloproteinasas de matriz (MMPs), cadherinas e integrinas. Los cambios en el microambiente tumoral, la interacción del estroma y el rápido crecimiento del tumor mejora la neovascularización a través del aumento de factores angiogénicos, como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y el factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) (Nyberg *et al.* 2008; Chung and Ferrara 2011) los cuales fueron analizados en este trabajo.

**VEGF:** El VEGF es uno de los principales factores que desempeña un rol central en la respuesta angiogénica a diferentes estímulos tanto a la falta de oxígeno (hipoxia), como a factores de crecimiento y activación de oncogenes como Ras, citoquinas y otras moléculas extracelulares. El VEGF se compone de una familia cuatro genes (A, B, C y D) y sus

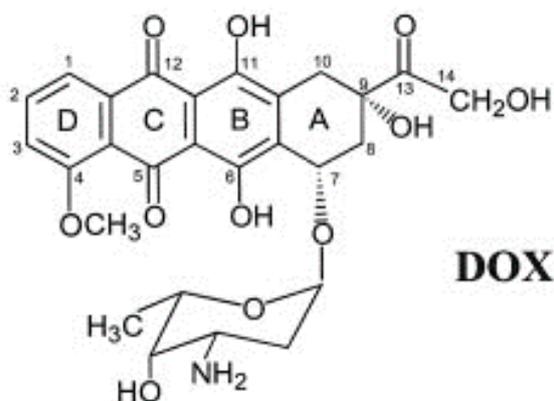
variantes, que ejercen su papel fisiológico a través de sus receptores tirosina quinasa, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 en células endoteliales y en otros tipos celulares. VEGFA (que se refiere al hablar de VEGF) se une a VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1), mientras que VEGF-C y VEGF-D, son ligandos del tercer receptor VEGFR-3, que media la linfangiogénesis. VEGFB por su parte, se une a VEGFR-1 (Flt-1) y está involucrado durante la angiogénesis embrionaria (Neufeld *et al.* 1999). Se ha demostrado que VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales (CE) y también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular. Induce fosforilación de varias proteínas y además induce el crecimiento de las CE por la activación de la vía Raf-Mek-Erk y señales antiapoptóticas a través de PI3K-AKT (Ferrara *et al.* 2003). Se ha demostrado que, en varios tipos de cáncer, el VEGF es el principal factor involucrado en la inducción de la angiogénesis tumoral y el bloqueo de anticuerpos de las interacciones VEGF/VEGFR tanto *in vitro* como *in vivo* o la inhibición química de los VEGFR previene la angiogénesis (Horn and Sandler 2009). El AH está implicado en la angiogénesis fisiológica y patológica, al realizar un vínculo entre la MEC, la angiogénesis, las células inmunes y el cáncer. El microambiente tumoral rico en AH contribuye de manera importante a la neovascularización del tumor mediante CD44, que libera factores pro-angiogénicos esenciales para la angiogénesis tumoral (Spinelli *et al.* 2015).

**Metaloproteinasas de matriz:** Las MMPs, otro de los factores pro-angiogénicos, son una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc, que degradan proteínas de la matriz extracelular y juegan un rol en la modulación del comportamiento celular que median diferentes actividades. La mayoría de las MMPs se sintetizan como enzimas latentes inactivas (zimógenos). La conversión de la actividad catalítica a enzima activa generalmente está mediada por sistemas activadores que incluyen el activador del plasminógeno o la prohormona convertasa, la furina, una serina endoproteasa. La actividad de la MMP está regulada por un grupo de proteínas endógenas, llamadas inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) que se unen a sitios activos y alternativos de la MMP activada. Constan de más de 21 MMPs humanas y numerosos homólogos de otras especies (Das *et al.* 2003; Malemud 2006). Las gelatinasas MMP-2, gelatinasa A (colagenasa de tipo VI de 72 kDa) y MMP-9, gelatinasa B (colagenasa de tipo VI de 92 kDa), pueden degradar el colágeno de tipo IV y la fibronectina y están estrechamente

relacionadas con la invasión y metástasis de células tumorales. Contribuyen también de manera importante a la angiogénesis permitiendo la formación de nuevos capilares y la liberación de VEGF (Zheng *et al.* 2006). A través de la interacción AH-CD44 se induce, en células tumorales, la expresión y activación de varias enzimas que degradan la MEC y esta regulación tiene un papel importante en el comportamiento de las células tumorales que permite la degradación de la matriz, la invasión, la metástasis y la angiogénesis durante la progresión del tumor (Spinelli *et al.* 2015).

### ❖ **Doxorrubicina: estructura química y mecanismo de acción**

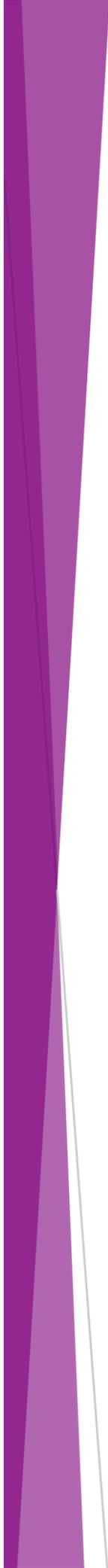
La doxorrubicina, también denominada hidroxildaunorrubicina, es una droga utilizada ampliamente en la terapia clínica para el tratamiento quimioterapéutico de una amplia variedad de tipos de cáncer como leucemias, linfomas, neuroblastomas, pulmón, mama, estómago, ovario, tiroides y vejiga, entre otros. Es un antibiótico perteneciente a las antraciclinas, aislado de una cepa de *Streptomyces* sp. (Arcamone, 1981). La doxorrubicina es derivada de la daunorrubicina y posee una estructura similar a ésta, ya que difiere únicamente por la presencia de un grupo hidroxilo en lugar de un grupo metilo de la cadena lateral (C-14), mostrando mayor eficiencia antineoplásica (Figura 7). Es un glucósido que posee grupos fenólicos del anillo que le aportan carácter ácido y por otro lado presenta una función básica en el anillo de amino-azúcar, siendo una molécula de carácter lipofílico (Minotti *et al.* 2004). Es administrada en los pacientes con cáncer principalmente por vía intravenosa (IV) e intravesical, debido a que de otra manera puede provocar daño tisular por su citotoxicidad. Sin embargo, se ha adoptado una forma de administración de la droga encapsulada en liposomas, la cual reduce su acción cardiotóxica (Gabizon *et al.* 2003). La doxorrubicina entra a la célula por difusión pasiva a través de un poro hidrofóbico en la membrana celular y su mecanismo de acción se basa en la intercalación entre los pares de bases de las hebras del ADN y el bloqueo de la síntesis de ARN y ADN, ya que la misma inhibe la acción de la topoisomerasa II y detiene así el proceso de replicación. Además, induce apoptosis celular debido a la generación de radicales libres del oxígeno que provoca un daño a las membranas celulares, el ADN y las proteínas (Thorn *et al.* 2011).



**Figura 7: Estructura química de doxorubicina.**

Consiste en un anillo tetracíclico (aglicona) responsable del color rojo típico de las antraciclinas, con grupos quinona-hidroquinona adyacentes en los anillos C-B, un sustituyente metoxi en C-4 en el anillo D, y una cadena lateral corta en C-9 con un carbonilo en C-13. El azúcar, llamado daunosamina, se une mediante un enlace glucosídico al C-7 del anillo A y se compone de un resto, 3-amino-2,3,6-tridesoxi-L-fucosiltransferasa. Tomado y adaptado de Minotti *et al.*, *Pharmacological reviews* 2004.

Las células en fase S son más sensibles al agente debido a que en esta fase se sintetiza el ADN de la célula hija y cuando la doxorubicina se une al ADN, la célula no puede continuar con el ciclo celular ni dividirse. De esta manera, las células tumorales que poseen alta tasa de proliferación son afectadas por la acción antitumoral de esta droga (Arcamone, 1981). De acuerdo con su amplia utilización en la mayoría de los tumores como tratamiento único o como terapia combinada, la droga se ha utilizado en este trabajo en experimentos *in vitro* usando distintas líneas celulares tumorales.



# Hipótesis y Objetivos

## **HIPÓTESIS:**

La interacción Ácido Hialurónico, en particular la forma de bajo peso molecular (AH BPM)-CD44 favorece la generación de nichos que albergan células tumorales multirresistentes y productoras de factores angiogénicos. Por lo que la terapia moduladora de los sistemas AH-CD44 incrementa la efectividad del tratamiento antitumoral clásico al afectar el microambiente tumoral y las células tumorales propiamente dichas.

## **OBJETIVO GENERAL:**

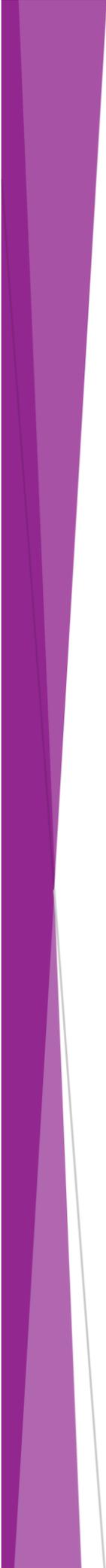
Estudiar la interrelación del sistema AH BPM-CD44 con la capacidad de modular la respuesta tumoral a doxorubicina en líneas celulares tumorales humanas de distinta etiología.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Evaluar:

- a)** La activación AH BPM-CD44 en líneas celulares tumorales H1299 y MDA-MB-231 en presencia de doxorubicina.
- b)** La generación de células tumorales resistentes a doxorubicina expuestas a tratamiento con AH BPM.
- c)** La capacidad de estas células de producir factores pro-angiogénicos (VEGF y MMPs) en respuesta al tratamiento combinado doxorubicina-AH BPM.

**PALABRAS CLAVES:** Ácido Hialurónico, CD44, doxorubicina, microambiente tumoral, resistencia a múltiples drogas.



# Materiales y Métodos

### **Líneas celulares y reactivos:**

Para realizar este trabajo se utilizaron líneas celulares humanas de cáncer de distinta etiología histológica. Las mismas fueron seleccionadas en base a: 1) la frecuencia en el diagnóstico tanto en hombres o mujeres, como el carcinoma de pulmón y mama 2) a los que se aplica diferentes terapias en combinación con la terapia estándar.

Por lo tanto, se utilizaron las líneas celulares H1299 (ATCC®, CRL-5803™), de carcinoma de pulmón; cedidas por Dr. Bayo Fina, Hospital Austral y MDA-MB-231 (ATCC®, HTB-26™) adenocarcinoma mamario, cedidas por la Dra. R Schellici. La identidad de las mismas fue certificada y autenticada por la empresa Northgene Ltd. (UK), y se realizó la prueba para descartar la presencia de contaminación por micoplasma mediante ensayo de PCR.

Los reactivos que se utilizaron son:

- Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH BPM 1–3,3 x 10<sup>5</sup> Da) provisto por Farmatrade Argentina (Contipro), diluido en agua ultra pura hasta 6 mg/ml, a partir del cual se utilizaron las dosis de 20 y 100 ug/ml para los experimentos.
- Doxorubicina (DOX), cordialmente donada por Laboratorios FILAXIS s.a., Argentina, diluida en solución fisiológica a una concentración de 40 uM para su utilización, a partir del cual se utilizaron las dosis de 0,5; 1 y 2,5 uM para los experimentos.
- 4-metilumbeliferona (4-Mu), de Sigma Aldrich, preparado en agua pura a una concentración de 50 mM, de la cual se utilizó a una concentración final de 0,25 mM.
- Ciclosporina A (CsA), Sandimmun Neoral (Novartis), diluida en solución fisiológica a una concentración de 4,1 mM y a partir de la cual se utilizaron las dosis de 50, 100 y 1000 uM.

**Cultivo celular:**

Se realizaron los cultivos correspondientes de las líneas celulares en monocapa sembrando en placas de Petri de 60 cm de diámetro. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM-F12 para la línea celular MDA-MB-231 y RPMI 1640 para H1299, suplementado con 1% de glutamina, penicilina, estreptomina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Las mismas se mantuvieron en estufa a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando los cultivos celulares alcanzaron un 90% de confluencia, se realizó un lavado con PBS a 37°C, y las células adherentes se colectaron mediante el uso de Tripsina al 0,25 %; las cuales luego fueron amplificadas en nuevas placas de Petri para obtener el número de células correspondientes según los requerimientos del experimento posterior a realizar.

**Tratamiento celular y ensayos experimentales:**

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 12 pocillos con una densidad de  $4,5 \times 10^5$ /ml de células en cada pocillo, para la extracción de ARN, que se utilizó en los experimentos posteriores y a una densidad de  $2,5 \times 10^5$ /ml células para el análisis de citometría de flujo. Las células se estabilizaron durante 24 hs para la adherencia de las mismas en la superficie de la placa con sus respectivos medios en SFB al 5% antes de los tratamientos. Las células fueron tratadas con 20 y 100 ug/ml de AH de bajo peso molecular por 24 hs, y luego con DOX en concentraciones de 0,5; 1 y 2,5 uM por 12 hs, incluyendo los respectivos controles. Cumplido el tiempo del tratamiento, las células en adherencia se colectaron con el uso de Trizol (TRI Reagent®) para la posterior extracción de ARN. Se colectaron los sobrenadantes de cada tratamiento y se conservaron hasta el momento de su utilización en freezer de -80°C. Para el análisis por citometría, las células fueron colectadas con PBS frío.

## **-Evaluación de la expresión de CD44 en la membrana celular.**

**Citometría de flujo:** Se analizó la expresión basal de CD44 de la membrana celular en ambas líneas celulares. Las células se levantaron con PBS frío, a partir de una placa con  $2,5 \times 10^5$  células/well (sin tratamiento previo con DOX y AH) y se centrifugaron a baja densidad (2000 r.p.m) para la obtención de las mismas en el sedimento, las cuales fueron resuspendidas en 100 ul de solución FACS. Para la marca se adicionó 1 ul de anticuerpo anti-CD44 conjugado a PE y se incubó durante 40 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron analizadas por el citómetro de flujo FACS Canto II (BD BioSciences) y se calculó el porcentaje de células que expresan CD44, utilizando el software FlowJo 7.6.

## **-Modulación del eflujo de DOX por AH BPM-CD44 en distintas líneas celulares tumorales.**

Se analizó el efecto del estímulo con AH BPM de distintos PM sobre la respuesta a drogas terapéuticas, como doxorubicina (DOX). Las células tratadas ( $2,5 \times 10^5$ /well) con DOX y AH con las concentraciones mencionadas más arriba, se recolectaron de cada well con PBS frío y se realizó una centrifugación a baja densidad para obtener las células contenidas en el sedimento. Las mismas fueron posteriormente resuspendidas en solución FACS, las cuales se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II (BD BioSciences). Debido a que DOX emite fluorescencia, la misma se detectó en una longitud de onda de 550-600 nm (PE) y el porcentaje de células con DOX en su interior fue calculado. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.

Un estudio adicional se realizó para analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de AH endógeno sobre el flujo de DOX en las células H1299, utilizando 4-metilumbeliferona (4-Mu) como inhibidor, en una concentración de 0,25 mM. Las células fueron tratadas en primera medida con 5 ul del inhibidor para cumplir 48 hs, y luego el tratamiento con AH y DOX, como ya se mencionó. Los resultados del porcentaje de células con DOX en su interior fueron medidos también a través de la citometría de flujo.

### **-Análisis de expresión del gen CD44:**

**Extracción de ARN y RT-PCR:** Se extrajo el ARN total usando Trizol (TRI Reagent®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Research Center, inc) y se cuantificó la concentración de ARN por espectrofotometría a través del programa PicoDrop Spectrometer Application (v.4.0.0.0). Luego, se realizó la síntesis de ADNc (ADN complementario) a través de la reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) de una reacción que incluyó 2 ug de ARN previamente extraído, 100 U de Transcriptasa Reversa MMLV (Promega), 10 mM de dNTPs, 10 pmoles de cebador oligo 15dT (5' TTTTTTTTTTTTTTTT 3') en buffer de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de DTT), en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo a 42°C durante 1 hora y 1 ciclo de 10 min a 90°C, utilizando el termociclador Veriti (Applied Biosystems).

**RT-qPCR:** La expresión de ARNm del receptor CD44, se analizó a través de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de una reacción que incluyó 1,5 µl del producto de reacción de la RT-PCR (ADNc), 7,5 µl de Kit FastStart SYBR Green Master (Roche-FastStart ADN Taq Polimerasa, dNTPs, buffer de reacción y SYBR Green), cebadores forward y reverse del gen en un volumen final de 15 µl. La secuencia de los cebadores de CD44 son: Forward 5'GTGATGGCACCCGCTATG3' y Reverse 5'ACTGTCTTCGTCTGGGATGG 3'. Como normalizador de la expresión endógena, se utilizó el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la secuencia de los cebadores son: Forward 5'GGGGCTGCCAGAACATCAT 3' y Reverse 5'GCCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'. Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo a 95°C durante 10 min; 40 ciclos de 20 seg a 95°C, 1 min a 58°C y 40 seg a 72°C, seguido de un ciclo final de 20 seg a 95°C, y los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron utilizando el equipo LineGene 9600 (Bioer). Los valores de CT fueron normalizados al gen GAPDH de expresión constitutiva, y calibrado al control (no tratado) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## **-Evaluación de la generación de células resistentes a drogas por el tratamiento con AH BPM.**

**Apoptosis celular:** Se estudió el efecto del AH sobre la sobrevivencia de las células tratadas con DOX y AH ( $2,5 \times 10^5$ /well) a través de la citometría de flujo. Se realizaron ensayos de apoptosis marcando las células con Anexina V-APC, se detectó la fluorescencia de las mismas y se calculó el porcentaje de apoptosis. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6.

**Funcionalidad de bombas de expulsión:** Se estudió por citometría de flujo, el efecto del bloqueo de las bombas de expulsión de la droga en células tumorales tratadas con DOX ( $2,5 \times 10^5$ /well), utilizando Ciclosporina A (CsA) como bloqueante en las concentraciones de 50, 100 y 1000  $\mu$ M por 1.30 hs, luego de los tratamientos correspondientes. Las mismas fueron analizadas a través de FlowJo 7.6. El estudio se realizó determinando la capacidad de las mismas de expulsar la DOX en presencia o no de bloqueante de bombas de expulsión de droga.

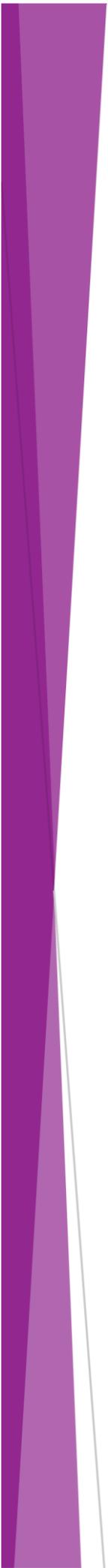
**Expresión de CD90:** La detección de células con características de células madres y resistentes a DOX se realizó determinando la población que expresan uno de los marcadores tipo células madres: CD90, en las células H1299. Las células tratadas anteriormente con DOX y AH ( $2,5 \times 10^5$ /well), fueron recolectadas con PBS frío y luego resuspendidas en 100  $\mu$ l de solución FACS. Para la marca, se adicionó 1  $\mu$ l de anticuerpo anti-CD90 conjugado a FITC y se incubó durante 40 minutos a 4°C en oscuridad. Para el análisis correspondiente se incluyeron los respectivos controles de los fluorocromos para realizar la compensación de los mismos (PE y FITC). Cumplido el tiempo, se midió el porcentaje de células que expresan el marcador de superficie a través de la citometría de flujo.

## **-Evaluación de la expresión de proteínas pro-angiogénicas en las células tumorales.**

**ELISA:** Para la detección de la proteína VEGF secretada al medio extracelular por parte de las células estimuladas con AH y tratadas con DOX ( $4,5 \times 10^5$ /well), los sobrenadantes de las mismas fueron utilizados para realizar la técnica de ELISA (human VEGF DuoSet, R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de VEGF en el medio, fue determinado por espectrofotometría midiendo la densidad óptica (DO) a 450 nm.

**Ensayo de Zimografía:** Se analizó la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), como la MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), a partir de los sobrenadantes condicionados de las células H1299 previamente tratadas ( $4,5 \times 10^5$ /well), a través de la zimografía en gelatina. Un volumen de 30  $\mu$ l de sobrenadante por well fueron sembrados de cada muestra y resueltos en gel SDS-PAGE 10 % en presencia de 1% de gelatina. Los geles resultantes fueron lavados con una solución que contenía el buffer Tris-HCL 50mM (PH 7,5) y 2,5% de Tritón X-100 por 1 h en agitación suave, para eliminar el SDS de los geles. Luego fueron lavados con una segunda solución que contenía el buffer Tris-HCL 50mM (PH 7,5),  $\text{CaCl}_2$  5mM,  $\text{ZnCl}_2$  1 $\mu$ M y 2,5% de Tritón X-100, por 1h en agitación suave. Los geles se incubaron en solución Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía  $\text{CaCl}_2$  10 mM y NaCl 200mM, hasta el día siguiente a 37 ° C para activar las MMPs. Los geles activados se tiñeron con colorante Coomassie Blue R-250 al 1% en metanol al 30% y ácido acético glacial al 10% con agitación durante 3 hs y posteriormente se destiñeron con 25% de isopropanol y 10% de ácido acético glacial dos veces por 30 minutos. La actividad gelatinolítica de las gelatinasas se detectó como una banda clara sobre un fondo oscuro. La intensidad de cada banda fue determinada por densitometría a través del software ImageJ.

**Estadística:** Para el análisis estadístico, los intervalos de confianza (IC) del 95% se determinaron calculando los valores medios aritméticos y la varianza (desviación estándar, DS). Se evaluaron si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de los distintos tratamientos para todos los experimentos, utilizando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Dunn posterior para la comparación múltiple de todos los tratamientos, considerando estadísticamente significativo, un  $p < 0,05$ . Para el análisis de todos los datos y la obtención de los respectivos gráficos, se utilizó el software GraphPad Prism.



# Resultados

➤ **Expresión de CD44 en la membrana celular:**

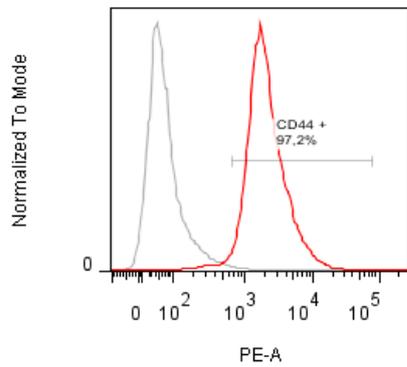
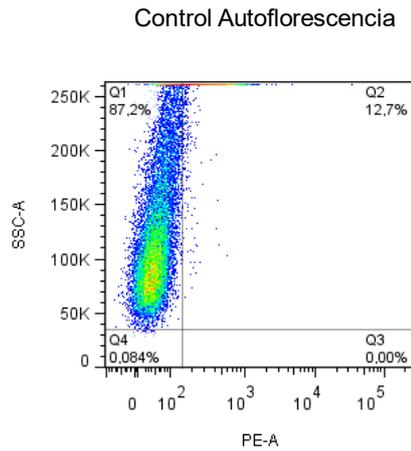
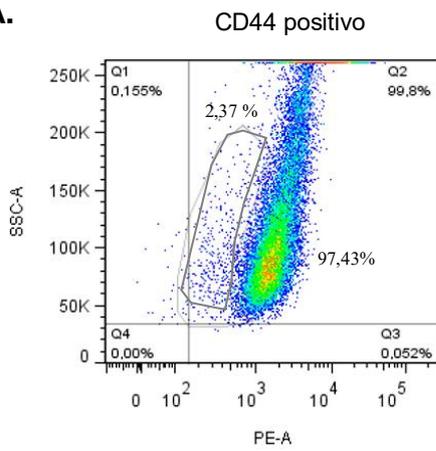
En primer lugar, se analizó la expresión de CD44 en la membrana celular de ambas líneas celulares de estudio, por citometría de flujo, para luego analizar la respuesta de las mismas al tratamiento con AH BPM. Como ya ha sido reportado anteriormente, la expresión de CD44, en estas líneas celulares tumorales, es alta (Udabage L. *et al.* 2005; Shi Y. *et al.* 2014). En este trabajo, el análisis de la expresión de CD44 también fue realizado para corroborar dichos resultados.

De esta manera, se observó que ambas líneas celulares expresaron altos niveles de CD44 en la superficie celular, siendo el 99,8% y 99% para MDA-MB-231 y H1299 respectivamente. Además, se observaron dos poblaciones celulares que expresan diferente nivel de CD44 en cada línea celular y que se refleja en la intensidad de fluorescencia, siendo de mayor proporción las células con alta intensidad de fluorescencia (CD44<sup>alto</sup>) y en menor proporción las células con baja intensidad de fluorescencia (CD44<sup>bajo</sup>).

Se puede observar la población positiva para la expresión de CD44 en comparación con el control negativo (autofluorescencia), siendo el 97,43% de CD44<sup>alto</sup> y el 2,37% de CD44<sup>bajo</sup> para el caso de la línea celular MDA-MB-231 (Figura 8A) y el 88,1% de CD44<sup>alto</sup> y 10,9% CD44<sup>bajo</sup>, para el de la línea celular H1299 (Figura 8B). A partir de este resultado, las líneas celulares se utilizaron para analizar la capacidad de respuesta de las mismas al tratamiento en estudio.

# MDA-MB-231

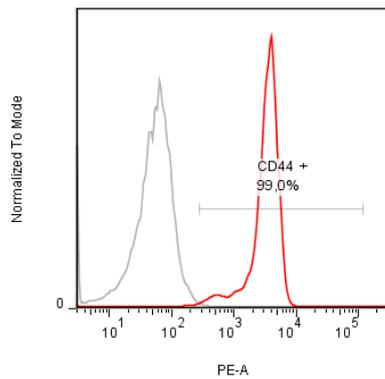
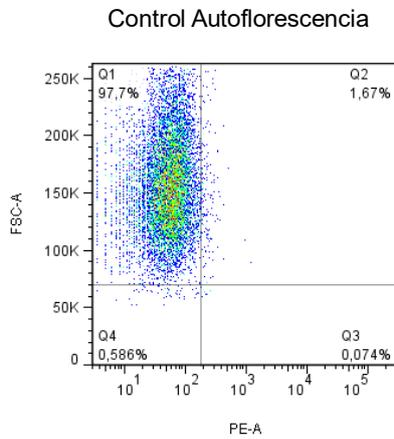
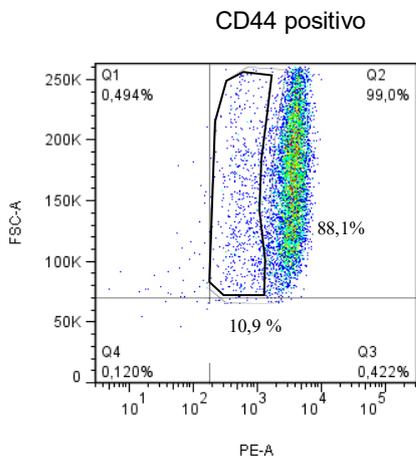
**A.**



**Figura 8. Expresión de CD44 en la superficie celular.** Representación de la expresión basal de CD44 por citometría de flujo. Gráficos de Dot plot e histogramas de las células (A) MDA-MB-231 y (B) H1299 (n=1).

# H1299

**B.**



➤ **Modulación del eflujo de DOX por AH BPM-CD44 en distintas líneas celulares tumorales**

**Acumulación intracelular de DOX:**

Se analizó el efecto del tratamiento de AH con las concentraciones de 20 y 100 ug/ml de bajo peso molecular (AH BPM 20 y AH BPM 100) en la acumulación intracelular de doxorubicina (DOX) con las concentraciones de 0,5; 1 y 2,5 uM (0,5D; 1D y 2,5D respectivamente) como se detalló en materiales y métodos.

Se realizó el estudio de la modulación por AH exógeno sobre el eflujo de DOX, dependiente de las bombas de expulsión, donde se observó la fluorescencia intracelular por incorporación de la DOX a través de citometría de flujo en ambas líneas tumorales. Se analizó el porcentaje de células positivas, es decir, el número de las células que contenían DOX en su interior con respecto al total de la población celular.

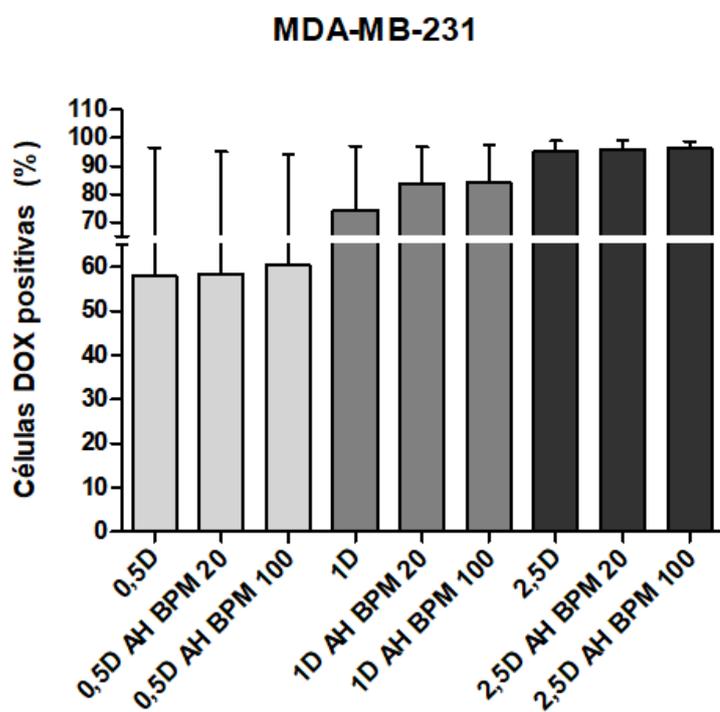
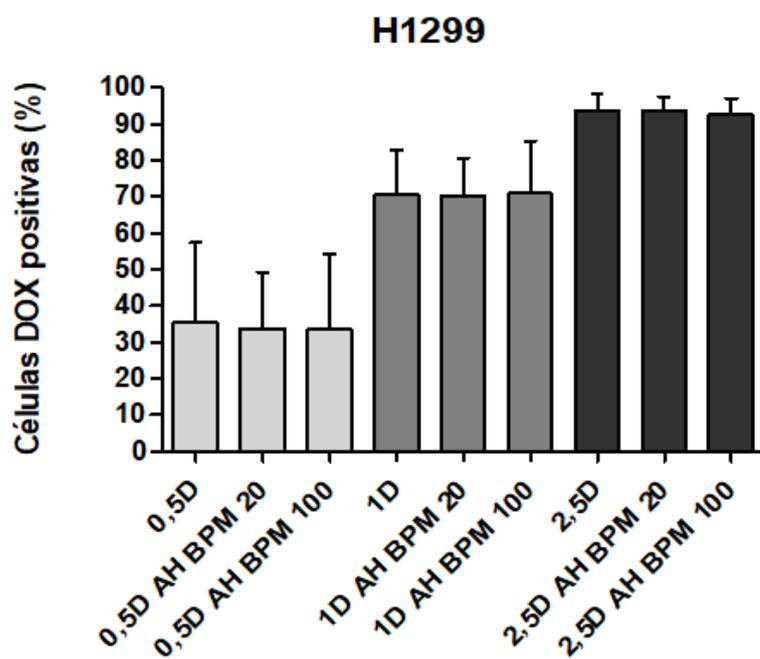
En las líneas celulares utilizadas en este trabajo se observó una correlación directa y positiva entre la fluorescencia intracelular observada y la concentración de DOX utilizada. En este sentido, a mayor concentración de DOX utilizada, mayor fue la fluorescencia detectada.

Se observó que tanto para la línea celular H1299 como para MDA-MB-231, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) entre los tratamientos para cada concentración de DOX utilizada (Figura 9A). Sin embargo, para la línea celular H1299, se pudieron distinguir diferentes poblaciones bien definidas con respecto a la captación de DOX por parte de las células, por lo que se pudo determinar que existe una población heterogénea con respecto de la respuesta al tratamiento (Figura 9B). Para la línea celular MDA-MB-231, en cambio, no se pudieron distinguir dichas poblaciones (Figura 9C). Como se muestra en la Figura 9D, las poblaciones de H1299 pueden definirse claramente y para identificarlas, cada población fue marcada con un color diferente. Cuando se trataron las células con 0,5D y 1D, dentro de la población total P1 (población roja) , se distinguieron dos subpoblaciones positivas que se caracterizaron por la

concentración de DOX acumulada en su interior y que se refleja en la intensidad de fluorescencia. Siendo la de mayor intensidad de fluorescencia la subpoblación DOX<sup>alta</sup> (P2, verde) y la de menor intensidad de fluorescencia la subpoblación DOX<sup>baja</sup> (P3 azul); y una subpoblación negativa que no incorporó DOX en su interior (P4 lila). Sin embargo, cuando se trataron las células con 2,5D, la subpoblación negativa (P4, lila) se modificó pasando a ser una subpoblación DOX positiva. De esta manera, la población total (P1, roja) pasó a estar compuesta de tres subpoblaciones positivas para DOX, que se diferencian también en la intensidad de fluorescencia: DOX<sup>alta</sup> (P2, verde), DOX<sup>media</sup> (P3, azul) y DOX<sup>baja</sup> (P4, lila). Debido a que la concentración de 2,5D resultó ser saturante para las células, donde la fluorescencia alcanzó casi el 100%, se decidió no incluir esta dosis en los experimentos posteriores de funcionalidad.

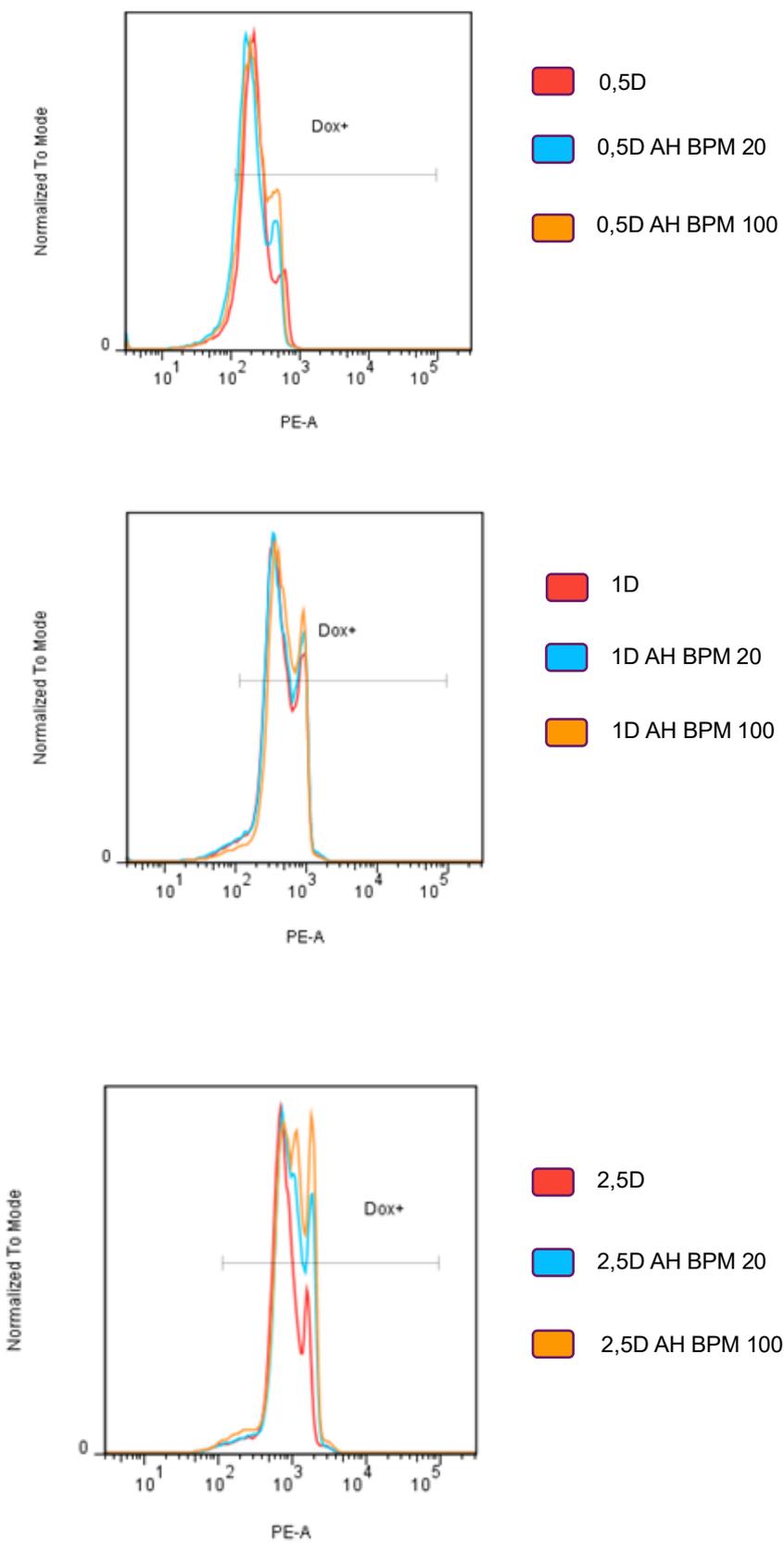
Al analizar la proporción de cada una de las subpoblaciones celulares, se muestra que el porcentaje de las mismas es diferente entre las distintas concentraciones de DOX utilizadas y al mismo tiempo, cada una posee una proporción diferente dentro de cada concentración en combinación con AH BPM, tal como se muestra en la tabla (Figura 9E). Se puede observar que con respecto a la subpoblación P2, hubo un aumento de la misma cuando se combinaron las tres concentraciones de DOX (0,5D; 1D y 2,5D) con AH en sus dos concentraciones (AH BPM 20 y AH BPM 100). De manera inversa, la subpoblación P3 tiende a disminuir en combinación con el AH BPM. Esta es la que representa el mayor porcentaje con respecto a las demás subpoblaciones. La subpoblación P4, negativa con las concentraciones de 0,5 y 1D, y positiva con la concentración de 2,5D, es la que representa el menor porcentaje con respecto a las demás subpoblaciones para las tres concentraciones de DOX. El tratamiento con AH BPM exógeno afecta el eflujo de DOX en las células de estas subpoblaciones, sin embargo, este efecto no se observó en la población total. Sería necesario un estudio aún más detallado de estas poblaciones para analizar su comportamiento a los diferentes tratamientos y determinar la significancia estadística de los resultados.

A.



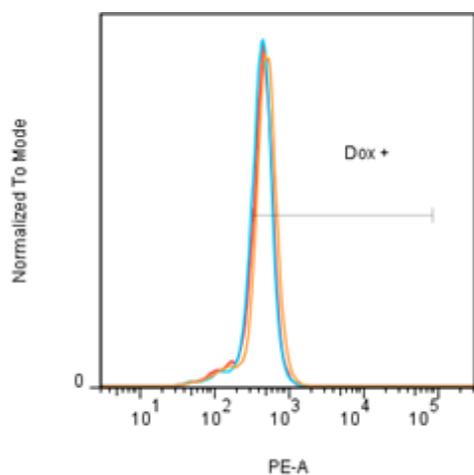
**B.**

**H1299**

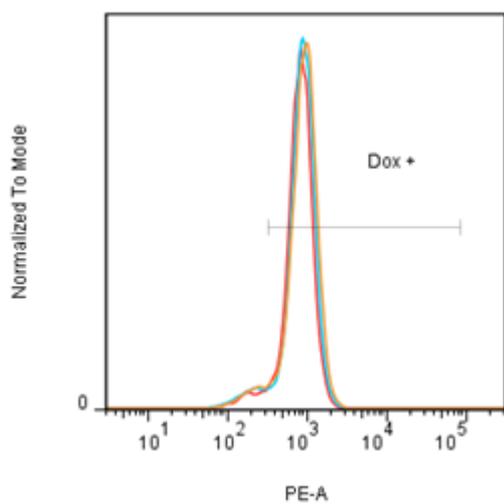


C.

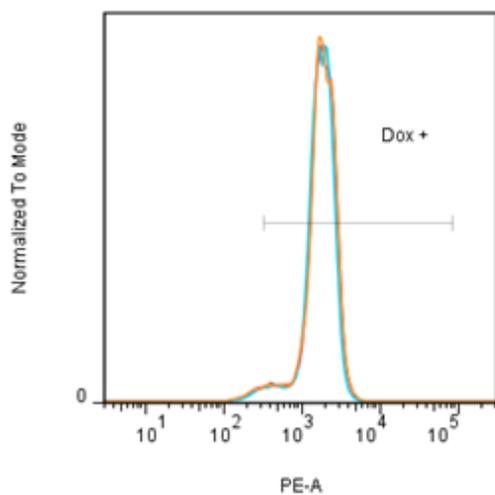
### MDA-MB-231



- 0.5D
- 0.5D AH BPM 20
- 0.5D AH BPM 100

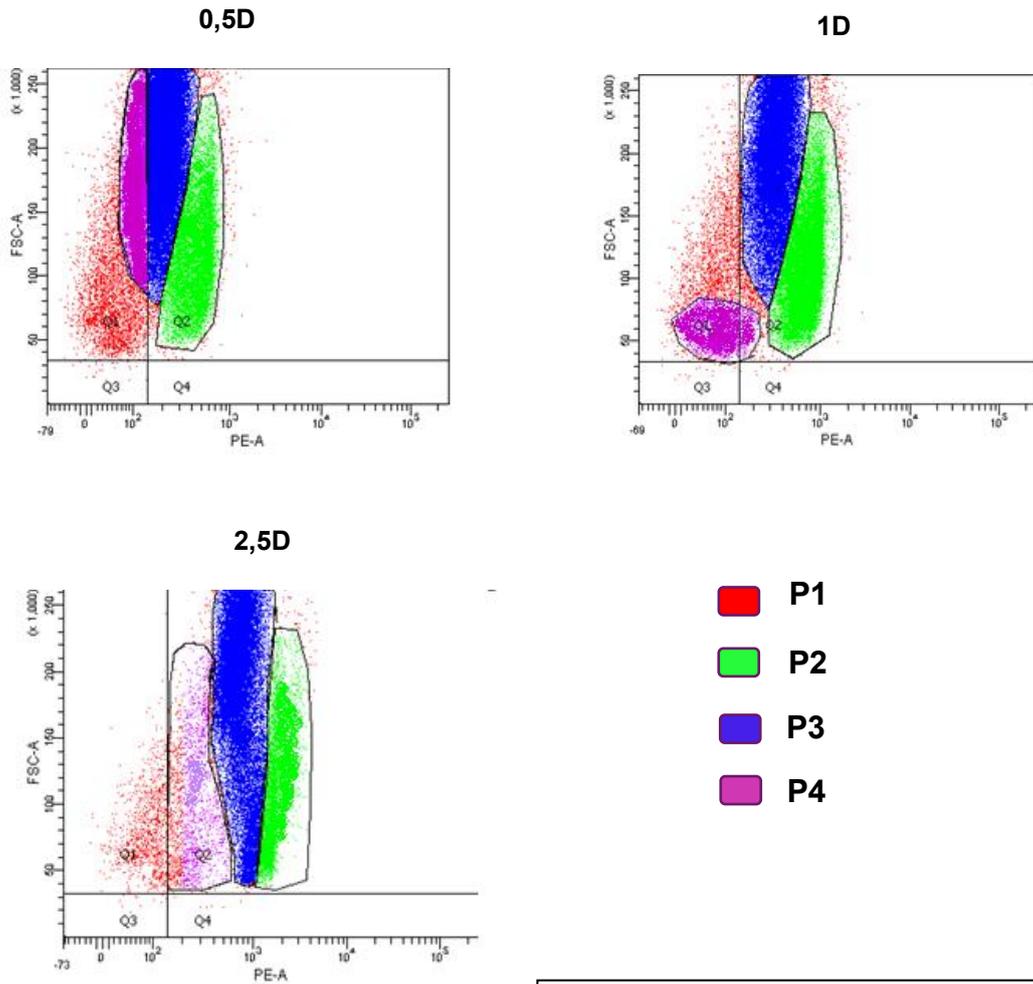


- 1D
- 1D AH BPM 20
- 1D AH BPM 100



- 2,5D
- 2,5D AH BPM 20
- 2,5D AH BPM 100

D.

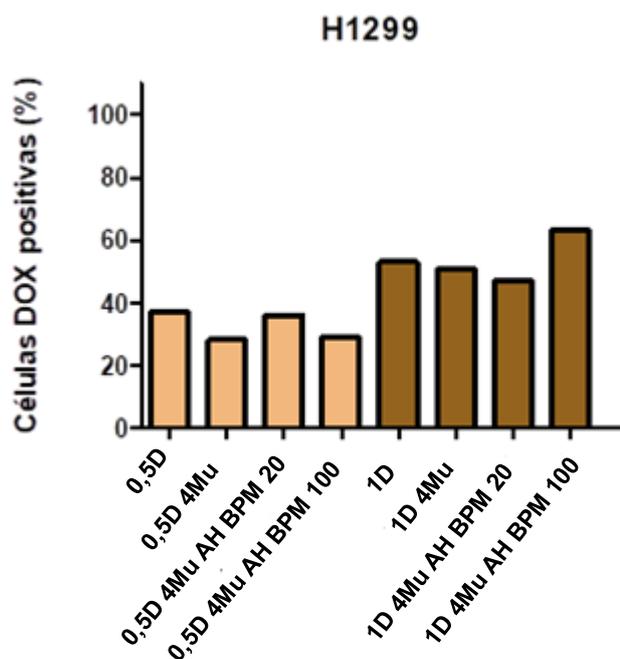


E.

| Tratamientos    | % P2 | % P3 | % P4 |
|-----------------|------|------|------|
| 0,5D            | 16,7 | 76,9 | 9,2  |
| 0,5D AH BPM 20  | 20,3 | 71,8 | 16,8 |
| 0,5D AH BPM 100 | 26,6 | 66,6 | 11,4 |
| 1D              | 32   | 59   | 4,1  |
| 1D AH BPM 20    | 35,1 | 55,3 | 4,4  |
| 1D AH BPM 100   | 39,2 | 53,9 | 3,4  |
| 2,5D            | 13,8 | 77,6 | 3,3  |
| 2,5D AH BPM 20  | 22,5 | 65,7 | 3    |
| 2,5D AH BPM 100 | 24,3 | 63,4 | 3,2  |

**Figura 9: Análisis de acumulación intracelular de DOX.** Representación gráfica a través de citometría de flujo. (A) Células H1299 y MDA-MB-231 positivas para DOX estimuladas con AH BPM. Los valores analizados se expresan como la media aritmética del porcentaje de células positivas  $\pm$  DS sobre el total de células analizadas de tres experimentos independientes. Análisis de histogramas para las concentraciones de 0,5D; 1D; 2,5D en combinación con AH BPM 20 y 100 se muestran del experimento más representativo para (B) H1299 y (C) MDA-MB-231. (D) Gráficos de Dot plot de las poblaciones celulares para cada concentración de DOX (0,5D, 1D y 2,5D) en H1299. (E) Porcentajes de cada subpoblación en respuesta al tratamiento sobre la población total de H1299. (n=3)

Como se observó anteriormente, el tratamiento realizado no afectó el eflujo de DOX de la población total de las células H1299 en las distintas concentraciones. Sin embargo, hubo un pequeño cambio con respecto al eflujo de DOX en las subpoblaciones que componen la población total cuando se trató con AH BPM exógeno. Un ensayo complementario fue realizado en esta línea celular, para analizar si el AH endógeno producido por las células está involucrado en los resultados observados. Para inhibir la síntesis del AH endógeno, se utilizó 4-metilumbeliferona (4-Mu) como inhibidor específico de AH, el cual se ha utilizado en trabajos previos para disminuir diferentes mecanismos de progresión tumoral (Piccioni *et al.* 2015), incluso mejoró la sensibilidad de diferentes células tumorales a drogas terapéuticas (Nakazawa *et al.* 2005; Lomparría *et al.* 2013). A través de la citometría de flujo se analizó la captación intracelular de DOX en las células H1299 durante el tratamiento con 4-Mu y en combinación con AH BPM exógeno. Se utilizó una concentración de 0,25 mM del inhibidor y luego con el tratamiento de AH BPM y DOX como se mencionó en materiales y métodos. Se observó que con el tratamiento de 1D 4-Mu AH BPM 100 hubo un aumento de células DOX positivas. Sin embargo, no se observó aumento intracelular de DOX en el tratamiento con 4-Mu sin AH BPM en ambas concentraciones de DOX, como podría esperarse (Figura 10). Es necesario realizar otros experimentos adicionales y la respectiva estadística para confirmar los resultados.



**Figura 10. Acumulación intracelular de DOX en presencia del inhibidor de la síntesis de AH.** Células H1299 tratadas con AH BPM exógeno y DOX, en presencia de 0,25 mM del inhibidor de la síntesis de AH endógeno (4-Mu) (n=1).

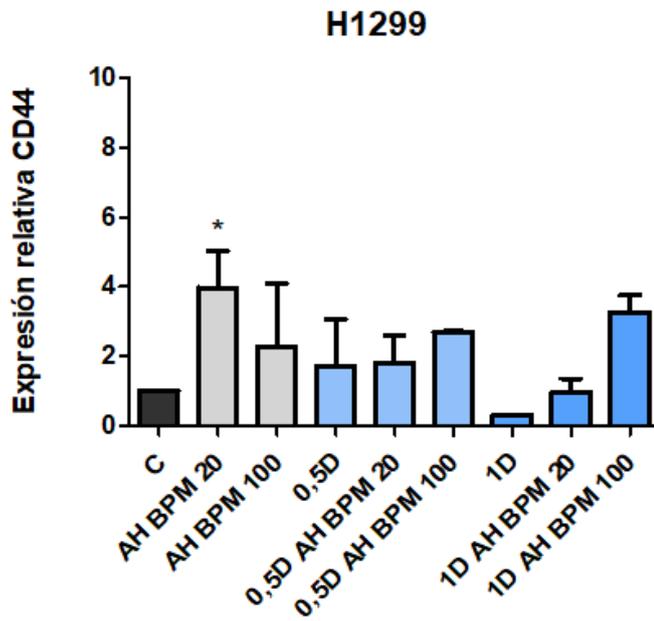
### **Evaluación de la expresión del ARNm de CD44:**

Como se mencionó en un principio, la molécula de CD44 es el receptor más importante del AH que está involucrado en varios procesos durante el desarrollo tumoral. Por este motivo, se realizó el estudio de la activación de CD44 por parte del AH BPM durante el tratamiento con DOX, para observar de esta manera si existe una modulación a nivel del ARNm de la expresión de dicho receptor.

Se analizó a través de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real el nivel de expresión de ARNm de CD44 y se determinó el cambio en la expresión del mismo en las células tumorales de ambas líneas celulares tratadas anteriormente.

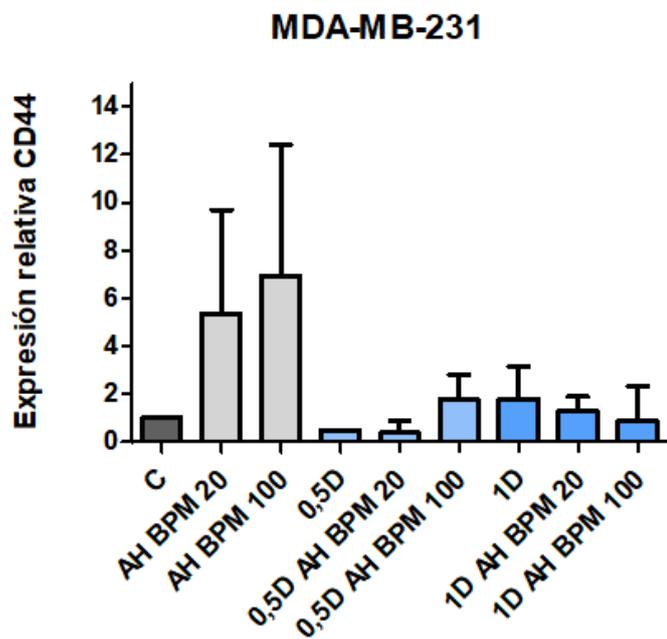
En la Figura 11 se puede observar que en las células tratadas con AH BPM en sus dos concentraciones aumentó el nivel de ARNm, siendo significativo para AH BPM 20 (\*p= 0,0427) en la línea celular H1299. Sin embargo, cuando se combinó con el tratamiento de DOX, aumentó la expresión de CD44 en mayor medida con el tratamiento de 1D AH BPM 100, pero tal tendencia no resultó ser significativa de acuerdo con el análisis estadístico realizado. En la línea celular MDA-MB-231, no hubo diferencias significativas, aunque el nivel de ARNm aumentó en ambas concentraciones de AH BPM, mientras que no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos cuando se combinó con las distintas concentraciones de DOX.

El incremento en la expresión de CD44 sugiere que la modulación de la misma depende de la concentración de AH presente en el microambiente tumoral y el tipo de tumor.



**Figura 11: Análisis de la expresión de CD44.**

Nivel del ARNm de CD44 medido por RT-qPCR de células H1299 y MDA-MB-231 tratadas con DOX y estimuladas con AH BPM. Los resultados están normalizados con la expresión de GAPDH en dichas células y relativizados al control utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Los valores se expresan como la media aritmética  $\pm$  DS de dos experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ;  $P = 0,0427$  con respecto al control,  $n=2$ ).



➤ **Evaluación de mecanismos celulares indicativos de resistencia a drogas**

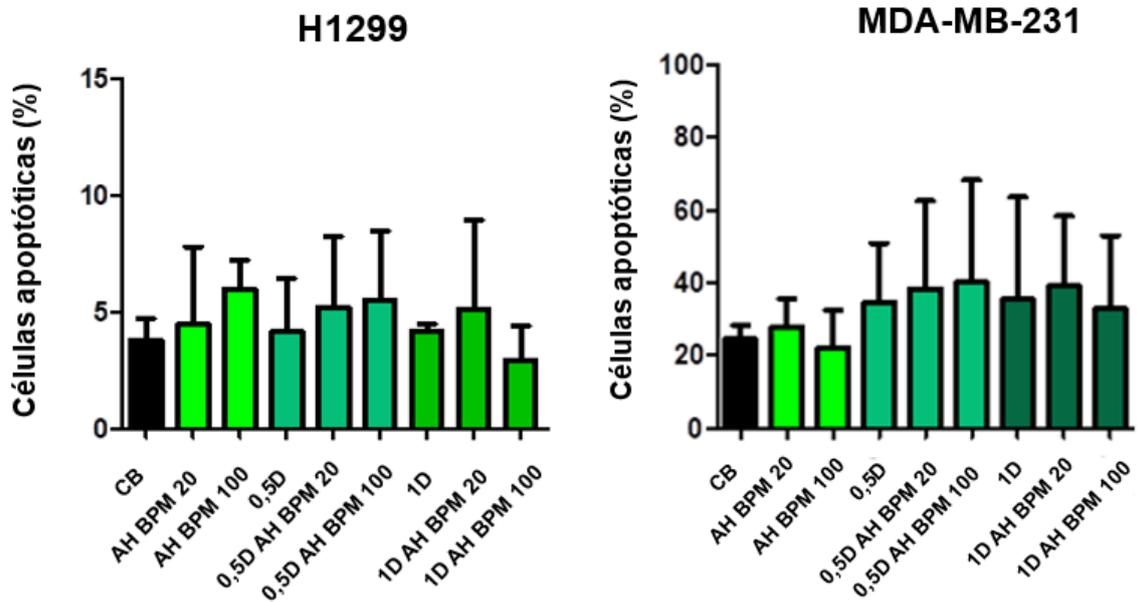
**Modulación de la apoptosis celular:**

Uno de los mecanismos de las células tumorales involucrados en la resistencia a varias drogas terapéuticas es la intervención en los mecanismos de apoptosis celular evitando así la muerte y favoreciendo la sobrevida de las mismas.

La doxorubicina es una droga utilizada ampliamente en distintos tipos de cáncer, debido a que la misma es un intercalante de ADN que induce apoptosis de las células tumorales.

Para analizar el efecto del tratamiento con DOX y la combinación con AH BPM en la modulación de la sobrevida de las células tumorales, las mismas células fueron tratadas como se mencionó anteriormente con DOX (0,5D y 1D) y AH BPM. A través de la citometría de flujo, se midió el nivel de apoptosis de la población celular en cada tratamiento. La apoptosis se midió observando la fluorescencia marcando las células con Anexina-APC, la cual se une a fosfatidilserina de la superficie celular como señal de muerte celular. Solo las células que expresaron en su superficie las señales de muerte fueron marcadas y de ese modo detectada la señal.

Se observó que el nivel de apoptosis celular no resultó ser significativamente diferente al tratar las células con DOX en las concentraciones 0,5D y 1D y en combinación con AH BPM en ninguna de las líneas celulares. Al observar el nivel de apoptosis de las células tratadas en combinación con DOX y con AH BPM 100 en las H1299, muestra una tendencia del AH BPM de disminuir el nivel de apoptosis con respecto al control basal. Sin embargo, tal tendencia no es significativa. Además, se observó un bajo porcentaje de apoptosis, principalmente en la línea celular H1299. Al mismo tiempo, no hubo ninguna asociación de la muerte celular con la concentración de DOX utilizada en el tratamiento de ambas líneas celulares (Figura 12). De esta manera, se podría pensar que el AH BPM exógeno no tendría un rol significativo en la modulación de la apoptosis durante el tratamiento de las células tumorales con DOX, utilizada en la terapia clínica.



**Apoptosis detectada por Anexina  
(media + DS)**

|            | CB              | AH<br>BPM 20    | AH<br>BPM 100   | 0,5D             | 0,5D AH<br>BPM 20 | 0,5D AH<br>BPM 100 | 1D               | 1D AH<br>BPM 20 | 1D AH<br>BPM 100 |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------|
| MDA-MB-231 | 24,35<br>± 2,85 | 27,85<br>± 5,38 | 22,06<br>± 7,44 | 34,65<br>± 11,46 | 38,35<br>± 17,08  | 40,3<br>± 19,91    | 35,85<br>± 19,91 | 39,12<br>± 13,7 | 32,85<br>± 14,25 |
| H1299      | 3,8<br>± 1,2    | 4,45<br>± 3,5   | 5,95<br>± 2     | 4,13<br>± 3      | 5,31<br>± 3,9     | 5,49<br>± 4,2      | 4,15<br>± 0,67   | 5,08<br>± 4,9   | 2,94<br>± 2,8    |

**Figura 12: Modulación de la apoptosis celular.** Análisis de la apoptosis a través de citometría de flujo, en células H1299 y MDA-MB-231 tratadas con DOX y estimuladas con AH BPM. El porcentaje de células apoptótica es representado como la media aritmética ± DS de tres experimentos independientes (n=3).

### **Expresión de marcadores tipo células madre tumoral:**

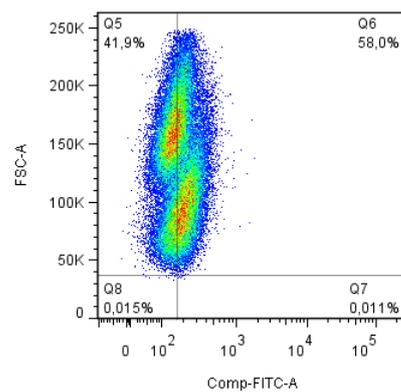
Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a drogas y la consecuente recidivas de los tumores es la existencia de una población tumoral con características de célula madre. Estas células tienen en su superficie diferentes marcadores que las distinguen. Uno de los marcadores principales en la mayoría de los tipos de cáncer, es el CD90, sobre todo en cáncer de pulmón. Se analizó si existe una modulación en la expresión de CD90, solo en el caso de la línea celular H1299, por parte del AH BPM durante el tratamiento con DOX en las concentraciones utilizadas (0,5D y 1D).

A través de la citometría de flujo se midió la fluorescencia de células marcadas con CD90-FITC, solo y en combinación con DOX(PE) en las mismas células. Al observar el gráfico del análisis de la citometría de flujo de las células en los diferentes tratamientos, se puede apreciar dos poblaciones separadas según el tamaño celular, y dentro de estas, la expresión de CD90 no es uniforme (Figura 13A). El nivel de expresión de CD90 se representó como el porcentaje de las células que expresan tal marcador. Se observó que el porcentaje total de la expresión de CD90 no varía significativamente entre los tratamientos y con respecto al control basal (Figura 13B). Al analizar separadamente las células que expresan CD90 y no acumulan DOX en el interior (CD90+ DOX-) y las que expresan CD90 y acumulan DOX en el interior (CD90+ DOX+), se observó que la proporción de cada una cambia según el tratamiento. Tanto para el control basal como para ambas concentraciones de AH BPM poseen la totalidad de la población CD90+ DOX-, ya que no se trataron estas células con DOX. El tratamiento con DOX en sus dos concentraciones y en combinación con AH BPM, están compuestas mayormente por células CD90+ DOX+, sin embargo, se puede observar que, la dosis de 0,5D posee una proporción de células CD90+ DOX-, siendo esta población la resistente ya que las mismas no acumulan DOX en su interior. Se observó una tendencia al aumento de esta población (CD90+ DOX-) con el tratamiento de 0,5D en combinación con AH BPM, pero tales diferencias no son significativas. Por lo tanto, la proporción de células que expresan CD90 e incorporan o no la droga, depende de la dosis de DOX y de AH BPM utilizada (Figura 13C). Las células componen una población heterogénea dentro de la línea tumoral, que podría variar en el transcurso de la enfermedad y de acuerdo con el tratamiento utilizado.

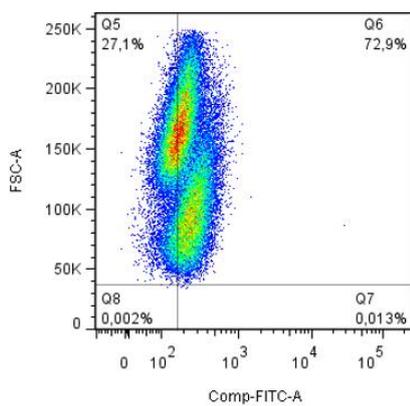
A pesar de que la expresión de CD90 en las H1299 puede dar un indicio en el contexto tumoral, se debería estudiar también otros marcadores específicos en conjunto para completar la caracterización como células madres tumorales y en particular para cada línea celular en estudio. Así, el análisis nos permitiría obtener una visión más amplia con respecto a la modulación de esta población de células tumorales y de esta manera poder encontrar un blanco terapéutico específico en el tratamiento antitumoral.

**A.**

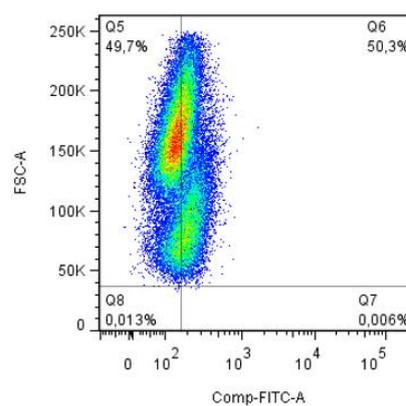
**CB**



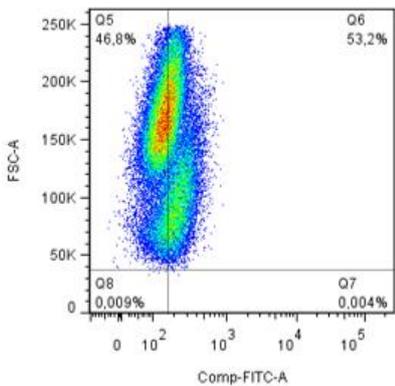
**AH BPM 20**



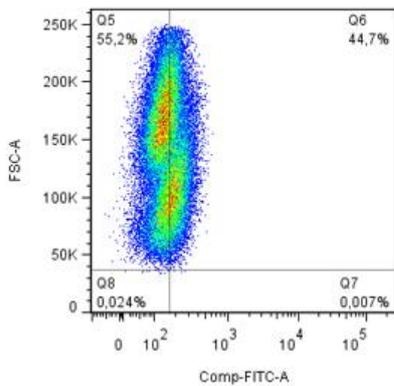
**AH BPM 100**



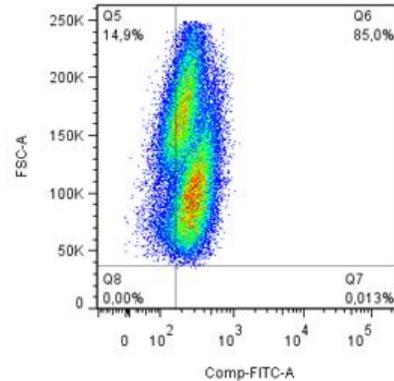
0,5D



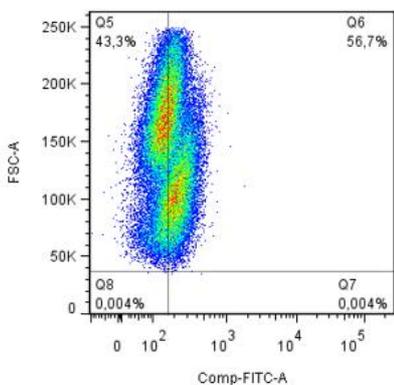
0,5D AH BPM 20



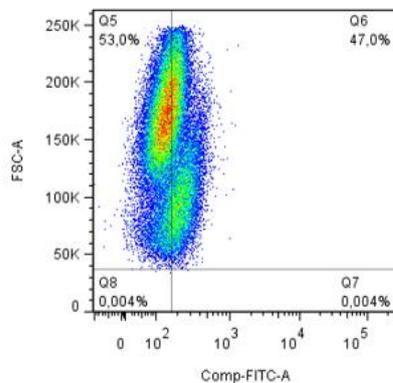
0,5D AH BPM 100



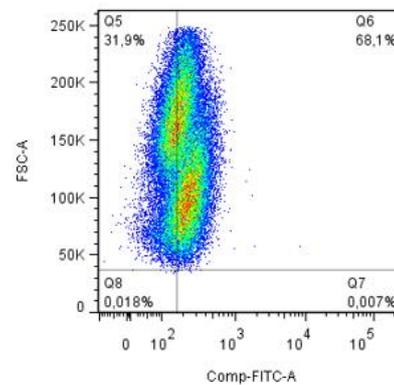
1D



1D AH BPM 20

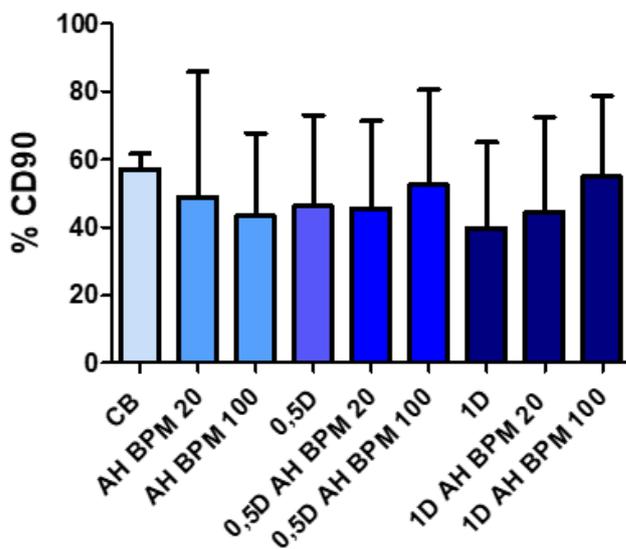


1D AH BPM 100

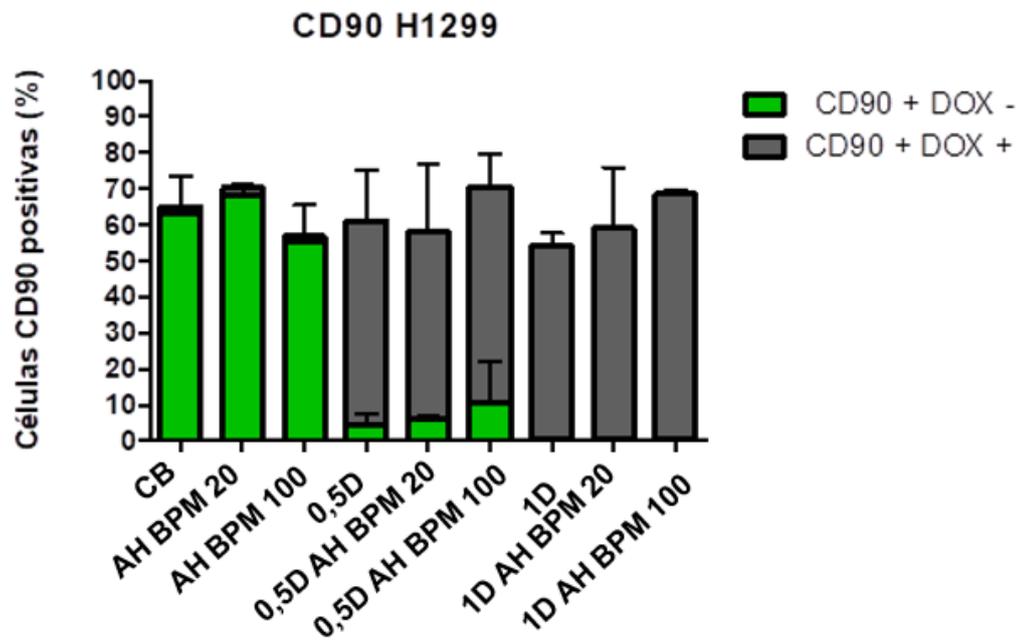


**B.**

**H1299**



C.



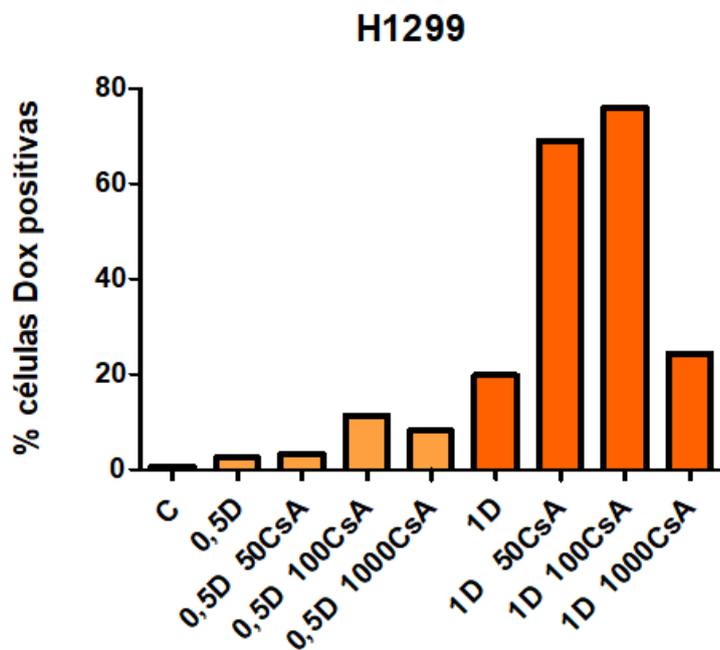
**Figura 13: Análisis de la expresión de CD90.** Representación gráfica a través de la citometría de flujo (A) Dot plot de la población celular que expresa CD90 en cada tratamiento del experimento más representativo. (B) Porcentaje total de células que expresan CD90 durante el tratamiento de DOX en combinación con AH BPM. (C) Porcentaje de células CD90+DOX+ y CD90+DOX- en cada tratamiento. Los valores se muestran como la media aritmética  $\pm$  DS de tres experimentos independientes (n=3).

### **Funcionalidad de las bombas de expulsión de DOX:**

Para analizar el funcionamiento de las bombas que se encargan del transporte a través de la membrana celular y expulsión de la droga hacia el exterior celular durante el tratamiento con DOX, se utilizó un bloqueante de las mismas en células tumorales H1299 tratadas como se mencionó anteriormente. Solo se realizó el análisis de funcionalidad en las células H1299, ya que no se observó modulación del AH en combinación con DOX en ninguna de las concentraciones utilizadas en las células MDA-MB-231.

Se utilizó Ciclosporina A como bloqueante de las bombas de expulsión en tres concentraciones diferentes; 50, 100 y 1000 uM (50 CsA, 100 CsA y 1000 CsA respectivamente) por un período corto de 1h 30 min, luego del tratamiento con DOX (0,5D y 1D). Cumplido el tiempo de tratamiento se midió el porcentaje de células positivas para DOX a través de la citometría de flujo.

Se pudo observar que, en el tratamiento con 0,5D se detectó un efecto en la inhibición de la bomba de expulsión cuando se trataron las células con 0,5D y 100CsA, de esta manera se incrementó la retención intracelular de DOX en comparación con 0,5D solo. Con el tratamiento de 1D, en cambio, se observó un efecto más marcado con las concentraciones de 50 y 100 CsA, de un incremento de DOX intracelular, con un porcentaje de células DOX positivas similar para ambas concentraciones del bloqueante con respecto a 1D solo. Al tratar las células con la concentración de 1000 CsA se observó un efecto contrario en ambas concentraciones de DOX, por lo que disminuyó el porcentaje de células positivas para DOX (Figura 14). En este sentido, una alta concentración de Ciclosporina A podría estar activando otro mecanismo para expulsar la droga o aumentando el nivel de apoptosis celular. De esta manera, seguir con un estudio de este efecto podría ser de utilidad. Este resultado confirma la funcionalidad de las bombas y que las mismas están involucradas en el proceso de expulsión de la droga que se relaciona con el fenotipo de un tumor multirresistente.



**Figura 14: Análisis de la funcionalidad de las bombas de expulsión.**

Representación gráfica del porcentaje de células DOX positivas a través de citometría de flujo en presencia o no de Ciclosporina A (CsA), (n=1).

- **Evaluación de la expresión de proteínas pro-angiogénicas y de matriz extracelular en estas células tumorales asociadas a resistencia a drogas.**

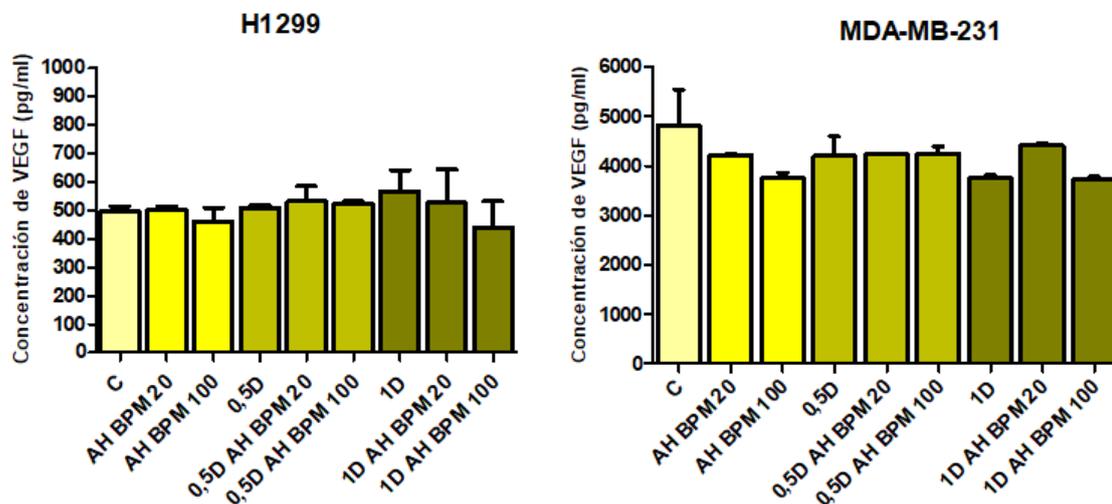
### **Expresión de VEGF:**

Una de las proteínas claves en el proceso de angiogénesis tumoral, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y que a su vez está asociado a mecanismos de resistencia a drogas (Vitale *et al.* 2018). Este proceso está vinculado con una mayor agresividad del tumor en conjunto con un fenotipo resistente a drogas antitumorales.

Para analizar si existe una modulación en la expresión de VEGF secretada por las células H1299 y MDA-MB-231 por parte del AH BPM durante el tratamiento con DOX, se midió el nivel de concentración de esta proteína en el sobrenadante de las células tratadas con anterioridad a través de ELISA.

Como se muestra en la Figura 15, no se observó diferencias significativas en el nivel de VEGF secretado al medio entre las distintas dosis de los tratamientos con DOX y en combinación con AH BPM con respecto al control en ninguna de las líneas celulares utilizadas en el estudio.

Si bien, VEGF es clave para este proceso, existen otros factores que podrían estar interviniendo en la angiogénesis tumoral, como por ejemplo FGF-2. Así, el tratamiento utilizado muestra que no estaría involucrado en este proceso a través de VEGF o al menos otros factores son determinantes en la activación de dicho proceso. Es necesario estudios adicionales que demuestren tal modulación.



**Figura 15: Análisis de la concentración de VEGF.**

Expresión del nivel de VEGF en pg/ml a través de ELISA de los sobrenadantes condicionados de células H1299 y MDA-MB-231 tratadas con DOX y en combinación con AH BPM. Los valores son representados como la media aritmética  $\pm$  DS de tres experimentos independientes (n=3).

### **Actividad de MMPs:**

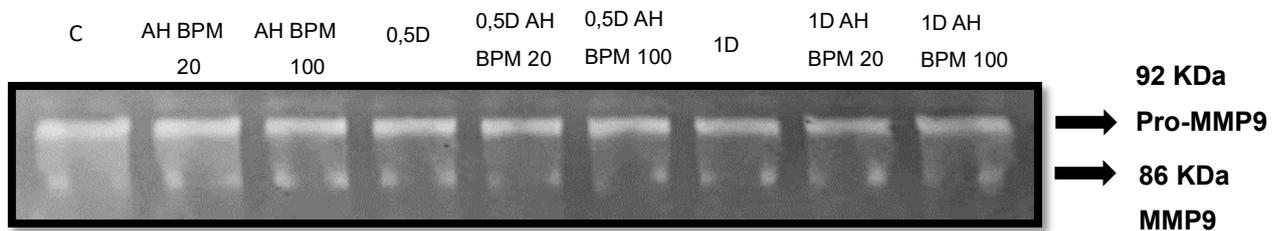
Para analizar parte del secretoma del tumor durante el tratamiento, se analizó además la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) a través de la técnica de zimografía. Las enzimas proteolíticas de la familia de MMPs que degradan el colágeno tipo IV de la matriz extracelular, son secretadas como pro-enzimas y activadas luego por escisión para su actividad catalítica. La expresión de estas proteínas que pueden regular varios procesos de progresión tumoral además de “modelar la matriz extracelular” puede estar relacionada con la resistencia a drogas. Las enzimas principales MMP9 y la MMP2, son expresadas en la línea celular tumoral H1299. Por lo tanto, el estudio de la modulación en la expresión y actividad de las mismas fue realizado en este trabajo.

En esta línea tumoral H1299, se detectó tanto la forma completa de la MMP9 (pro-MMP9) de 92 KDa como la forma activa de la misma (MMP9) de 86 KDa secretada en el sobrenadante de las células tratadas con DOX y en combinación con AH BPM (Figura 16A). Se determinó el nivel de actividad mediante el análisis densitométrico utilizando el software ImageJ (Figura 16B). Además, se detectó MMP2, pero solo en su forma completa (pro-MMP2) de 72 KDa (Figura 16C). La actividad de pro-MMP2 también se calculó por ImageJ como se mencionó (Figura 16D).

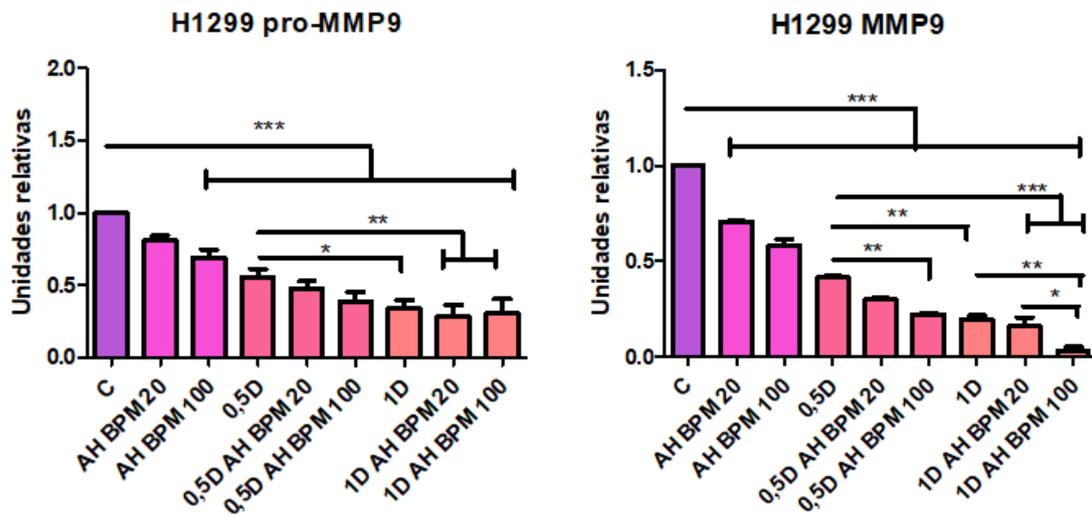
Como se puede observar, la actividad de la pro-MMP9 disminuyó significativamente con respecto al control en el tratamiento con AH BPM 100 y en ambas concentraciones de DOX, tanto sola o en combinación con AH BPM. A su vez, existen diferencias significativas entre ambas concentraciones de DOX y sugiere que la pro-MMP9 disminuye a mayor concentración de DOX, es decir, es dependiente de concentración en esta línea tumoral. Sin embargo, dentro de cada concentración de DOX no se observaron diferencias significativas cuando se combinó con AH BPM (Figura 16B). La forma MMP-9, también disminuyó significativamente respecto al control en todos los tratamientos y además existen diferencias significativas entre y dentro de cada concentración de DOX en combinación con AH BPM (Figura 16B). En el caso de la actividad de pro-MMP2, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control (Figura 16D). Aunque

la forma MMP-2 fue indetectable en todos los tratamientos, sería necesario observar si existe una asociación con la función de estas MMPs en ensayos posteriores.

A.

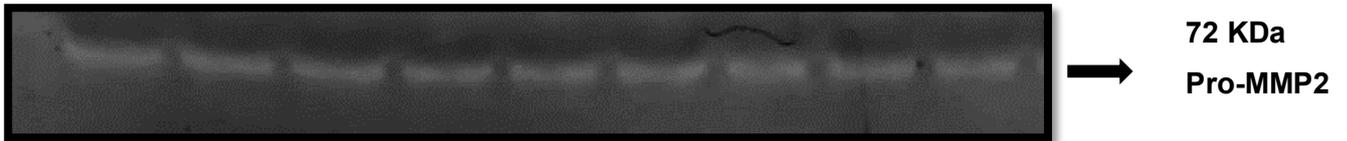


B.

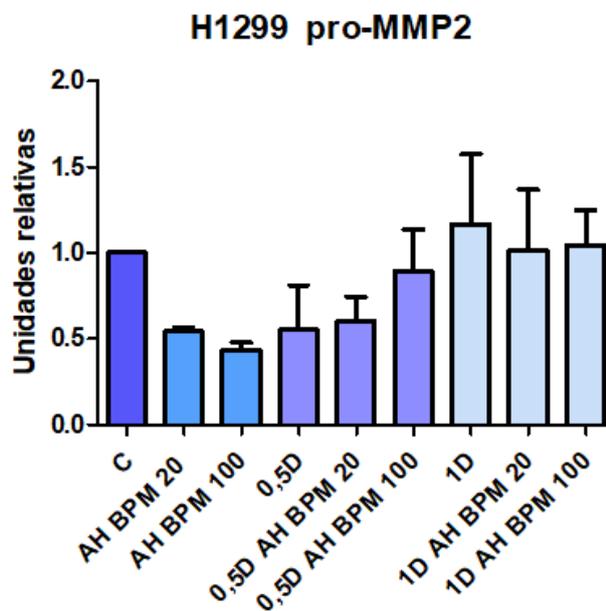


C.

|   |        |        |      |         |         |    |        |         |
|---|--------|--------|------|---------|---------|----|--------|---------|
| C | AH BPM | AH BPM | 0,5D | 0,5D AH | 0,5D AH | 1D | 1D AH  | 1D AH   |
|   | 20     | 100    |      | BPM 20  | BPM 100 |    | BPM 20 | BPM 100 |

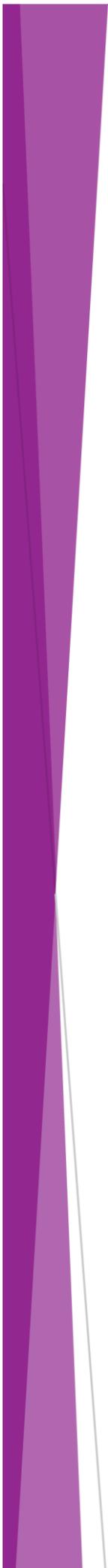


D.



**Figura 16: Actividad de MMPs.**

Análisis de la actividad de MMPs a través de Zimografía en gelatina. (A) Actividad de pro-MMP9 y MMP9 y de (C) pro-MMP2 en la línea celular H1299, como representación de bandas claras en un gel del experimento más representativo. (B, D) Gráfico de la intensidad de cada banda calculada por densitometría utilizando ImageJ y representada como unidad relativa para cada tratamiento relativizados al control. Los valores muestran la media aritméticas  $\pm$  DS de tres experimentos individuales. \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  (n=3).



# Discusión

Inicialmente en este estudio se realizó el análisis de la expresión de CD44, como principal receptor de membrana del AH, a través de la citometría de flujo en las líneas celulares tumorales H1299 y MDA-MB-231. Este ensayo fue realizado para corroborar la expresión de CD44 y capacidad de unión de AH por parte de las células tumorales. Posteriormente analizar la capacidad de respuesta de cada línea celular al eflujo de DOX, al tratar las células con AH BPM exógeno. Es importante mencionar que la simple expresión de CD44 no es indicativo de unión a AH (Knüpfer *et al.* 1999; Ernest *et al.* 2000), podemos indicar que dada la alta expresión de CD44 que se observó en ambas líneas tumorales solo demuestra la potencialidad de unión a esta molécula, sumado a los antecedentes que indican la habilidad de unión de AH de estas células. Por lo cual, estudios adicionales de la unión a AH sería de utilidad para correlacionar los resultados en nuestros modelos experimentales. Cuando se analizó la modulación del eflujo de DOX por el tratamiento con AH BPM exógeno, si bien no vimos cambios en la concentración intracelular total de la droga, se observaron cambios en el porcentaje de las distintas subpoblaciones definidas según la intensidad de DOX incorporada para el caso de la línea celular H1299. Este resultado sugeriría que funcionalmente el tratamiento de AH BPM puede inducir adquisición de resistencia a esta droga. En otros estudios, se ha demostrado que, en líneas celulares derivadas de tumores hematopoyéticos, el AH exógeno aumenta la resistencia a DOX y disminuye la apoptosis inducida por la droga (Uchakina *et al.* 2016). En la línea celular MDA-MB-231, además de no observarse una modulación en el eflujo de DOX, tampoco se detectó la presencia de subpoblaciones dentro de la población celular total. Este resultado fue confirmado en un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio (Vitale *et al.* 2018). Por lo que podría pensarse que la modulación de la resistencia a drogas por parte del AH depende del contexto del tumor, la línea tumoral y del tratamiento utilizado. Por lo tanto, será necesario realizar un estudio más amplio para poder determinar el mecanismo por el cual se produce la resistencia a drogas en cada línea tumoral ante la presencia de AH. Como se mencionó más arriba, en el ensayo se detectó una población heterogénea en la línea celular de pulmón H1299 y estas subpoblaciones variaron en el porcentaje de células DOX positivas según el tratamiento utilizado (Figura 9 B, D, E). La detección de subpoblaciones de distinta intensidad de fluorescencia de la DOX incorporada indica que en esta línea celular existen células que difieren en sus características y que por tal motivo

responden diferente al tratamiento, aunque la población total no se vea afectada. Esto está en concordancia con el concepto de que las células que constituyen la población tumoral es heterogénea y van cambiando en base a su microambiente, a las condiciones del tratamiento antitumoral y de esta manera cambian su respuesta llevando a la adquisición de mecanismos de resistencia (Laconi *et al.* 2008). Estas subpoblaciones celulares diferenciales son las que mantendrían el fenotipo multirresistente del tumor y estudiar tanto su fenotipo como su funcionalidad a diferentes tratamientos es de suma importancia. Otra de las variables biológicas que no se tuvieron en cuenta en el estudio, fue la concentración de AH endógeno que puede expresar la línea celular en estudio, tanto anclado a la membrana como soluble (Piccioni *et al.* 2012). Esto podría estar interfiriendo en los resultados y no nos asegura que el efecto que observamos se deba al propio tratamiento con AH exógeno o que el efecto sea el resultado de una actividad sinérgica de ambos, endógeno y exógeno. Es posible que el resultado que observamos se deba también al AH endógeno sintetizado por la línea celular en estudio, cuya expresión ha sido evaluada por otros autores (Hamilton *et al.* 2007; Song *et al.* 2017). Para comprobar tal efecto, es necesario bloquear el AH endógeno y/o su síntesis con un inhibidor. En este trabajo se probó este efecto, utilizando un inhibidor de la síntesis específico para AH, como el 4-metilumbilferona (4-Mu), el cual inhibe específicamente la síntesis de AH y no de otros proteoglicanos (Nagy *et al.* 2015) previo al tratamiento utilizado con DOX y AH BPM exógeno, y posterior análisis de modulación del eflujo de DOX a través de la citometría de flujo. Los resultados preliminares mostraron que en ambas concentraciones de DOX no hubo una modulación del eflujo de la droga entre los tratamientos en células previamente expuestas al inhibidor 4-Mu, aunque se observó un aumento en la acumulación de DOX en el tratamiento con 1D 4-Mu AH BPM 100 (Figura 10). Sin embargo, este resultado es un primer análisis y es necesario realizar ensayos adicionales con el tratamiento del inhibidor para observar si hay un cambio significativo en la modulación del eflujo de la droga, además de analizar la sobrevivencia de estas células con su respectiva estadística. Estudios previos, han demostrado que cuando se trataron células tumorales con 4-Mu, estas fueron sensibilizadas a los efectos de drogas quimioterapéuticas como doxorubicina y gemcitabina aumentando la apoptosis de las mismas debido a la reducción de la expresión de AH endógeno (Uchakina *et al.* 2016; Nakazawa *et al.* 2006).

Luego se evaluó la activación de CD44 por parte del AH BPM exógeno durante el tratamiento con DOX, en donde se observó una modulación de la expresión a nivel de ARNm de CD44 por PCR en tiempo real. Según los resultados, al tratar las células H1299 y MDA-MB-231 se pudo detectar un incremento en la expresión de CD44 en ambas líneas celulares, cuando se trató con AH BPM exógeno solo (AH BPM 20 y AH BPM 100). En combinación con DOX, solo se observó un incremento, aunque no significativo con el tratamiento de 1D AH BPM 100, en H1299, de acuerdo con el análisis estadístico realizado, (Figura 11). Es necesario tener en cuenta que otros componentes extracelulares pueden inducir la expresión de CD44 (Ponta *et al.* 2003), sin embargo, este resultado nos da un indicio de que el incremento de la expresión de este receptor está en parte relacionado con la unión del AH exógeno a CD44 u otro receptor en la membrana de las células tumorales. En otros estudios, se determinó que la capacidad de unión del AH varía según la línea celular utilizada en el estudio y esto se relaciona con que muchas expresan en su superficie la glucoproteína CD44 de manera constitutiva y poseen una alta expresión. En algunas, CD44 no necesita la unión a su ligando para su expresión, en cambio otras son estimuladas ya que la molécula de CD44 se une a su ligando AH y de esta manera aumenta su expresión (Ernest *et al.* 2000). Por lo cual sería necesario evaluar la expresión a nivel de ARNm de CD44 y su expresión en la membrana celular en condiciones de bloqueo de unión del AH. La droga utilizada en este trabajo actúa como un intercalante de ADN (Fornari, F.A. *et al.* 1994) y la cual induce apoptosis en células tumorales tratadas e impide la proliferación de estas. Para evaluar la capacidad de generar células resistentes a la droga, se analizó posteriormente el efecto de AH exógeno en la supervivencia de estas células con el tratamiento de DOX, midiendo el nivel de apoptosis a través de la citometría de flujo con Anexina-V (Figura 12). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en ambas líneas celulares. Además, el porcentaje de células apoptóticas fue más bajo en las células H1299 tanto en el tratamiento solo con DOX y en combinación con AH BPM, por lo que esto nos da a entender que las propias células adquirieron por algún mecanismo, la resistencia a la apoptosis inducida por DOX durante su establecimiento. Además, esto puede estar relacionado a que ambas líneas celulares poseen una alta expresión de CD44 en su membrana celular, lo cual le podría conferir un fenotipo de resistencia a la apoptosis inducida por DOX. En trabajos previos, se ha demostrado que en líneas celulares el tratamiento quimioterapéutico aumentó la producción de AH y por lo tanto la

quimioresistencia (Lompartia *et al.* 2013). Además, el tratamiento con DOX indujo la resistencia a drogas que puede ser dependiente de la concentración utilizada, en el cual se encuentra relacionado también el aumento de la expresión de CD44 (Fang. *et al.* 2014).

Como se mencionó al principio de la discusión, es importante estudiar tanto el fenotipo como la funcionalidad de las poblaciones celulares que componen el tumor, ya que las mismas cumplen un rol en el mantenimiento de la supervivencia y resistencia a diferentes terapias. Debido a que los marcadores necesarios para la caracterización de células resistentes a drogas tipo células madre tumorales no estaban disponibles para la línea celular MDA-MB-231, en este trabajo solo se analizó la expresión de uno de los marcadores de superficie de tipo células madre tumoral como CD90, para células H1299 tratadas con DOX y AH BPM exógeno. Para poder comparar los resultados, el análisis de la expresión de estos marcadores en las células MDA-MB-231 están siendo analizados en nuestro laboratorio. Según los resultados, no se observó una modulación significativa de la expresión de CD90 en la superficie celular de la población total mediante el tratamiento con AH exógeno (Figura 13B), aunque se observaron diferentes poblaciones con respecto a la captación de DOX y que expresan CD90. El porcentaje de estas poblaciones depende del tratamiento y la dosis de la droga utilizada. Antes del tratamiento con DOX, las células se componen en su totalidad de aquellas que expresan CD90 y son DOX-, sin embargo, luego del tratamiento con DOX, tanto solo o en combinación con AH BPM, las células se componen de las que poseen DOX en su interior (CD90+ DOX+) y las que no incorporan DOX (CD90+ DOX-). Esta última población detectada sugiere estar en presencia de células resistentes a la droga, y siendo dependiente de la dosis utilizada. (Figura 13C). Según estudios previos, la expresión de CD90 en líneas celulares de cáncer de pulmón podría ser un marcador potencial de la capacidad tumorigénica (Yan *et al.* 2013). Sin embargo, sería necesario analizar otros marcadores en conjunto en cada línea celular en estudio, (Greve *et al.* 2012; Zöller 2011) para obtener un análisis más específico y detallado de estas poblaciones celulares, para identificarlas como células tipo células madres tumorales.

En las células tumorales resistentes a múltiples drogas (MDR), una de las causas principales es la expresión de proteínas en la membrana celular que expulsan droga. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de los transportadores ABC, dependientes de la energía del ATP, las cuales son responsables de la expulsión desde el interior celular hacia el exterior de los fármacos, drogas o compuestos (Glavinas *et al.* 2004). Algunas de estas

bombas de expulsión pueden bloquearse con el uso de Ciclosporina A o Verapamilo, que se han utilizado tanto in vitro como in vivo, para revertir los efectos y retener drogas en el interior celular y de esta manera mejorar la sensibilidad a estas (Pennok *et al.* 1991; Twentyman *et al.* 1987). Para observar la funcionalidad de las bombas en los ensayos fue utilizada la Ciclosporina A para la línea celular H1299; ya que en la misma a pesar de no observarse una modulación del eflujo de DOX en la población total, se observó una modulación por parte de AH BPM en las distintas subpoblaciones que componen el tumor y un aumento de la expresión del gen CD44 al combinar el tratamiento de DOX con AH (1D AH BPM 100). De esta manera, los resultados mostraron que el efecto de la inhibición de las bombas depende de la concentración de DOX y del bloqueante utilizados, en la que se observó un aumento de DOX intracelular cuando las células se trataron con CsA, (Figura 14) indicando que la modulación de eflujo observada es en parte por la funcionalidad de dichas bombas. Un estudio de la expresión de los genes que codifican las bombas de expulsión de la droga durante el tratamiento debería llevarse a cabo en esta línea celular para determinar cuáles son los tipos de bombas involucradas y si se está afectando el nivel de expresión de las mismas. Estudios en líneas celulares de cáncer de pulmón se observó que las células sobreexpresaron genes de diferentes proteínas MDR involucradas en la resistencia a drogas, como Mdr (P-gp), Mrp y Lrp y aunque hay estudios contradictorios, la expresión de éstas puede depender de la línea celular en estudio, las condiciones y el tratamiento tanto in vitro como in vivo (Lario *et al.* 2006; Cole *et al.* 1992). En el ensayo de este trabajo, se pudo observar que con una concentración alta de CsA (1000  $\mu$ M), el efecto de la misma se revirtió, disminuyendo nuevamente la concentración de DOX intracelular e indicativo de actividad de las bombas en las células tumorales. Este efecto, podría deberse a que las células adoptaron un mecanismo nuevo de resistencia para expulsar la droga o que tal concentración active la apoptosis celular, y que la disminución se deba a una disminución neta del número de células por muerte inducida por la CsA. Para confirmar tal efecto, sería necesario un estudio para observar si la sobrevivencia de las células se ve afectada. En otros estudios, como en líneas celulares de leucemia, la sobreexpresión de P-gp en células resistentes a drogas, también está involucrada en la inhibición del mecanismo de apoptosis inducida por la droga y el bloqueo de estas bombas mejoró la sensibilidad de las células al tratamiento con doxorubicina (Smyth J. *et al.* 1998). El porcentaje de apoptosis que se observó en células tratadas con DOX y AH BPM (Figura 12) puede

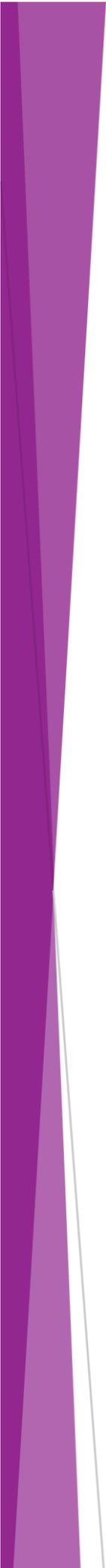
deberse a la expresión intrínseca de bombas de expulsión involucradas en el mecanismo de resistencia y estar relacionado con la alta expresión de CD44. La quimioresistencia de varios tumores sólidos está relacionada con un fenotipo más agresivo, en el cual, las mismas células pueden aumentar el proceso de angiogénesis tumoral y en última instancia diseminarse a otros tejidos. Para observar el rol modulador del AH BPM exógeno en la expresión de VEGF, molécula clave en este proceso, se analizó la concentración de VEGF a través de ELISA en ambas líneas tumorales durante el tratamiento con DOX y AH BPM (Figura 15). Los resultados mostraron que no hubo un cambio significativo en la expresión de VEGF al tratar las células con AH BPM, por lo que esto sugiere que el AH BPM no modularía la angiogénesis a través de VEGF en estas líneas celulares con el tratamiento utilizado. Otros estudios, demostraron que el AH indujo angiogénesis a través de modulación en el comportamiento de las células endoteliales (CE) independiente de VEGF (Park, D. *et al.* 2012). Sería necesario el análisis de otras moléculas pro-angiogénicas que también están involucradas en la activación de la angiogénesis, como el FGF-2, además, del análisis de la evaluación del comportamiento de CE. De hecho, en nuestro estudio previo se observó que en la línea celular MDA-MB-231, el AH BPM en combinación con DOX aumentó la expresión de FGF-2 y tuvo un efecto *in vitro* pro-angiogénico inductor de la migración en las CE detectadas (Vitale *et al.* 2018).

Por último, se analizó la presencia y actividad de las MMPs en el sobrenadante de células H1299 previamente tratadas, dado que estas enzimas son claves en la degradación matriz extracelular y activación de factores angiogénicos. En nuestros ensayos *in vitro* se detectó tanto la forma completa (pro-MMP9) de 92 KDa como la forma activa (MMP9) de 86 KDa, pero sólo fue detectada la forma completa de MMP2 de 72 KDa (pro-MMP2) (Figura 16). Se pudo observar que el nivel de MMP9 depende de la concentración de DOX y AH BPM en el tratamiento. Esto indicaría que el tratamiento altera la actividad de las MMPs circulantes en la cual se observó una disminución en los niveles de pro-MMP9 y MMP9 a mayor concentración de DOX y en combinación con AH BPM. En cambio, el tratamiento no parece alterar significativamente el nivel de pro-MMP2. Mas aún, la detección o no de la forma activa de la enzima puede estar relacionada con los efectos de las condiciones y el tiempo del tratamiento. Para explicar dichos resultados, se debería realizar un análisis de la función de estas MMPs en la angiogénesis, invasión y migración celular durante el tratamiento. En otros estudios, se demostró que el tratamiento con DOX alteró la

concentración de las pro-MMPs circulantes dependiente tanto del tiempo como de la dosis utilizada en un modelo in vivo durante la remodelación cardíaca (Ivanová *et al.* 2012). Además, un estudio mostró que la activación de la pro-MMP2 puede ocurrir sin procesamiento proteolítico debido al tratamiento, por lo que no se detectaría su forma activa, mientras que la expresión de la forma activa de MMP-9 puede deberse a un estado continuo de activación (Nogueira S. *et al.* 2016). Serían necesario más estudios para confirmar los resultados obtenidos analizando tanto la expresión a nivel de ARNm de estas MMPs y la expresión específica de sus inhibidores endógenos tisulares (TIMP) que afectan sus funciones (Nagase and Woessner 1999).

#### Futuras perspectivas:

En conjunto los resultados nos permiten estudiar los posibles mecanismos involucrados en las células tumorales con respecto a la modulación del tratamiento con DOX que depende de moléculas de la matriz extracelular, como el AH. Un futuro enfoque de este estudio nos permitirá continuar el análisis de los posibles mecanismos de quimioresistencia y el rol que posee el AH durante el tratamiento. Para obtener un estudio completo, en continuidad a este, además de realizar los ensayos faltantes correspondientes como el análisis de la expresión de marcadores tipo células madre para ambas líneas celulares de este trabajo, sería necesario continuar con el análisis de la modulación del eflujo de DOX en presencia del inhibidor de la síntesis de AH endógeno y/o enzimas para la degradación del AH intrínseco, así como realizar el análisis de funcionalidad de factores pro-angiogénicos y comportamiento de células endoteliales. Como se mencionó anteriormente, la molécula de CD44, es uno de los receptores principales del AH, que está involucrado en varios mecanismos de progresión tumoral, incluyendo la resistencia a múltiples drogas (MDR), punto importante de este estudio. La modulación de la interacción de AH-CD44 y la evaluación de la capacidad de estas células de generar factores angiogénicos y células resistentes a drogas en condiciones de tratamiento, en combinación con estudios, como la expresión de AH y la capacidad de unión del mismo de cada tipo tumoral, la expresión de genes de las bombas involucradas en la expulsión, así como por ejemplo, la expresión de proteínas específicas de las vías de señalización involucradas en este proceso, podría ayudar a comprender el mecanismo por el cual se produce esta resistencia.



# Conclusión

La generación de células resistentes y productoras de factores pro-angiogénicos que aumentan la progresión tumoral podría deberse a la alta expresión de CD44, dado que es el principal receptor de AH, en las líneas celulares estudiadas.

- ✓ Se observaron poblaciones diferenciales con respecto a la captación de DOX y modulación del AH BPM exógeno en la acumulación de la droga en cada población. La capacidad de incorporación y resistencia a la droga es en función de la línea celular tratada y podría estar vinculado a una característica intrínseca que se asociaría con la alta expresión de CD44.
- ✓ Se incrementó la expresión de ARNm del CD44 con el tratamiento de AH BPM.
- ✓ El AH BPM moduló la generación de células resistentes a DOX que expresan el marcador tipo células madre, CD90.
- ✓ Se moduló la producción de MMPs con el tratamiento utilizado, dependiente de la concentración de DOX y AH BPM.

Por lo tanto, la interacción AH-CD44 cumpliría un rol clave en el mantenimiento y desarrollo tumoral favoreciendo la aparición de resistencia al tratamiento de drogas terapéuticas como la doxorubicina, así como la angiogénesis, proliferación, migración celular; que dependen tanto del contexto del tumor, la línea tumoral en estudio y el tratamiento utilizado. Sin embargo, aún deben realizarse más estudio para la compleja comprensión de los mecanismos involucrados en la resistencia al tratamiento en estas líneas celulares de estudio y desarrollar futuras terapias antineoplásicas más específicas y eficientes.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

- Alaniz, L., García, M. G., Gallo-Rodriguez, C., Agusti, R., Sterín-Speziale, N., Hajos, S. E., and Alvarez, E. 2006. Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NFkappaB transcription factor. *Glycobiology*, Vol.16, pp. 359–67.
- Alaniz L., Garcia M., Rizzo M., Piccioni F., and Mazzolini G. 2009. Altered Hyaluronan Biosynthesis and Cancer Progression: An Immunological Perspective. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol. 9, pp. 1538-1546.
- Arcamone F., 1981. Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. *Medicinal Chemistry*. Vol. 17, pp. 1-386.
- Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C. B. and Seed B. 1990. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell*, Vol. 61, pp.1303-1313.
- Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper Steven, Su J., Tammi R., Jones M., and Jackson D. G. 1999. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 144, pp. 789–801.
- Berdiaki A, Nikitovic D, Tsatsakis A, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN. 2009. bFGF induces changes in hyaluronan synthase and hyaluronidase isoform expression and modulates the migration capacity of fibrosarcoma cells. *Biochimica et biophysica acta*. Vol. 1790, pp.1258-65.
- Bissell MJ, Hines WC. 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine*. Vol.17, pp. 320-9.
- Bono Petri., Rubin K., Higgins J. M. G. and Richard Hynes O. 2001. Layilin, a Novel Integral Membrane Protein, Is a Hyaluronan Receptor. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 12, pp. 891–900.
- Bollyky P. L., Falk B. A., Wu R. P., Buckner J. H., Wight T. N., and Nepom G. T. 2009. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 86, pp. 567- 572.
- Bourguignon L. Y. W., Peyrollier K., Xia W. and Gilad E. 2008. Hyaluronan-CD44 Interaction Activates Stem Cell Marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 Gene Expression, and Ankyrin regulated Multidrug Efflux in Breast and Ovarian Tumor Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, pp. 17635–17651.

Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Chen L. 2012. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR- 302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*. Vol. 287, pp. 32800–24.

Bu Y. and Cao D. 2012. The origin of cancer stem cells. *Frontiers in Bioscience*; Vol.4, pp. 819-830.

Chang A. 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, Vol. 71, pp. 3–10.

Chanmee T., Ontong P., Kimata K. and Itano N. 2015. Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Frontiers in Oncology*, Vol. 5; pp. 1-11.

Chung A. S. and Ferrara N. 2011. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 27, pp. 563–84.

Cole S. P. C., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M. V., Deeley R. G. 1992. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science*. Vol. 258. pp. 1650-1654.

Culty M., Nguyen H. A., and Underhill C. B. 1992. The Hyaluronan Receptor (CD44) Participates in the Uptake and Degradation of Hyaluronan. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 116, pp. 1055-1062.

Dean M., Fojo T. and Bates S. 2005. Tumour Stem Cells and Drug resistance. *Nature*; Vol.5, pp. 275-284.

Das S., Mandal M., Chakraborti T., Mandal A. and Chakraborti S. 2003. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: A brief overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 253, pp. 31–40.

Ernst G. M., Lopes E. C., Cabrera P. V., Alvarez E., Hajos S. E. 2000. Differential binding of hyaluronic acid in two CD44+ sublines. Relationship with tumor infiltration. *Medicina (Buenos Aires)*; Vol. 60, pp. 931-939.

Fang X. J., Jiang H., Zhu Y. Q., Zhang L. Y., Fan Q. H. and Tian Y. 2014. Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF-κB in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncology Reports*, Vol. 31, pp. 2735-2742..

Fedorchenko O., Stiefelhagen M., Peer Zada A. A., Barthel R., Mayer P., Ecke L., Breuer A., Crispatsu G., Rosen N., Landwehr T., Lilienthal N., Möllmann M., Montesinos-Rongen M., Heukamp L., Dürig J., Hallek M., Fingerle-Rowson G., and Herling M. 2013. CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia. *Blood journal*. Vol.121, pp.4126-36.

Ferrara N., Gerber H.P. and LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, Vol. 9, pp. 669-676.

Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol*. Vol.45, pp. 649-56.

Fraser J. R. E., Laurent T. C. and Laurent U. B. G. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*; Vol. 242, pp. 27–33.

Gabizon A., Shmeeda H., and Barenholz Y. 2003. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 42, pp. 419–436.

Ghatak S., Misra S., and Toole B. P. 2005. Hyaluronan Constitutively Regulates ErbB2 Phosphorylation and Signaling Complex Formation in Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, pp. 8875–8883.

Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J. and Sarkadi B. 2004. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery*, Vol. 1, pp. 27-42.

Gottesman M. M., Fojo T. and Bates S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews*. Vol. 2, pp. 48-58.

Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. 2012. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A*. Vol. 81, pp. 284-93.

Hamilton Sara R., Fard S. F., Paiwand F. F., Tolg C., Veiseh M., Wang C., McCarthy J. B., Bissell M. J., Koropatnick J., and Turley E. A. 2007. The Hyaluronan Receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1,2 That Sustain High Basal Motility in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, pp. 16667–16680.

Huang L., Yoneda M., and Kimatag K. 1993. A Serum-derived Hyaluronan-associated Protein (SHAP) Is the Heavy Chain of the Inter  $\alpha$ -Trypsin Inhibitor. *The Journal of Biological chemistry*. Vol. 268, pp. 26725-26730.

Horn L. and Sandler A. B. 2009. Angiogenesis in the Treatment of Non–Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, Vol 6. pp 206–217.

Huang L., Hu C., Di Benedetto M., Varin R., Liu J., Jin J., Wang L., Vannier J.P., Janin A., Lu H. and Li H. 2015. Cross-drug resistance to sunitinib induced by doxorubicin in endothelial cells. *Oncology Letters*, Vol. 9, pp.1287-1292.

Isacke C. M. and Yarwood H. 2002. The hyaluronan receptor, CD44. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 34, pp. 718–721.

Itano N. and Kimata K. 2009. Altered Hyaluronan Biosynthesis in Cancer Progression. *Hyaluronan in Cancer Biology*, First Edition; Chapter 10, pp.171-182.

Ivanová M., Dovinová I., Okruhlicová L., Tribulová N., Šimončíková P., Barteková M., Vlkovicová J., Barancík M. 2012. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* Vol. 33, pp 459–469.

Knüpfer M.M., Poppenborg H., Hotfilder M., Kühnel K., Wolff J.E.A. and Domula M. 1999. CD44 expression and hyaluronic acid binding of malignant glioma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. Vol. 17, pp. 71–76.

Koyama H, Hibi T, Isogai Z, Yoneda M, Fujimori M, Amano J, et al. 2007. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PGM. *The American journal of pathology*, Vol. 170, pp.1086-99.

Laconi E., Doratiotto S., Vineis P. 2008. The microenvironments of multistage carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, Vol.18, pp. 322–329.

Lario A. P., García C. B., Elizondo M. E., and Lobo C. 2006. Expression of Proteins Associated with Multidrug Resistance to Chemotherapy in Lung Cancer. *Arch Bronconeumol*, Vol.43, pp. 479-84.

Lakshman M., Subramaniam V., Rubenthiran U., and Jothy S. 2004. CD44 promotes resistance to apoptosis in human colon cancer cells. *Experimental and Molecular Pathology*, Vol. 77; pp. 18– 25.

Laurent T. C.; Fraser J. R. E. 1992. Hyaluronan. *FASEB Journal*. Vol. 6, pp. 2397-2404.

Laurent T. C., Laurent U. B.G., Fraser J R. E. 1995. Functions of hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Vol. 54, pp. 429-432.

Lompardía S. L., Papademetrio D. L., Mascaró M., Álvarez E.MC. and Hajos S.E. 2013. Human leukemic cell lines synthesize hyaluronan to avoid senescence and resist chemotherapy. *Glycobiology*, Vol. 23, pp. 1463–1476.

- Lu P, Weaver VM, Werb Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*. Vol.196, pp. 395-406.
- Malemud C. J. 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 11, pp. 1696-1701.
- Marangoni E, Lecomte N, Durand L, de Pinieux G, Decaudin D, Chomienne C, et al. 2009. CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *Br J Cancer*, Vol. 100, pp. 918–22.
- Marhaba R. and Zoller M. 2003. CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology*; Vol. 35, pp. 211–231.
- McKee C. M., Penno M. B., Cowman M., Burdick M. D., Strieter R. M., Bao C. and Noble P. W. 1996. Hyaluronan (HA) Fragments Induce Chemokine Gene Expression in Alveolar Macrophages. The Role of HA Size and CD44. *Journal Clinical Investigation*. Vol. 98, pp. 2403–2413.
- Mechetner E., Kyshtoobayeva A., Zonis S., Kim H., Stroup R., Garcia R., Parker R. J., and Fruehauf J. P. 1998. Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with in Vitro Resistance to Taxol and Doxorubicin. *Clinical Cancer Research*. Vol. 4, pp. 389-398.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., and Gianni L. 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, Vol. 56, pp. 185-229.
- Mueller BM, Schraufstatter IU, Goncharova V, Povaliy T, DiScipio R, Khaldoyanidi SK. 2010. Hyaluronan Inhibits Postchemotherapy Tumor Regrowth in a Colon Carcinoma Xenograft Model. *Molecular Cancer Therapeutics*. Vol. 9, pp. 3024-32.
- Nagase H. and Woessner J. F. 1999. Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, pp. 21491–21494.
- Nagy N., Kuipers H. F., Frymoyer A. R., Ishak H. D., Bollyky J. B., Wight T. N. and Bollyky P. L. 2015. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Frontiers in Immunology*. Vol. 6, pp. 1-11.
- Nakazawa H., Yoshihara S., Kudo D., Morohashi H., Kakizaki I., Kon A., Takagaki K. and Sasaki M. 2005. 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the

anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, Vol. 57, pp. 165–170.

Naor D, Sionov RV and Ish-Shalom D: 1997. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, Vol. 71, pp. 241-319.

Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, Vol. 53, pp. 397–411.

Nedvetzki S., Gonen E., Assayag N., Reich R., Williams R. O., Thurmond R. L., Huang J.F., Neudecker B. A., Wang F.S., Turley E. A., and Naor D. 2004. RHAMM, a receptor for hyaluronan mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *PNAS*, Vol. 101, pp. 18081–18086.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., and Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, Vol. 13; pp.9-22.

Nyberg P., Salo T., Kalluri R. 2008. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 13, pp. 6537-6553.

Nogueira S.S.S., Sousa M. G., Gava F. N., Rosa F. A., Melo G. D., Dittrich G., Machado G.F. and Camacho A.A. 2016. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in rabbits with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pesq. Vet. Bras*. Vol. 38, pp. 320-327.

Ohashi R., Takahashi F., Cui R., Yoshioka M., Gu T., Sasaki S., Tominaga S., Nishio K., Tanabe K. K., Takahashi K. 2007. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Letters*, Vol. 252; pp. 225–234.

Park D., Kim Y., Kim H., Kim k., Lee Y-S., Choe J., Hahn J-H., Lee H., Jeon J., Choi C., Kim Y-M., and Jeoung D. 2012. Hyaluronic Acid Promotes Angiogenesis by Inducing RHAMM TGF $\beta$  Receptor Interaction via CD44-PKC $\delta$ . *Mol. Cells*. Vol. 33, pp. 563-574.

Pennock GD, Dalton WS, Roeske WR, Appleton CP, Mosley K, Plezia P, Miller TP, Salmon SE. 1991. Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *J Natl Cancer Inst*. Vol. 83,pp. 105-10.

Piccioni F., Malvicini M., Garcia M. G., Rodriguez A., Atorrasagasti C., Kippes N., Piedra Buena I. T., Rizzo M. M., Bayo J., Aquino J., Viola M., Passi A., Alaniz L., and Mazzolin G. 2012. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. *Glycobiology*, Vol. 22, pp. 400–410.

Piccioni F, Fiore E, Bayo J, Atorrasagasti C, Peixoto E, Rizzo M, Malvicini M, Tirado-González I, García MG, Alaniz L, Mazzolini G. 2015. 4-methylumbelliferone inhibits

hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis. *Glycobiology*. Vol. 25, pp. 825-35.

Prabavathy D., Swarnalatha Y., Ramadoss N. 2018. Lung cancer stem cells—origin, characteristics and therapy. *Stem Cell Investigation*; Vol. 5, pp. 1-9.

Ricciardelli C., Ween M. P., Lokman N. A., Tan I. A., Pyragius C. E. and Oehler M. K. 2013. Chemotherapy-induced hyaluronan production: a novel chemoresistance mechanism in ovarian cancer. *BMC Cancer*, Vol.13, pp. 1-12.

Russo C, R. I., García, M. G., Alaniz, L., Blanco, G., Alvarez, E., & Hajos, S. E. 2008. Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Vol. 122, pp.1012–8.

Saranraj P. and Naidu M.A. 2013. Hyaluronic Acid Production and its Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, Vol. 4, pp. 853 – 859.

Sato Y., Goto Y., Narita N. and Hoon D. S.B. 2009. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, Vol. 2, pp.205–214.

Senbanjo L. T. and Chellaiah M. A. 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Vol. 5, pp. 1-6.

Shi Y, Liu C, Liu X, Tang DG, Wang J. 2014. The microRNA miR-34a Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Growth and the CD44<sup>hi</sup> Stem-Like NSCLC Cells. *PLoS ONE*. Vol.9, pp. 1-8.

Slevin M, West D, Kumar P, Rooney P, Kumar S. 2004. Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease. *International journal of cancer Journal international du cancer*. Vol. 109, pp. 793-4.

Smyth M. J., Krasovskis E., Sutton V. R., and Johnstone R. W. 1998. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Medical Sciences*. Vol. 95, pp. 7024–7029.

Song J. M., Molla K., Anandharaj A., Cornax I., O`Sullivan M. G., Kirtane A. R., Panyam J., Kassie F. 2017. Triptolide suppresses the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling. *Oncotarget*. Vol. 8, pp: 26927-26940.

Spinelli FM, Vitale DL, Demarchi G, Cristina C, Alaniz L. 2015. The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clinical & Translational Immunology*. Vol. 4, pp. 1-9.

Takebe N., Miele L., Harris P. J., Jeong W., Bando H., Kahn M., Yang S. X., and Ivy S. P. 2015. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. Vol. 12, pp. 445–464.

Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. 2008. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in cancer biology*. Vol.18, pp. 288- 95.

Thapa R. and Wilson G. D. 2016. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells International*, Vol. 6, pp.1-15.

Thorn C. F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T. E., and Altman R. B. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*. Vol 21, pp. 440–446.

Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Abulaeva J. 2013. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature*. Vol. 499, pp.346-9.

Toole B. P., Wight T. N., & Tammi M. I. 2002. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 277, pp. 4593–6.

Twentyman P.R., Fox N.E. and White D.J.G. 1987. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *Br. J. Cancer*. Vol. 56, pp. 55-57.

Uchakina O. N., Ban H., Hostetler B. J., and McKallip R. J. 2016. Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin. *Glycobiology*, Vol. 26, pp. 1171–1179.

Udabage L., Brownlee G. R., Nilsson S. K., Brown T. J. 2005. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Experimental Cell Research*, Vol. 310, pp. 205–217.

Vitale D. L., Spinelli F. M., Del Dago D., Icardi A., Demarchi G., Caon I., García M., Bolontrade M. F., Passi A., Cristina C. and Alaniz L. 2018. Co-treatment of tumor cells with hyaluronan plus doxorubicin affects endothelial cell behavior independently of VEGF expression. *Oncotarget*, Vol. 9, pp. 36585-36602.

- Ward P. D., Thibeault S. L., and Gray S. D. 2002. Hyaluronic Acid: Its Role in Voice. *Journal of Voice*, Vol. 16, pp. 303–309.
- Weigel P. H., Fuller G. M. and Leboeuf R. D. 1986. A Model for the Role of Hyaluronic Acid and Fibrin in the Early Events during the Inflammatory Response and Wound Healing. *J. theor. Biol*, Vol.119, pp. 219-234.
- Yan X., Luo H., Zhou X., Zhu B., Wang Y. and Bian X. 2013. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncology Reports*, Vol. 30, pp. 2733-2740.
- Zeng, C., Toole, B. P., Kinney, S. D., Kuo, J. W., & Stamenkovic, I. 1998. Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Vol. 77, 396–401.
- Zheng H., Takahashi H., Murail Y., Cui Z., Nomoto K., Niwa H., Tsuneyama K. and Takano Y. 2006. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are Closely Linked to Growth, Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Gastric Carcinoma. *Anticancer Research*. Vol. 26, pp. 3579-3584.
- Zhou B., Weigel J. A., Fauss L., and Weigel P. H. 2000. Identification of the Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE). *The Journal of biological chemistry*, Vol. 275 , pp. 37733–37741.
- Zöller M. 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. Vol. 11, pp. 254-67.