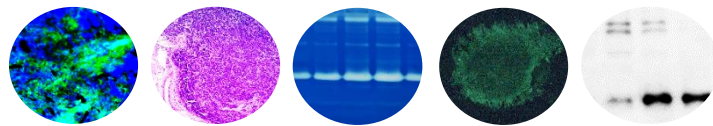


IMPLICANCIAS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y SUS DERIVADOS QUÍMICOS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL Y EN LA MODULACIÓN ANGIOGÉNICA.



Tesis presentada por Fiorella M. Spinelli
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas
por la Universidad Austral.

Directora de tesis: Dra. Laura D. Alaniz

Codirectora de tesis: Dra. Mariana G. García

Año: 2020

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Austral, por haberme brindado la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución durante estos años.

A la Dra. Laura Alaniz, directora de esta tesis, por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por haber confiado en mí, brindarme su apoyo y dedicación, orientarme en los momentos de crisis y por haberme dado muchísimas oportunidades durante todos estos años. Sin ella no hubiera podido desarrollar esta tesis.

A la Dra. Mariana García, codirectora de esta tesis, por su colaboración y ayuda que fueron claves para el desarrollo esta tesis.

A mi primera compañera del laboratorio Dai Vitale, porque desde el inicio de mi doctorado he tenido la suerte de trabajar a su lado compartiendo no solo protocolos si no también viajes, comidas, risas y entablar así una gran amistad.

A mis otros amigos del laboratorio, Antito, Mica, Ina, Ale y Ro, con quienes he tenido la suerte de compartir el día a día. Sin ellos hubiese sido todo muy aburrido.

A mis compañeros de otros laboratorios del CIBA, por estar siempre dispuestos a ayudar y por todos los momentos y asados compartidos.

A Lea Fariña por acompañarme con amor y una infinita paciencia en esta etapa de mi vida.

A mis papás, Gloria Coppola y Raúl Spinelli por haberme dado las herramientas para enfrentar los obstáculos con alegría, perseverancia, esfuerzo y resiliencia. También le agradezco al resto de mi familia, en especial a mi tía Sonia Coppola que siempre que la necesité estuvo ahí con un café y brindándome contención.

RESUMEN

El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En la República Argentina la incidencia del cáncer es media-alta, siendo el cáncer de colon, pulmón y mama los tres tipos más frecuentes dentro de la población. Con lo cual, el estudio de factores biológicos que favorezcan o reduzcan la progresión de la enfermedad es de suma importancia en el desarrollo de terapias antitumorales eficaces. El microambiente del tumor, formado por componentes celulares y acelulares, es clave para que las células tumorales logren el establecimiento y la progresión del tumor. Dentro de los componentes celulares del microambiente, además de las células tumorales, se encuentran entre otros, las células monocíticas y/o los macrófagos. Algunos de estos adquieren un fenotipo que les permite estar involucrados en procesos asociados al crecimiento y progresión tumoral, dentro de los cuales se incluyen la regulación inmune, la angiogénesis y la invasión. No obstante, estas acciones pueden variar dependiendo del tipo tumoral. Otro componente del microambiente tumoral es el ácido hialurónico (AH), un componente acelular que consiste en un glicosaminoglicano importante de la matriz extracelular. Sin embargo, resulta ser un componente crucial en muchos procesos asociados con el cáncer, como la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Por otro lado, en los últimos años surgieron potenciales aplicaciones clínicas en la terapia tumoral que involucran a la familia del AH, como es el caso de los derivados sulfatados del ácido hialurónico. Antecedentes reportan que en ciertos tipos de cáncer el ácido hialurónico sulfatado presenta actividad antitumoral y antiangiogénica. Sin embargo, hay pocos antecedentes que estudien tanto la acción del ácido hialurónico como de sus derivados químicos sobre monocitos/macrófagos (Mo/M ϕ), y mucho menos que investiguen su acción sobre el comportamiento angiogénico de estas células en el microambiente tumoral. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue estudiar la modulación que ejerce el ácido hialurónico de distintos pesos moleculares y sus derivados sulfatados sobre monocitos/macrófagos en un contexto tumoral. Se observó que tanto el ácido hialurónico como sus derivados sulfatados fueron capaces de modular la respuesta angiogénica de los Mo/M ϕ dependiendo del tipo tumoral. Asimismo, se observó la modulación de proteínas de unión al AH que son capaces de regular su función y estructura, como TSG-6 que probablemente en este contexto tenga una acción regulatoria de la respuesta angiogénica de estas células. Además, se demostró que los derivados sulfatados de ácido hialurónico podrían ejercer un rol antitumoral y antiangiogénico tanto en células tumorales como en Mo/M ϕ de un contexto de carcinoma mamario. Estos hallazgos son de gran interés, especialmente para incrementar el éxito de los agentes antiangiogénicos en cáncer.

PUBLICACIONES

Durante el transcurso de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

- The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. Spinelli, Fiorella M.; Vitale, Daiana L.; Demarchi, Gianina; Cristina, Carolina; Alaniz, Laura. *Clinical and Translational Immunology*. Año: 2015.
- Hyaluronan preconditioning of monocytes/macrophages affects their angiogenic behavior and regulation of TSG-6 expression in a tumor type-specific manner. Spinelli, Fiorella M.; Vitale, Daiana L.; Icardi, Antonella; Caon, Ilaria; Brandone, Alejandra; Giannoni, Paula; Saturno, Virginia; Passi, Alberto; García, Mariana; Sevic, Ina; Alaniz, Laura. *FEBS Journal*. Año: 2019; vol. 286 p. 3433 – 3449.
- Hyaluronan in the tumor microenvironment. Spinelli, Fiorella M.; Vitale, Daiana L.; Sevic, Ina; Alaniz, Laura. *Tumor Microenvironment - Extracellular Matrix Components*. Año: 2020; p. 67 – 89.
- Breast carcinoma: antitumor and antiangiogenic activity of sulfated hyaluronan in tumor cells and in monocytes/macrophages. Spinelli, Fiorella M.; Pluda, Stefano; Vitale, Daiana L.; Rosales, Paolo; Icardi, Antonella; Guarise, Cristian; Sevic, Ina; Garcia, Mariana; Galesso, Devis; Alaniz, Laura. En redacción.

COLABORACIONES

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

- Dr. Devis Galesso (Discovery, R&D, Fidia farmaceutici S.p.A., Abano Terme, Italia).
- Dr. Alberto Passi (Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italia).
- Dr. Anthony Day (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, UK).
- Los servicios de patología, cirugía y análisis clínicos del Hospital Interzonal General de Agudos Dr. Abraham F. Piñeyro (Junín, Buenos Aires, Argentina).
- El servicio de cirugía de la Clínica Centro (Junín, Buenos Aires, Argentina).

ÍNDICE

Abreviaturas	9
1. Introducción	10
1.1. Cáncer: definición y epidemiología	10
1.2. El microambiente tumoral	10
1.3. Componentes celulares del microambiente tumoral	11
1.3.1. Macrófagos	12
1.3.2. Células endoteliales (angiogénesis tumoral)	13
1.4. Componentes acelulares del microambiente tumoral	14
1.4.1. Ácido hialurónico	14
1.4.1.1. Metabolismo del AH	16
1.4.1.2. Receptores del AH	17
1.4.1.3. TSG-6	19
1.4.1.4. AH en cáncer	20
1.4.1.5. Señales inflamatorias inducidas por AH	20
1.5. Potenciales aplicaciones clínicas de la familia del AH	20
2. Hipótesis y objetivos	22
2.1. Hipótesis	22
2.2. Objetivos	22
2.2.1. Objetivo general	22
2.2.2. Objetivos específicos	22
3. Materiales y métodos	24
3.1. Reactivos	24
3.1.1. Ácido hialurónico	24
3.1.2. Ácido hialurónico sulfatado	24
3.2. Cultivo celular	24
3.2.1. Líneas celulares	24
3.2.2. Cultivos primarios derivados de sangre periférica	25
3.2.3. Muestras de pacientes oncológicos.	25
3.3. Preparación de lisados y medios condicionados tumorales	27
3.4. Ensayo de viabilidad por MTS	27
3.5. Calculo de IC50	27
3.6. Ensayo de citotoxicidad	28
3.7. Análisis de apoptosis por Anexina V e yoduro de propidio.	28
3.8. Ensayo de proliferación	28
3.9. Ensayo de formación de tumorosferas	29

3.10.	Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo	29
3.11.	ELISA.....	30
3.12.	Ensayo tipo ELISA para la detección de ácido hialurónico.....	30
3.13.	Ensayo de exclusión de partículas	30
3.14.	RT-qPCR.....	31
3.15.	Western blot	32
3.16.	Análisis de bases de datos	32
3.17.	Zimografía de gelatina	32
3.18.	Ensayos de migración de células.....	33
3.19.	Experimentos in vivo.....	34
3.20.	Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	34
3.21.	Tinción con GSL I para detección de células endoteliales.....	34
3.22.	Tinción histoquímica para la detección de AH y TSG-6.....	34
3.23.	Análisis estadístico	35
4.	Resultados	36
4.1.	PARTE I: Efecto del AH sobre Mo/MØ en un contexto tumoral	36
4.1.1.	Modelo in vitro con Mo/MØ de dadores sanos	36
4.1.1.1.	Viabilidad y modulación del fenotipo.....	36
4.1.1.2.	Niveles de expresión de factores angiogénicos.....	39
4.1.1.3.	Niveles de expresión y actividad de MMPs	40
4.1.1.4.	Migración de células endoteliales	40
4.1.1.5.	Expresión de receptores de AH	42
4.1.1.6.	Expresión proteica de TSG-6.....	43
4.1.2.	Modelo in vivo	46
4.1.2.1.	Análisis de la vasculatura tumoral	46
4.1.2.2.	Análisis de los niveles de AH y TSG-6 en el tumor.....	48
4.1.3.	Modelo in vitro con muestras de pacientes oncológicos	50
4.2.	PARTE II: Efecto del AH sulfatado sobre células tumorales	53
4.2.1.	Viabilidad	53
4.2.2.	Citotoxicidad.....	54
4.2.3.	Apoptosis	55
4.2.4.	Proliferación	56
4.2.5.	Ensayo de exclusión de partículas para la detección de AH pericelular	56
4.2.6.	Detección del AH secretado	57
4.2.7.	Análisis de formación de tumorosferas.....	58
4.2.8.	Migración de células endoteliales	59
4.2.9.	Migración de Mo/MØ.....	61

4.3.	PARTE III: Efecto del AH sulfatado sobre Mo/MØ en un contexto tumoral.....	63
4.3.1.	Modelo in vitro con Mo/MØ de dadores sanos	63
4.3.1.1.	Viabilidad de Mo/MØ frente a AHs	63
4.3.1.2.	Modulación inmunológica de AHs en un contexto tumoral	64
4.3.1.3.	Migración de células endoteliales	65
4.3.1.4.	Niveles de expresión de factores angiogénicos.....	66
4.3.1.5.	Expresión proteica de TSG-6.....	67
4.3.1.6.	Detección del AH secretado por los Mo/MØ.....	68
4.3.2.	Modelo in vivo	68
4.3.2.1.	Análisis de la vasculatura tumoral	69
4.3.2.2.	Análisis de los niveles de AH y TSG-6 en el tumor	70
5.	Discusión	72
5.1.	PARTE I: Efecto del AH sobre Mo/MØ en un contexto tumoral	72
5.2.	PARTE II: Efecto del AH sulfatado sobre células tumorales	75
5.3.	PARTE III: Efecto del AH sulfatado sobre Mo/MØ en un contexto tumoral	78
6.	Conclusiones generales.....	81
7.	Referencias bibliográficas	82

ABREVIATURAS

AH: ácido hialurónico
AH APM: ácido hialurónico de alto peso molecular
AH BPM: ácido hialurónico de bajo peso molecular
AHs: ácido hialurónico sulfatado
AHs1: ácido hialurónico parcialmente sulfatado
AHs3: ácido hialurónico totalmente sulfatado
CE: células endoteliales
FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico 2
GAGs: glicosaminoglicanos
HASs: ácido hialurónico sintasas
HYALs: hialuronidasas
LC: Lisado celular
LC-L: Lisado celular de LoVo
LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231
LTT: lisado de tejido tumoral
LTAT: Lisado de tejido adyacente al tumor
MAT: microambiente del tumor
MC: Medio condicionado
MC-H: Medio condicionado de H1299
MC-L: Medio condicionado de LoVo
MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231
MEC: matriz extracelular
MMPs: metaloproteinasas de matriz
Mo/MØ: monocitos/macrófagos
PG: proteoglicanos
TAMs: macrófagos asociados al tumor
VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER: DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es una enfermedad que se origina como consecuencia del crecimiento celular anormal y descontrolado, puede originarse en numerosas partes del organismo. El tumor en formación es capaz de invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es considerada una de las principales causas de muerte poblacional a nivel mundial (https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2019/en/).

En la República Argentina la incidencia del cáncer es media-alta y los tumores malignos afectan principalmente a los grupos entre 40 y los 79 años. El cáncer de colon, pulmón y mama son los tres tipos de cáncer más frecuentes dentro de la población (<http://www.deis.msal.gov.ar/wp-content/uploads/2019/01/Anexo-anuario-2017-DEIS.pdf>). Por esta razón, el estudio de factores biológicos que favorezcan la progresión de la enfermedad es de suma importancia en el desarrollo de terapias antitumorales eficaces. Varias de las nuevas terapias están dirigidas a bloquear el crecimiento tumoral a través de modular su entorno o microambiente, formado por distintos tipos celulares, factores solubles y moléculas como se describe en la siguiente sección.

1.2. EL MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente del tumor (MAT) es clave para que las células tumorales logren el establecimiento y la progresión del tumor, así como la metástasis. El MAT está formado por componentes: i) celulares, que son las células que rodean al tumor y ii) acelulares, que incluyen factores de crecimiento, citoquinas y otros componentes de la matriz extracelular (MEC) (1).

Las células tumorales tienen la capacidad de modificar su microambiente para lograr su establecimiento y crecimiento (2). Esto resulta en una reprogramación de las células que rodean el tumor, entre ellas se incluyen: células endoteliales (CE), fibroblastos y células del sistema inmune como macrófagos, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés: *Natural Killer*), linfocitos T, entre otros. Por su parte, las células del sistema inmune contribuyen funcionalmente al crecimiento y progresión tumoral a través de la liberación de factores solubles con acción no solo inmunológica sino también angiogénica, como citoquinas y quimioquinas, enzimas degradantes de la MEC, especies reactivas del oxígeno y otras moléculas bio-activas (3). El aspecto angiogénico fue uno de los ítems evaluados en este trabajo de tesis.

Por otro lado alteraciones en la MEC promueven señales celulares anormales, llevando a una proliferación celular desregulada, crecimiento y reorganización del citoesqueleto, favoreciendo la migración celular e incluso la modulación del sistema inmune (4, 5). Dentro de estos componentes acelulares del MAT se encuentran aquellos componentes de la MEC como los miembros de la familia de los proteoglicanos (PG) y glicosaminoglicanos (GAGs), tales como heparan, keratan, condritin sulfato y ácido hialurónico (AH), los cuales presentan una expresión desregulada en el estroma tumoral (6, 7). Dentro de ellos el AH y su acción fisiopatológica fue estudiada en esta tesis.

1.3. COMPONENTES CELULARES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Como se mencionó anteriormente y se muestra en la Fig. 1, en el MAT se encuentran diferentes células no tumorales que rodean al tumor y que en muchos casos contribuyen al crecimiento y mantenimiento del mismo. En esta sección se describirán dos tipos celulares del MAT los macrófagos y las CE, objetos de nuestro estudio.

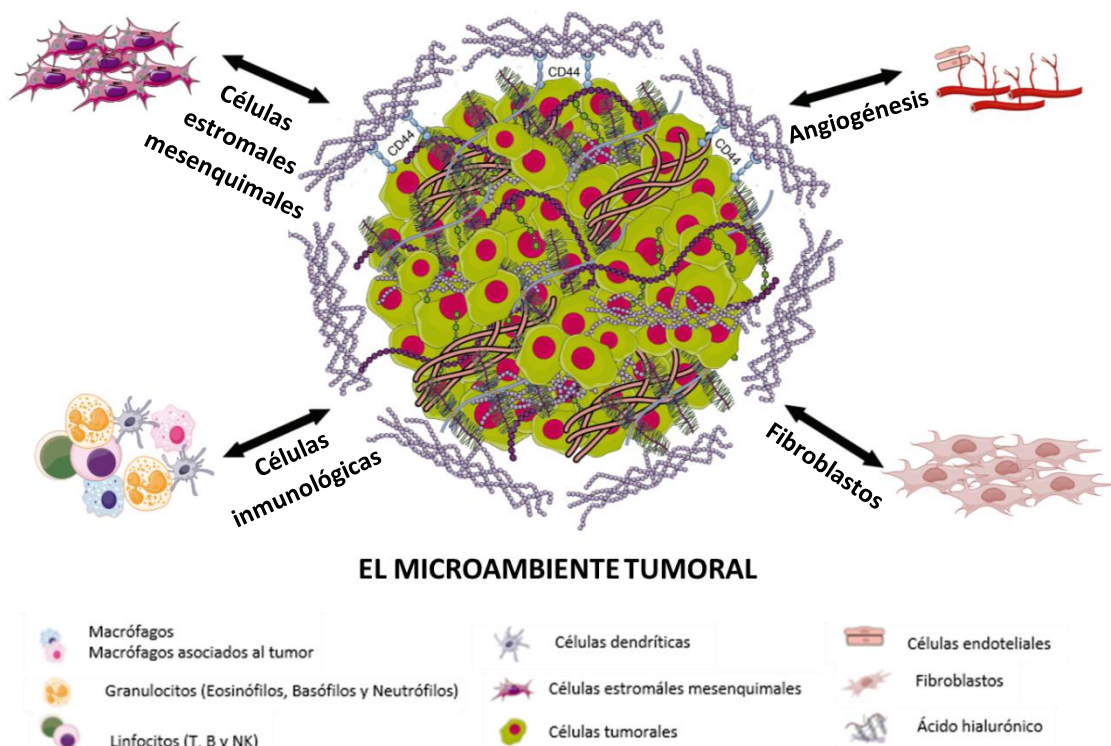


Figura 1. El microambiente tumoral. El microambiente tumoral está compuesto por células no tumorales que rodean al tumor y que en muchos casos contribuyen al crecimiento y mantenimiento del mismo, cómo células endoteliales, fibroblastos, células estromales mesenquimales y células inmunológicas infiltrantes. Además, contiene componentes acelulares, cómo es el caso del AH, un componente abundante de la MEC que recluta y activa a las células estromales para contribuir al desarrollo tumoral. Figura adaptada de *Sevic et al., The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma, Hepatocellular Carcinoma, 2019.*

1.3.1. Macrófagos

Por lo general, las células inmunes tienen un rol clave en la modulación del MAT. Uno de los tipos de células inmunológicas más importantes son los macrófagos. Estas células se originan de un precursor hematopoyético presente en la médula ósea, en donde permanecen por menos de 24 horas y luego pasan a la circulación para ser distribuidos por todo el cuerpo. Cuando este precursor entra en sangre periférica se lo denomina monocito y una vez que infiltran los tejidos, los monocitos, maduran y se convierten en macrófagos (8). Sin embargo, en los últimos años se ha recopilado evidencia de que no todos los macrófagos residentes de tejidos provienen de monocitos circulantes (9). Dentro de los tejidos, los macrófagos tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos y proveen protección al iniciar mecanismos inmunes innatos y desencadenar respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación antigénica, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas (9).

Clásicamente, se sabe que los macrófagos pueden adquirir diferentes fenotipos: M1 (activación clásica) y M2 (activación alternativa). Los macrófagos tipo M1 incluye a aquellos que desarrollan una respuesta pro-inflamatoria y antitumoral. Mientras que los macrófagos tipo M2 producen una respuesta anti-inflamatoria y protumoral estimulando la evasión del sistema inmune (10). Los macrófagos M1 y M2 tienen un perfil distintivo en sus marcadores de superficie y en las citoquinas que producen. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los tejidos y a la gran plasticidad que presentan los macrófagos, resulta difícil asignarle un marcador bioquímico específico a cada población (11, 12).

En los tumores, los macrófagos, pueden generar diferentes acciones que dependen principalmente del tipo de tejido y del estado de progresión. Por lo general, a los macrófagos presentes en el MAT se los conoce como macrófagos asociados al tumor (TAMs, por sus siglas en inglés: *tumor associated macrophages*) y provienen tanto de monocitos como de macrófagos residentes del tejido donde se desarrolló el tumor. En la mayoría de los tipos tumorales, los TAMs adoptan un fenotipo tipo M2 y promueven la proliferación y migración de las células tumorales, la angiogénesis y la remodelación del MAT (13, 14) . Sin embargo, este fenotipo puede variar dependiendo del tipo tumoral, del área del tumor en la que se encuentra y del estadio tumoral (12, 15) (Fig. 2).

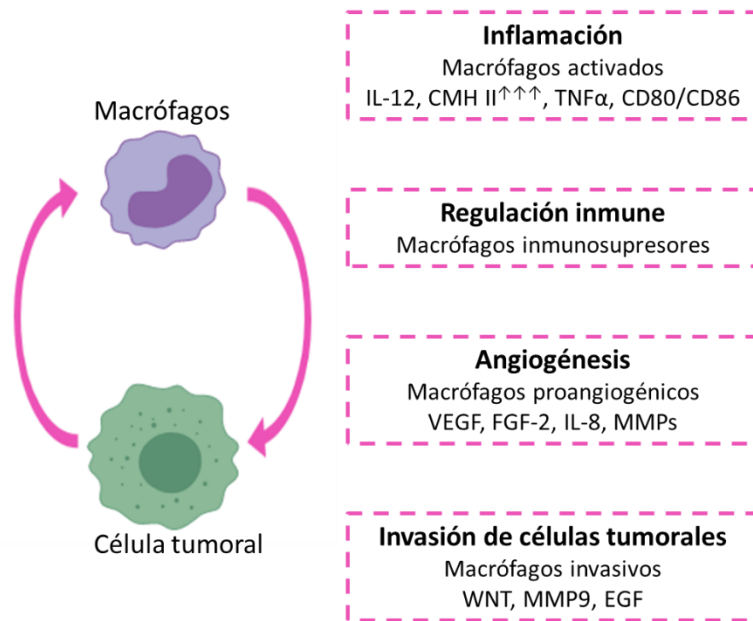


Figura 2. Perfiles de los macrófagos del MAT. En el MAT, los macrófagos por lo general están involucrados en muchos procesos asociados al crecimiento y progresión tumoral, como la regulación del sistema inmune, la angiogénesis y la invasión. No obstante, estas acciones pueden variar dependiendo del tipo tumoral, del área del tumor en la que se encuentra y del estadio tumoral. *Adaptado de Poh et al., Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside, Frontiers in oncology, 2018.*

1.3.2. Células endoteliales (angiogénesis tumoral)

El desarrollo de los vasos sanguíneos implica la generación de nuevas CE y su posterior organización en estructuras tubulares (vasculogénesis), además de la generación de nuevos vasos (angiogénesis) a partir de los ya existentes (16). Los tejidos tumorales en crecimiento necesitan una gran cantidad de nutrientes y oxígeno; así como también necesitan eliminar los restos metabólicos y dióxido de carbono. Para esto, se genera la neo-vasculatura asociada al tumor mediante el proceso de angiogénesis (**Fig. 3**). Pero a diferencia de las condiciones fisiológicas, la angiogénesis tumoral se encuentra activa continuamente, provocando la formación constante de nuevos vasos que ayudan a mantener el crecimiento del tumor. Se ha demostrado que diversas señales oncogénicas estimulan la sobreexpresión de distintos factores como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), entre otros (17-19). Esto lleva a una activación crónica de la angiogénesis, y como consecuencia, se forman vasos sanguíneos aberrantes dentro del tumor. También contribuyen en el proceso de angiogénesis los diferentes tipos de células reclutadas hacia el entorno tumoral (20-22). Allí, las células inflamatorias, como los macrófagos o TAM, intervienen en la regulación de la angiogénesis y en muchos casos refuerzan la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos (**Fig. 3**) (17).

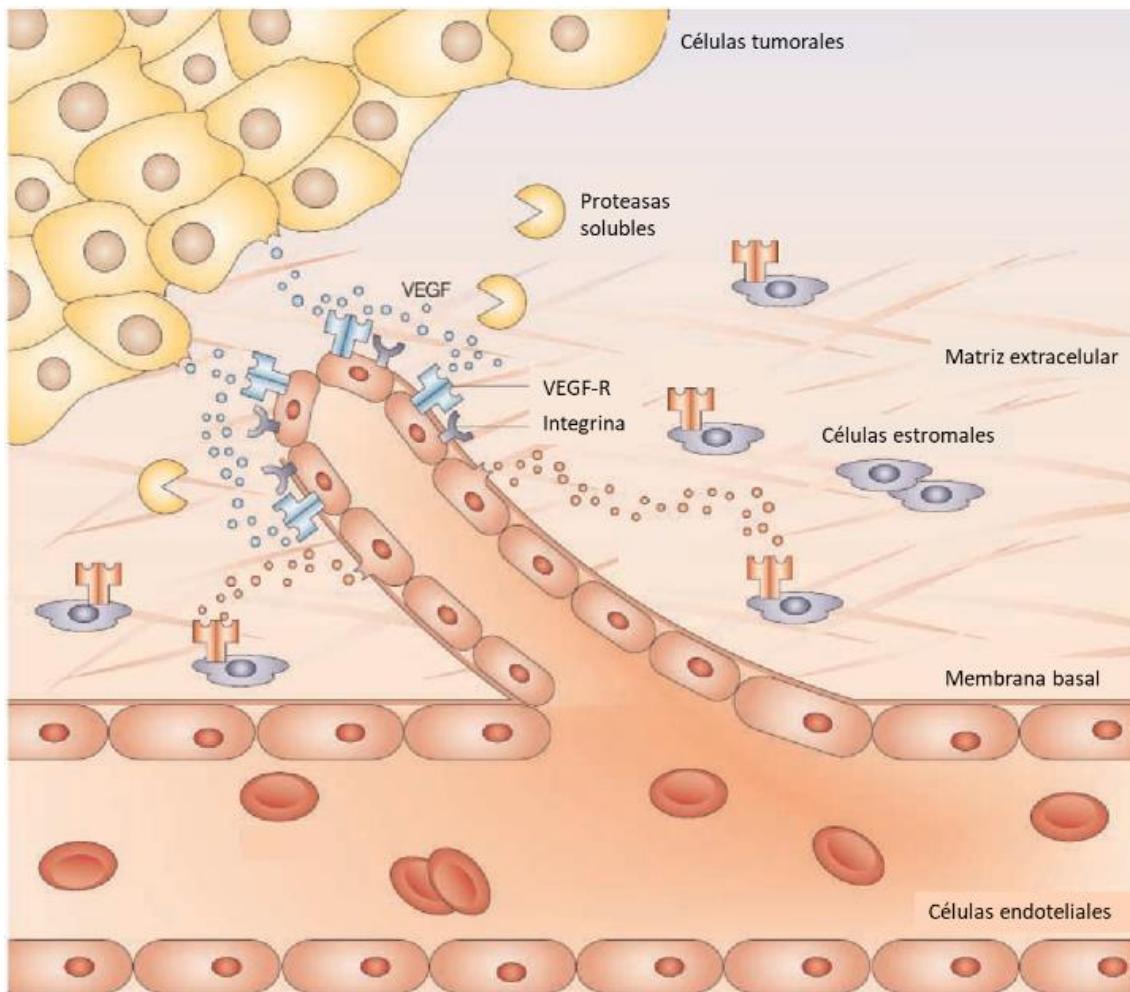


Figura 3. Angiogénesis tumoral. Las células tumorales liberan factores pro-angiogénicos, como VEGF, que se difunden hacia los tejidos cercanos y se unen a receptores en las células endoteliales preexistentes. Esta interacción lleva a la activación de células endoteliales y secreción de diversas enzimas proteolíticas como MMPs. Estas proteasas solubles degradan la membrana basal y la matriz extracelular, permitiendo la proliferación de las células endoteliales activadas; y su posterior migración hacia el microambiente tumoral. Figura adaptada de *Cristofanilli et al., Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches, Nature Reviews Drug Discovery, 2002.*

1.4. COMPONENTES ACELULARES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Además de las células que rodean al tumor, el MAT contiene componentes acelulares, que forman la MEC tumoral. En esta sección se describirá a uno de ellos: el ácido hialurónico, junto con sus proteínas de unión y las respuestas que desencadena.

1.4.1. Ácido hialurónico

Como se mencionó anteriormente, el AH es uno de los principales componentes de la MEC de la mayoría de los tejidos adultos. El AH es un polímero miembro de la familia de los GAGs,

compuesto por unidades repetidas de disacáridos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, no sulfatado (23) (**Fig. 4**). Está presente en la matriz intersticial pero también es detectado a un nivel intracelular (23). Además de facilitar la organización de los tejidos, el AH actúa como un importante modulador del comportamiento celular induciendo diferentes señales. Ello se debe a que el AH puede interactuar con diferentes receptores de superficie celular (CD44, RHAMM, TLR4, LYVE-1), con proteínas de unión (HABP, TSG-6) y con PG. Estas interacciones permiten al AH modular distintos procesos celulares entre los que se incluyen el crecimiento, la adhesión, la migración y la diferenciación (24).

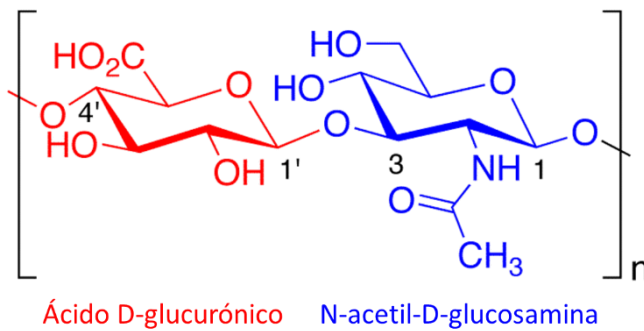


Figura 4. Estructura del ácido hialurónico. El AH es un polisacárido del tipo de glicosaminoglicanos compuesto por repetitivos disacáridos poliméricos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β (1 \rightarrow 3).

Las propiedades del AH son dependientes de su peso molecular. En homeostasis, el AH de alto peso molecular (APM, de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 Da) es predominante, cumpliendo principalmente funciones hidrodinámicas y estructurales (24). No obstante, las interacciones entre el AH APM y otros componentes de la MEC inducen diversas señales de homeostasis. Mientras que el AH de bajo peso molecular (BPM, de 10^4 a $0,5 \times 10^6$ Da) está presente principalmente durante los procesos inflamatorios (**Fig. 5**) (24), ya que durante este proceso se cliva el AH APM a fragmentos de menor tamaño (25). Numerosos trabajos indican que un desbalance en el metabolismo de AH y su interacción con sus receptores promueve procesos biológicos patológicos, tal como se observa en los tumores, favoreciendo la invasión y la metástasis, la angiogénesis, la sobrevida y a la resistencia a drogas (26, 27) y modulando al sistema inmune (28-32).

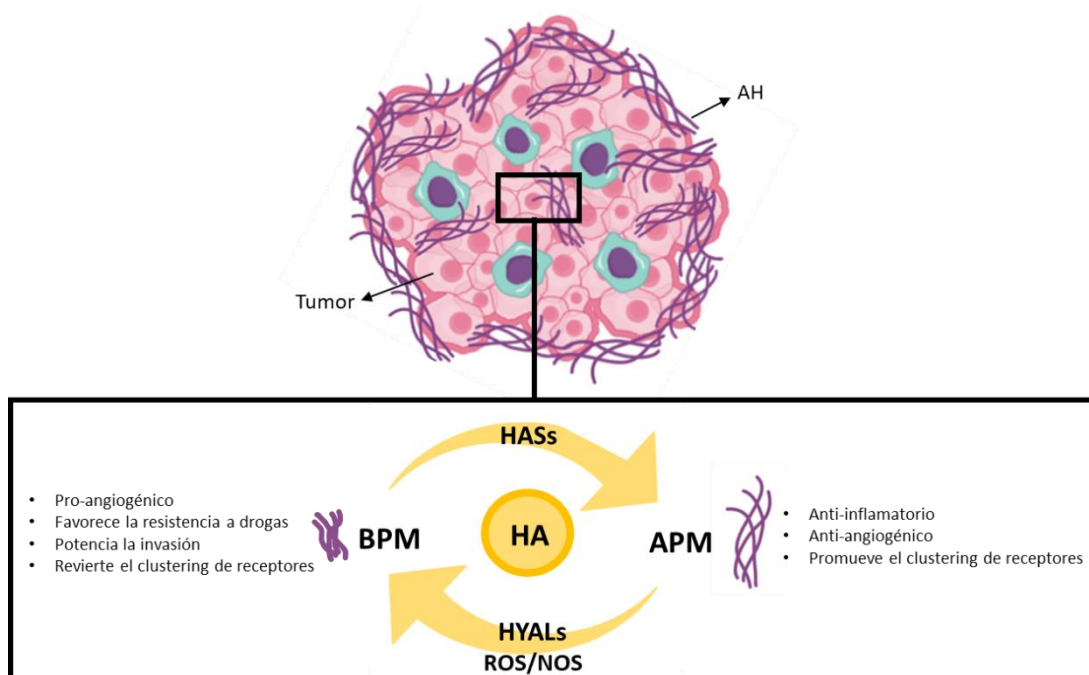


Figura 5. El metabolismo del AH y el microambiente tumoral. En los tejidos tumorales, el metabolismo de AH se encuentra desregulado, así como la interacción con sus proteínas de unión. La biosíntesis de AH es catalizada por la acción de las HASs. La cantidad y tamaño de las cadenas de AH presentes en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

1.4.1.1. Metabolismo del AH

El metabolismo del AH es un balance entre su síntesis y degradación. El AH es sintetizado por las AH sintasas (HASs, del inglés: *HA synthases*) y es fragmentado en moléculas bioactivas por las hialuronidasas (HYALs, del inglés: *hyaluronidasas*) o por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS, NOS) (33, 34) (Fig.5).

Las HASs son proteínas de membrana que sintetizan cadenas de AH de varios pesos moleculares en la cara interna de la membrana plasmática y luego secretan estos AH a la MEC (35, 36). En mamíferos el AH es sintetizado por tres diferentes isoenzimas llamadas HAS 1, 2 y 3 (34). Se reportó que HAS 1 y HAS 2 producen AH de mayor peso molecular (200-2000 kDa), mientras que HAS 3 es la responsable de producir fragmentos más pequeños de AH (100-1000 kDa) (37, 38). En cáncer, una desregulación en la expresión de las HASs resulta en una producción anómala de AH y promueve el desarrollo de procesos biológicos anormales como la transformación y la metástasis (34, 39, 40). Estudios recientes indicaron que la sobreexpresión de HASs en cáncer de vejiga, pulmón, ovario y mama, en donde fue relacionado con un fenotipo tumoral maligno (41-43). Los resultados indicarían que HAS 2 sería la encargada de promover a proliferación tumoral, migración e invasión en varios tipos tumorales (44).

El catabolismo del AH en los tejidos depende principalmente de las HYALs. Las HYALs catalizan la hidrólisis del AH y funcionan como endo-acetil-hexosaminidasas. HYAL 1 y HYAL 2 son las que mayor actividad enzimática presentan en los mamíferos, clivando un tercio del total de AH por día (**Fig. 6**). En varios tumores se reportó una sobreexpresión de HYALs y en muchos de ellos se propuso como un biomarcador (45, 46). En el caso de cáncer de mama, estudios previos reportaron que la hipoxia en el tumor y en su microambiente tiene un efecto positivo en la actividad de HYALs lo que resulta en la producción de fragmentos de bajo peso molecular de AH que promueven la angiogénesis (**Fig. 6**) (47). Aún más, se observó una sobreexpresión de HYALs en células tumorales de carcinoma no microcítico de pulmón proponiéndolo como un indicador prometedor de la progresión tumoral (48, 49).

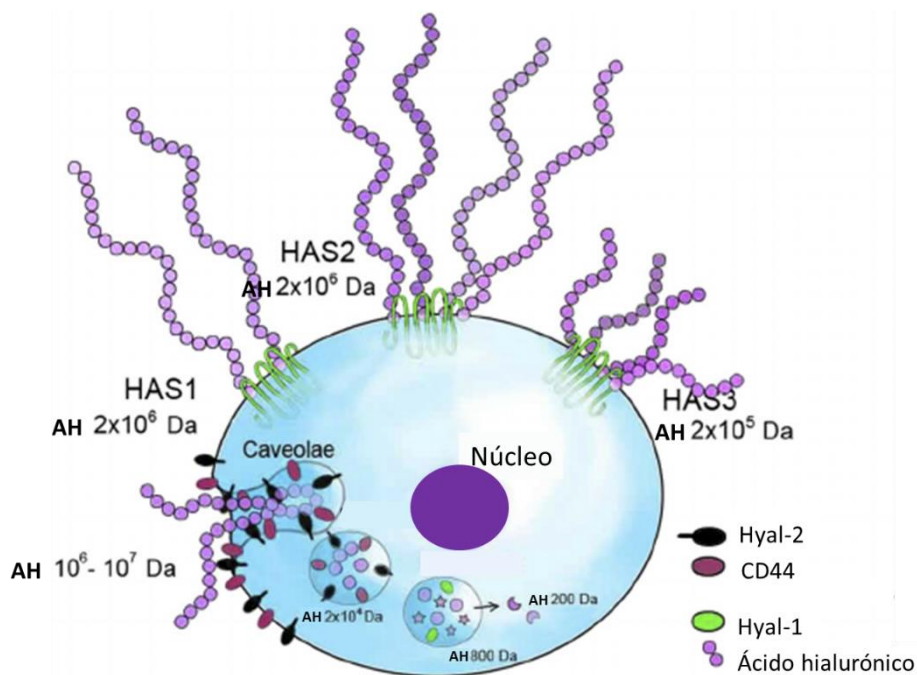


Figura 6. Síntesis y fragmentación del AH. El AH es sintetizado por las AH sintetasas (HAS 1-3), enzimas que lo producen en la membrana plasmática y de distinto tamaño. El AH es fragmentado en moléculas bioactivas de menor peso molecular por las hialuronidasas (Hyal 1-2). Adaptada de *Stridh et al., Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012.*

1.4.1.2. Receptores del AH

Como se mencionó anteriormente, el AH interactúa con distintos receptores de membrana. El principal receptor que media las señalizaciones inducidas por AH es CD44. CD44 es una molécula de adhesión que se expresa en varios tipos celulares, incluyendo leucocitos, fibroblastos, CE, células epiteliales, macrófagos, entre otros (**Fig. 7**). Si bien es el principal receptor de AH, también es capaz de unir otros componentes de la MEC como colágeno, fibronectina, condroitin sulfato, etc. (50). CD44 media señales intracelulares cumpliendo un rol

fisiológico en procesos de adhesión, proliferación y migración celular. Sin embargo, la unión del AH con CD44 también puede favorecer procesos asociados a condiciones no fisiológicas, como las observadas durante el desarrollo tumoral. La expresión elevada de CD44 ha sido demostrada en distintos tipos de cáncer (51).

Otro receptor para AH es RHAMM (por sus siglas en inglés: *Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility*), una proteína citoplasmática que es exportada a la superficie celular. En la membrana plasmática RHAMM funciona como una proteína de unión al AH que se une y activa a CD44 desencadenando una vía de señalización relacionada a la proliferación celular. A RHAMM ha sido asociado con muchas funciones que incluyen la regulación y movilidad de CE y macrófagos, entre otras (52). De esta forma, muchos reportes son consistentes con el rol de RHAMM e el proceso inflamatorio y la migración de CE, contribuyendo a la cicatrización de heridas y a la angiogénesis *in vivo* (52).

Además, el AH es capaz de unirse a receptores involucrados en la respuesta inmune tales como receptores tipo toll, TLR2 y TLR4. TLR4 es una proteína transmembrana que reconoce moléculas asociadas a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés: *pathogen-associated molecular patterns*) (Fig. 7). Además, responde a moléculas propias producidas luego de daño o muerte celular (DAMPs, por sus siglas en inglés: *damage-associated molecular patterns*) como es el caso de los fragmentos de AH de bajo peso molecular (53). AH puede actuar también de manera

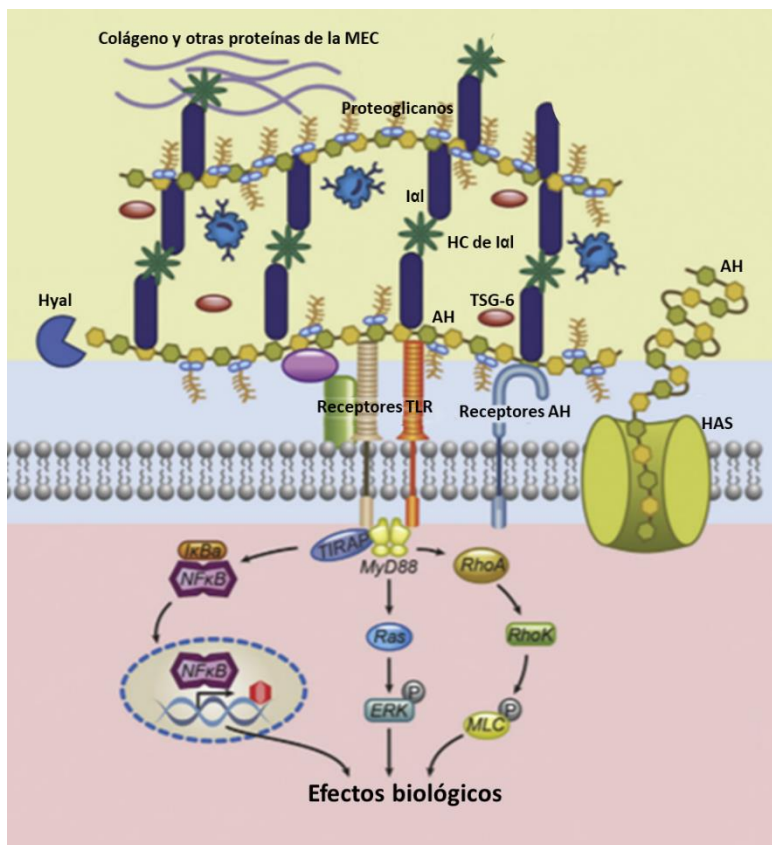


Figura 7. Función y actividad del AH. El AH presenta una función que depende de los siguientes parámetros: físicoquímicos, tamaño, distribución, unión con otros componentes de la MEC, síntesis y degradación, interacción con receptores, señalización intracelular, entre otros. Esta compleja red de interacciones tiene distintos efectos biológicos dependiendo de la célula y el microambiente en el que esta se encuentra. Adaptado de *Garantziotis and Savani, Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context, Matrix Biology, 2019.*

indirecta sobre otros receptores. Por ejemplo su unión a CD44 induce la interacción con TLR2/4 la cual estimula la expresión de genes y producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (54, 55).

1.4.1.3. TSG-6

En la MEC hay diversas proteínas que se unen al AH, que se denominan hialaderinas y permiten que este interactúe con otros componentes de la matriz, contribuyendo así a la diversidad de respuestas generadas por AH (**Fig. 7**). Una de las proteínas de unión al AH es TSG-6 (por sus siglas en inglés: *Tumor necrosis factor-stimulated gene 6*), de expresión constitutiva en algunos tejidos, sobre todo en aquellos que son metabólicamente activos (56). Esta proteína de la MEC tiene un rol crucial en la formación del entrecruzamiento entre AH con otros componentes de la matriz. Tal es el caso de las cadenas pesadas (HC) de $\alpha 1$ (por sus siglas en inglés: *inter- α -inhibitor*), una proteína que a través de TSG-6 se entrecruza con AH. Esta unión HC•AH le brinda estabilidad e integridad estructural a la MEC (56-58). Aún más, se encontró que el complejo HC•AH tiene un efecto antiinflamatorio polarizando a los macrófagos hacia un fenotipo M2 (56, 59). También se reportó la acción de TSG-6 en el control de la angiogénesis, sugiriendo que esta proteína podría tener propiedades tanto pro como anti-angiogénicas dependiendo del microambiente en el que se encuentre (60) (**Fig. 8**). Se sabe poco sobre el rol de HC•AH y TSG-6 en el MAT.

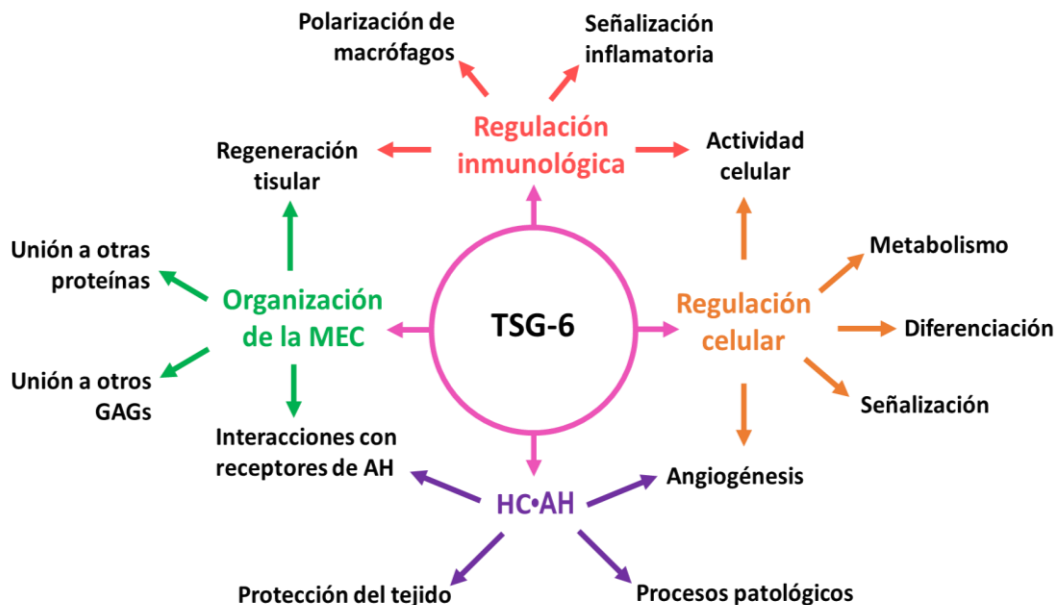


Figura 8. TSG-6: una proteína con múltiples funciones. Las funciones de TSG-6 pueden resumirse en cuatro categorías: regulación celular, regulación inmunológica, organización de la MEC y la formación de complejos HC•AH. Adaptado de Day and Milner, *TSG-6: a multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties*, Matrix Biology, 2018.

1.4.1.4. AH en cáncer

Numerosos antecedentes indican que una producción anómala de AH promueve diversos procesos biológicos patológicos como los observados en el desarrollo tumoral. Se ha demostrado que, a través de la interacción con CD44, el AH es capaz de favorecer la invasión y la metástasis en tejidos lejanos, la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis, la inducción de resistencia a multidroga (26, 27, 61-63) y la modulación del sistema inmune (28, 29, 54). Más aún, se observó que en tumores malignos la concentración de AH es más alta que en tumores benignos y que en tejidos normales, e incluso en algunos tipos tumorales los niveles de AH se utilizan como posibles indicadores de diagnóstico y malignidad (64).

En varios tumores, el AH BPM promueve su diseminación mediante la estimulación de la angiogénesis (65, 66). Sin embargo, se demostró que en carcinoma colorrectal el AH BPM exógeno redujo el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* mientras este efecto no se observó con AH APM (67). En cambio, en un contexto de carcinoma mamario se observó que el AH BPM contribuye a la progresión tumoral (66). Estos resultados controversiales pueden deberse a que no se evaluó el impacto sobre las células asociadas al tumor como los macrófagos y a factores que son capaces de modular la estructura y función del AH.

1.4.1.5. Señales inflamatorias inducidas por AH

Las células del sistema inmunológico son capaces de unirse al AH y su respuesta depende de diversos factores, como lo son: i) el tipo de célula, ii) el contexto en el que se encuentra, iii) el peso molecular del AH y iv) las proteínas de unión al AH presentes en el microambiente (24). En el caso de los macrófagos, se reportó que la respuesta fisiológica al AH depende de su peso molecular. Se observó que el AH APM induce una polarización antiinflamatoria de tipo M2, mientras que el AH BPM produce una respuesta inflamatoria de tipo M1 (68, 69).

En tumores de cáncer de mama, se observó una correlación entre el aumento del número de macrófagos y la acumulación de AH (70). Además, se demostró que los TAMs de cáncer de mama aumentaron la neo-vascularización y el crecimiento tumoral en una manera dependiente de AH (71). Sin embargo, aún no está claro el rol del AH en la activación y reprogramación de los macrófagos en un contexto tumoral.

1.5. POTENCIALES APLICACIONES CLÍNICAS DE LA FAMILIA DEL AH

En los últimos años, surgieron potenciales aplicaciones clínicas en la terapia tumoral que involucran a la familia del AH. Dentro de estas se encuentran el uso de inhibidores de la síntesis del AH (72-75), estrategias que involucran la degradación del AH (76-80) e incluso el empleo del

AH como un vehículo de drogas (81, 82). Una estrategia emergente, incluye el uso de derivados químicos del AH, como es el caso del ácido hialurónico sulfatado (AHs). El AHs es un tipo de AH modificado químicamente con grupos sulfatos en su estructura (Fig. 9).

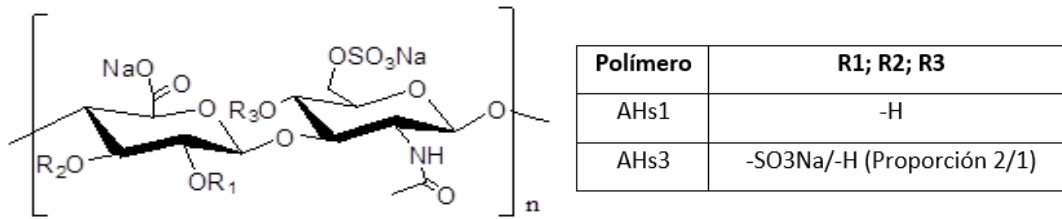


Figura 9. Estructura química del ácido hialurónico sulfatado. El AHs es un derivado químico del AH, compuesto por grupos sulfatos. El grado de sulfatación fue de 1 o 3, AHs1 o AHs3 respectivamente.

Estudios previos demostraron que el AHs inhibe a la HYAL 1 y a las metaloproteinasas (MMPs) que son enzimas degradantes de la MEC (83). Es interesante su acción inhibitoria sobre las HYAL ya que en un contexto de cáncer de próstata, el AHs presentó una actividad antitumoral y antiangiogénica (84). Además, estos AH químicamente modificados exhibieron una actividad antitumoral en modelos de cáncer de vejiga inhibiendo la invasión y proliferación (85). En cuanto a la angiogénesis, se demostró también que el AHs inhibió la proliferación, supervivencia y formación de tubos de células endoteliales, proponiéndolo como un biomaterial con posible uso en terapias antiangiogénicas (86).

En cuanto a su acción sobre macrófagos en un contexto fisiológico, se observó que matrices formadas por AHs y colágeno inducen un fenotipo tipo M2 (87-89) y además reduce la biodisponibilidad de ciertas citoquinas (90). Sin embargo, no se realizaron estudios con AHs sobre macrófagos en un contexto tumoral.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El ácido hialurónico es un modulador de distintas células del sistema inmune, entre ellas los macrófagos, que cumplen un rol dual en el microambiente tumoral dado que tienen la plasticidad de desarrollar tanto un fenotipo pro como anti tumoral. En ese microambiente tumoral, el ácido hialurónico de la matriz extracelular es capaz de modificar las respuestas angiogénicas e inmunológicas de los macrófagos. Esta modulación requiere de la interacción del ácido hialurónico con sus receptores y proteínas de unión. Dado que dicha modulación depende de la etiología tumoral, así como del tamaño y estructura del AH, la respuesta de monocitos/macrófagos es diferencial en distintos modelos tumorales. Por otro lado, la utilización exógena de especies de ácido hialurónico de distintos pesos moleculares o modificados químicamente inducen una respuesta en dichas células con fines terapéuticos.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

La regulación de AH y sus derivados químicos sobre el MAT no se conoce completamente en un contexto inmunológico. *En este sentido, el objetivo general de este trabajo es estudiar la modulación que ejerce el AH y sus derivados sobre monocitos/macrófagos presentes en el contexto del tumor.*

2.2.2. Objetivos específicos

- I. Evaluar la acción del AH de distintos pesos moleculares sobre cultivos primarios de monocitos/macrófagos (Mo/MØ) en distintos contextos tumorales:
 - I. Analizar la viabilidad celular
 - II. Evaluar la modulación angiogénica.
 - III. Analizar la expresión de receptores y proteínas de unión al AH.
- II. Evaluar la acción del AH sobre las células inmunes en un modelo de cáncer *in vivo*:
 - I. Observar la velocidad del crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones portadores de tumor.

- II. Analizar la respuesta inmune.
 - III. Analizar la angiogénesis tumoral.
 - IV. Evaluar la expresión de AH y proteínas de unión en el estroma tumoral
- III. Evaluar la acción del AHs con distinto grado de sulfatación sobre células tumorales
- I. Evaluar viabilidad, proliferación y apoptosis.
 - II. Evaluar la capacidad de formación de esferas y/o agregados en cultivos 3D.
 - III. Analizar el estado de la matriz extracelular y en particular del AH.
- IV. Evaluar la acción del AHs con distinto grado de sulfatación sobre cultivos primarios de monocitos/macrófagos en distintos contextos tumorales:
- I. Analizar la viabilidad celular
 - II. Evaluar la modulación angiogénica.
 - III. Analizar la expresión de receptores y proteínas de unión al HA.
- V. Evaluar la acción del AHs sobre las células inmunes en un modelo de cáncer *in vivo*:
- I. Observar la velocidad del crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones.
 - II. Analizar la angiogénesis tumoral.
 - III. Evaluar la cantidad de AH y proteínas de unión

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

3.1.1. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) recombinante libre de endotoxinas y de tamaño definido: alto peso molecular (APM) $1,5-1,8 \times 10^6$ Da y bajo peso molecular (BPM) $1-3 \times 10^5$ Da, fue gentilmente provisto por Farmatrade Argentina (Contipro, República Checa).

3.1.2. Ácido hialurónico sulfatado

El ácido hialurónico parcialmente sulfatado (AHs1) y totalmente sulfatado (AHs3) (**Fig. 9**) fueron sintetizado a partir de la sal de tetrabutilamonio de AH en Fidia Farmaceutici S.p.A. (Abano Terme, PD, Italia), durante mi pasantía de intercambio Argentina-Italia en el marco del proyecto GLYCANC, H2020-MSCA-RISE, UE. Brevemente, para sulfatar el AH se agregaron 13 equivalentes de la sal de piridina sultrioxido: i) 9 equivalentes se agregaron primero y se mezclaron por 1 hora a 30°C y ii) 3 equivalentes se adicionaron posterior mente y se agitó durante 16 horas a 30°C. Luego, se le agregó a la mezcla una solución saturada de NaCl y se precipitó el AHs con etanol.

El precipitado se disolvió en agua destilada y se dializó en agua por 72 horas usando una membrana con un punto de corte de 12 kDa para eliminar las sales. Finalmente, el grado de sulfatación fue analizado por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) (**Tabla 1**).

Tipo de AHs	Peso molecular (kDa)	% de recuperación	Total (g)	Grado de sulfatación
sHA 1	≈ 28,1	53,7	2,58	0,74
sHA 3	≈ 66,4	83,7	4,19	2,53

Tabla 1. Información de los AHs producidos en Fidia Farmaceutici S.p.A.

3.2. CULTIVO CELULAR

3.2.1. Líneas celulares

La línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma mamario humano (HTB-26™), la línea celular LoVo de adenocarcinoma colorrectal humano y la línea celular H1299 de cáncer de pulmón no microcítico humano se adquirieron en la compañía ATCC® (EE. UU.). La línea celular HMEC-1 de endotelio humano fue proporcionada gentilmente por el Dr. Candal (Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, EE. UU.) a través de la Dra. Marcela Bolontrade.

Para el cultivo celular, las células MDA-MB-231 y LoVo se mantuvieron en DMEM F12 (Lab. Microvet) suplementado con 2 $\mu\text{mol/l}$ de glutamina (Lab. Microvet), 100 U/ml de penicilina (Lab. Microvet), 100 mg/ml de estreptomicina (Lab. Microvet) y 10% de suero fetal bovino (Natocor) inactivado por calor. De manera similar, las células H1299 se cultivaron con RPMI y las células HMEC-1 con DMEM alta glucosa, ambos suplementados de la misma forma. Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufas a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Durante todos los cultivos celulares, se realizaron controles periódicos de la morfología celular, así como un control estricto de los pasajes (5-10 pasajes) y de la tasa de crecimiento. Además, todas las líneas celulares se analizaron para descartar la presencia de contaminación por micoplasma mediante ensayo de PCR.

3.2.2. Cultivos primarios derivados de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica humana se obtuvieron de donantes sanos voluntario y de pacientes con oncológicos del Hospital Interzonal General de Agudos Dr. Abraham F. Piñeyro y la Clínica Centro, ambos de la ciudad de Junín, Bs. As., Argentina. Las muestras se obtuvieron previa firma de consentimiento informado y con la aprobación previa del proyecto por parte del Comité Institucional de Evaluación del Hospital Austral (CIE N° 17-006). El consentimiento informado se encuentra en concordancia con la Declaración de Helsinki, de acuerdo con recomendaciones internacionales.

Para aislar las células mononucleares de sangre periférica se realizó un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) con una densidad de 1,078 g/ml recomendado para aislar células mononucleares de sangre periférica. Seguidamente, para enriquecer en células monocíticas se realizó un gradiente de Percoll (GE Healthcare) que presenta una densidad de 1,130 g/ml. Luego, las células fueron plaqueadas sin suero en una multi-placa de 12 pocillos por 2 horas para remover las células no adherentes, tales como linfocitos. Se dejaron estabilizar los cultivos 16 horas en RPMI suplementado a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Luego, se reemplazó el medio por RPMI sin suero y se realizaron los tratamientos correspondientes por 24 horas. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes y las células para ser utilizados en los diferentes experimentos.

3.2.3. Muestras de pacientes oncológicos.

El estudio se realizó en colaboración con el departamento de cirugía del Hospital Interzonal General de Agudos "Abraham Piñeyro" (HIGA) y de la Clínica Centro e incluye hombres y mujeres de más de 18 años. Para realizar el análisis se seleccionaron ocho muestras de pacientes con

carcinoma mamario y nueve con carcinoma colorrectal. Como se mencionó en el ítem anterior, los pacientes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Evaluación del Hospital Austral (CIE N° 17-006). Se recibieron tres tipos de muestras: i) tejido tumoral descartado en el momento de la cirugía, ii) tejido adyacente al tumor y iii) sangre periférica. En cuanto a las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente, si bien provienen del mismo individuo, fueron consideradas independientes ya que el comportamiento estadístico de una no se ve afectado por los valores de la otra. Las muestras de tejidos fueron recolectadas en el quirófano y evaluada por patólogos. Ninguno de los pacientes con carcinoma colorrectal recibió tratamiento, mientras que dos pacientes con carcinoma mamario recibieron terapia, 8 y 25 años atrás, para otra enfermedad, y fueron re-estratificados para este nuevo tumor. Aquellos pacientes con un estadio tumoral avanzado fueron excluidos del estudio. El diagnóstico histopatológico para los pacientes fue carcinoma mamario invasivo de ningún tipo especial (NTS, por sus siglas en inglés: *invasive carcinoma of no special type*). El sistema de estadificación clínico TNM fue determinado por los médicos del centro de salud u hospital de donde provinieron las muestras (**Tabla 2**).

Características de los pacientes		Carcinoma mamario	Carcinoma colorrectal
Número de pacientes		8	9
Edad promedio \pm DS, años		61,3 \pm 12,4	67,4 \pm 10,3
Género, Masculino/Femenino		0/8	6/3
Quimioterapia		1	0
Radioterapia		1	0
Tamaño del tumor	T1	1	0
	T2	6	0
	T3	1	4
	T4	0	2
	No definido	0	3
Estado del ganglio linfático	N0	2	3
	N1	2	0
	N3	1	0
	No definido	2	3
Metástasis		M0	M0

Tabla 2. Información de los pacientes con carcinoma mamario o colorrectal. T0, T1, T2, T3, T4: Se refiere al tamaño y/o extensión del tumor principal. En cuanto más grande es el número después de la T, mayor es el tumor o más ha crecido en los tejidos cercanos. N0, N1, N2, N3: Se refiere al número y ubicación de los ganglios linfáticos que tienen cáncer. En cuanto más grande es el número después de la N, más son los ganglios linfáticos que tienen cáncer. M0: El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

3.3. PREPARACIÓN DE LISADOS Y MEDIOS CONDICIONADOS TUMORALES

Cultivos confluentes de MDA-MB-231, LoVo o H1299 fueron cultivados en medio sin suero por 6 horas, luego se realizó un cambio de medio también sin suero para poder recolectar las suspensiones celulares ($1,2 \times 10^6$ células/ml) y los medios condicionados. Las suspensiones celulares fueron sometidas a 5 ciclos de frezado/descongelado para realizar un lisado celular. Para eliminar debris celulares grandes, los lisados fueron centrifugados a 300 rpm por 10 min, el sobrenadante fue recolectado y filtrado utilizando un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. Para preparar lisados derivados de tejidos tumorales y tejidos adyacentes al tumor, se siguió el mismo protocolo, pero previamente se realizó una ruptura mecánica de los tejidos con homogeneizador automático.

La cantidad proteica tanto de los lisados como de los medios condicionados fue determinada mediante el ensayo de Bradford (91). Los lisados y medios condicionados fueron alicuotados y guardados en -80°C hasta su uso.

3.4. ENSAYO DE VIABILIDAD POR MTS

Para evaluar la viabilidad celular luego de realizados los distintos tratamientos, se utilizó el reactivo de MTS tetrazolium. El método se basa en la reducción de MTS compuesto de tetrazolio por células viables para generar formazan, producto que es soluble en medios de cultivo celular. Esta conversión se lleva a cabo por las enzimas deshidrogenasa dependientes de NAD (P) H en células metabólicamente activas, lo que permite diferenciar de células muertas

Se procedió según las indicaciones del kit descritas por el fabricante (Abcam, ab197010). Brevemente, las células (1×10^3) se colocaron en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 horas para que se adhieran o estabilicen. Luego, se realizaron los tratamientos con AH o AHs en distintas concentraciones: 20, 100 y $1000 \mu\text{g/ml}$, durante 24 horas. Cuatro horas antes de finalizar el tratamiento se trataron con el reactivo MTS y se incubó para posteriormente medir la absorbancia a 450 nm.

3.5. CALCULO DE IC50

En algunos casos, mediante este ensayo se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC50, de su sigla en inglés: *half maximal inhibitory concentration*), que se refiere a la concentración de AHs necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad celular *in vitro*. Para ello, se realizaron tratamientos con distintas concentraciones de AHs más el control basal sin tratamiento y se realizó el ensayo

de viabilidad de MTS descrito en la sección anterior 4.4. Luego, estos resultados se analizaron para calcular la IC50 con el software Prism (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

3.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para medir citotoxicidad de los distintos tratamientos de AHs se utilizó el ensayo de citotoxicidad LDH (ab65391, Abcam). Para ello se plaquearon 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas para que se adhieran o estabilicen y luego se realizaron los tratamientos antes mencionados en el ensayo de MTS. Por cada tratamiento se realizaron triplicados y los siguientes controles: control de fondo que solo contenía medio de cultivo sin células; control basal; y control positivo máximo al que se le agregó Tritón X-100. Luego, se continuaron de acuerdo con las instrucciones brindadas por el fabricante.

3.7. ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR ANEXINA V E IODURO DE PROPIDIO.

Para analizar si los tratamientos ejercían un efecto apoptótico sobre células tumorales, se utilizó el ensayo de detección de apoptosis basado en la utilización de anexina V-APC y Ioduro de Propidio (ImmunoTools). Para ello, 5×10^5 células fueron tratadas como se mencionó anteriormente, y se siguieron las instrucciones brindadas por el fabricante. Como control positivo se indujo apoptosis y necrosis con paraformaldehído 4% y como control de autofluorescencia se utilizaron células sin ningún tratamiento. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACS Canto II luego de realizar los respectivos controles de compensación, finalmente los datos se evaluaron posteriormente con el software FlowJo (LLC) para obtener el % de células apoptóticas.

3.8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se midió la proliferación celular mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada para evaluar la acción de los tratamientos con AHs sobre los distintos tipos celulares utilizados. Esta estrategia se basa en utilizar un nucleósido radioactivo, 3H-timidina, el cual es incorporado en las nuevas hebras de ADN durante la división mitótica. Para ello se 2×10^4 células en cada pocillo de una placa de 96, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas para que se adhieran y luego se realizaron los tratamientos correspondientes. A las 6 hs antes de que finalice el estímulo se trataron a las células con 3H-timidina (0,8 µCi/well) y se continuó su incubación a

37°C con 5% de CO₂. Luego, se cosecharon las células utilizando el equipo MicroBeta FilterMate-96 (PerkinElmer, Inc) y la radioactividad en el ADN de las células se midió utilizando un contador de centelleo (BeckmanLS 6500).

3.9. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMOROSFERAS

Este tipo de ensayo se utiliza normalmente para investigar el rol de las interacciones de las células tumorales con la MEC a través del crecimiento de esferas 3D (92). De esta manera, es posible simular en un ensayo *in vitro* la disposición de la MEC de una forma similar a la observada en tumores *in vivo* (93). Como se muestra en la **Fig. 10**, se utilizaron $1,2 \times 10^4$ células MDA-MB-231, LoVo o H1299 colocadas en 30 μ l de medio completo junto con AHs 1 o 3 en una concentración de 100 μ g/ml. Posteriormente, se las colocó en la parte superior de una placa de cultivo con PBS en su interior para prevenir el efecto de la evaporación. Las células crecieron en forma invertida y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo durante 10 días, y una vez finalizado dicho tiempo, se tomaron varias micrografías de cada condición y se analizaron utilizando el software ImageJ 1.50b.

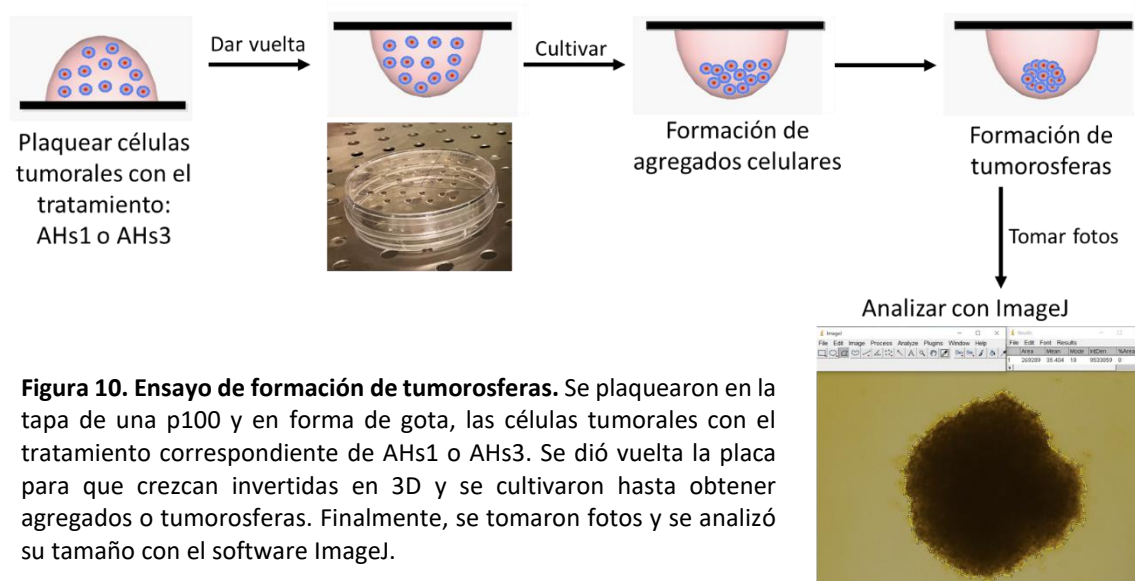


Figura 10. Ensayo de formación de tumorosferas. Se plaquearon en la tapa de una p100 y en forma de gota, las células tumorales con el tratamiento correspondiente de AHs1 o AHs3. Se dió vuelta la placa para que crezcan invertidas en 3D y se cultivaron hasta obtener agregados o tumorosferas. Finalmente, se tomaron fotos y se analizó su tamaño con el software ImageJ.

3.10. ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se utilizó la técnica de citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de marcadores de superficie de Mo/MØ. Una vez finalizados los tratamientos, 1×10^6 células fueron incubadas con PBS-1% BSA por 45 minutos para bloquear receptores Fc y luego fueron marcadas por 30 min a 4°C con diferentes anticuerpos: anti-CD14, anti-CMH-II (G46-6), anti-CD80 (L307.4)

y anti-CD206 (todos de BD Biosciences). Finalmente, las células se lavaron con PBS-1% BSA y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (LLC). Se realizó un “gate” en la región de los monocitos CD14 positivos y se analizó la co-expresión de los marcadores para inmunocaracterizar a los Mo/MØ.

3.11. ELISA

Se midieron los niveles de distintos factores bioactivos y citoquinas mediante kits comerciales de ELISA a partir de los medios condicionados de Mo/MØ tratados con AH o AHs. Se analizaron los niveles proteicos de VEGF (DY293B, DuoSet R&D System), TGF-β1 total (436707, Legend Max, BioLegend), TGF-β1 activo (437707, Legend Max, BioLegend) e IL-1 β (DY201-05, R&D Systems). Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones brindadas por cada fabricante. Se detectó la absorbancia utilizando el lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

3.12. ENSAYO TIPO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Debido a que una fracción del AH sintetizado en la membrana plasmática puede ser secretado y no quedar anclado a la célula, se decidió evaluar la concentración de AH en los sobrenadantes de las células tratadas tanto tumorales como monocíticas. Para realizar dicha técnica se sigue una estrategia de ELISA tipo “*sándwich*” en la cual se utiliza una proteína específica de unión a AH (HABP) para cubrir una placa de 96 pocillos. Luego se sembraron las muestras y posteriormente se le adicionó la misma proteína HABP en su forma biotinilada para luego determinar la concentración de AH a través de la detección colorimétrica de la actividad de la enzima peroxidasa utilizando el lector de absorbancia de placas iMark™ (Bio-Rad).

3.13. ENSAYO DE EXCLUSIÓN DE PARTÍCULAS

Para analizar el efecto de los tratamientos con los AHs sobre los componentes de la MEC, se realizó un ensayo de exclusión de partículas. Este ensayo se utiliza para visualizar el área pericelular que está compuesto principalmente por ácido hialurónico. De esta forma, el ensayo permite detectar el hialurónico pericelular, aprovechando sus característica de encapsulamiento de la célula y, en este caso, bloqueando partículas pequeñas y exógenas como los glóbulos rojos (94). Brevemente, las células MDA-MB-231, LoVo o H1299 se colocaron en una placa de 12 pocillos en baja densidad (3×10^4). Después de 24 horas, se realizaron los tratamientos y se realizaron controles con enzima HYAL activa e inactivada por calor. Cuando se completaron los tratamientos, se realizó un lavado con PBS y se agregaron glóbulos rojos fijados (2×10^7) a cada pocillo, para dejarlos decantar en estufa durante 30 minutos. Posteriormente, para visualizar el área pericelular compuesto principalmente por hialurónico que es capaz de excluir los glóbulos

rojos se obtuvieron varias imágenes de cada condición y se analizaron utilizando el software ImageJ 1.50b.

3.14. RT-qPCR

Luego de haber finalizado cada tratamiento, se extrajo el ARN total utilizando el reactivo TriReagent (Molecular Research Center, Inc.) para evaluar la expresión de distintos genes que se enumeran más abajo (Tabla 2). La cantidad de ARN obtenido y la integridad del mismo se evaluaron mediante espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 260-280 nm en un instrumento Picodrop®. La síntesis de la cadena complementaria de ADN copia (ADNc) se realizó mediante PCR en Transcriptasa Reversa (RT-PCR) empleando un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con 200 U de Transcriptasa Reversa MMLV (Promega) y 2,5 pmol/μl de primer Oligo dT (GenBiotech). Los ADNc se sometieron luego a PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando la estrategia de detección con FastStart SYBR Green Master Mix (Roche) y 200 nM de cada cebador específico (Invitrogen) para: VEGF, FGF-2, IL-8, CD44, TLR4 y RHAMM (**Tabla 3**). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 90 segundos a 94°C y luego 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Se utilizó el método de normalización relativa (del inglés: normalized relative quantities (NRQ)) (95) respecto de un gen de referencia: enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (**Tabla 3**). Para ello se realizaron los siguientes cálculos:

$$RQ_{GOI} = Ef^{\Delta Cq_{RQ}}$$

$$RQ_{RG} = Ef^{\Delta Cq_{RG}}$$

$$NRQ_{GOI} = RQ_{GOI} / RQ_{RG}$$

RQ_{GOI} = cantidad relativa del gen de interés

RQ_{RG} = cantidad relativa del gen de referencia

NR = cantidad relativa normalizada del gen de interés

Ef = eficiencia

Cq = número de ciclos en el que la fluorescencia empieza a ser detectada.

Gen	Secuencia del primer forward (5'-3')	Secuencia del primer reverse (5'-3')
VEGF	CTCCTCCACCATGCCAAGT	GCAGTAGCTGCGCTGATAGA
FGF-2	CCTGGCTATGAAGGAAGATGG	TCGTTTCAGTGCCACATAACC
IL-8	AAGGAAAACCTGGGTGCAGAG	GGCATCTTCACTGATTCTTGG
CD44	GTGATGGCACCCGCTATG	ACTGTCTTCGTCTGGGATGG
TLR4	TGAGCAGTCGTGCTGGTATC	CAGGGCTTTTCTTGAGTCGTC
RHAMM	TGGAAAAGATGGAAGCAAGG	CCAGTGTAGCATTATTTGCAGAG
GAPDH	GGGGCTGCCAGAACATCAT	GCCTGCTCACCACTTCTTG

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para evaluar la expresión de cada gen.

3.15. WESTERN BLOT

Después de cada tratamiento se conservaron los medios condicionados y se midió la concentración proteica utilizando el método de Bradford. Posteriormente, cantidades iguales de proteína se resolvieron mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario RAH-1 (anti-TSG-6), el cual fue donado por el Dr. Anthony Day (University of Manchester, UK). Luego se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplados a peroxidasa durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se detectó la reacción de quimioluminiscencia utilizando una solución de peróxido estable y luminol mejorada. Las imágenes se obtuvieron con un analizador de imagen mini bioluminiscente ImageQuant 4000 (GE HealthCare LifeSciences) y se analizaron densitométricamente utilizando el software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, EE. UU.).

3.16. ANÁLISIS DE BASES DE DATOS

Se usaron bases de datos públicas de microarrays en ratones ambas pertenecientes a NCBI GEO (96): GSE18404 (97) (carcinoma mamario) y GSE67953 (98) (carcinoma colorrectal), para comparar la expresión diferencial de TSG-6 en TAMs y en MO de bazo. Para analizar el ARNm de TSG-6 en cada base de datos se utilizó la herramienta NCBI GEO2R: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>.

3.17. ZIMOGRFÍA DE GELATINA

La actividad de las metaloproteinasas se determinó por Zimografía de gelatina en sobrenadantes de Mo/MØ (99). Los sobrenadantes se corrieron en un gel de poliacrilamida 10% con 0.1% de gelatina (Sigma-Aldrich). Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con buffer de lavado

(Tris-ClH 50 mM pH 7.5, Triton X-100 2,5%) durante 30 min, buffer de renaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Triton X-100 2,5%, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 mM) durante 30 min y con buffer gelatinasa (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Triton X-100 2,5%, CaCl₂ 10 mM, NaCl 200 mM) durante. El gel fue teñido con Azul Brillante Coomassie R-250 por 30 min a temperatura ambiente. La actividad de gelatinasa se visualizó con una tinción negativa; las imágenes del gel se obtuvieron con un analizador de imágenes ImageQuant LAS 4000 mini y se analizaron densitométricamente utilizando el software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, EE. UU.).

3.18. ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS

La migración o quimiotaxis celular in vitro se realizó utilizando una cámara modificada de Boyden (Neuroprobe, Inc.) (**Fig. 11 A**). Se colocaron los medios condicionados, provenientes de los Mo/MØ o de las células tumorales, en la parte inferior de la cámara mientras que en la parte superior se colocaron $1,5 \times 10^3$ células migrantes (HMEC-1 o Mo/MØ) por pocillo (**Fig. 11 B**). Para los controles negativos las células migrantes fueron expuestas a DMEM o RPMI sin SFB, y para el control positivo se utilizó medio con SFB al 10%. Se incubó por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Las células adheridas a la parte inferior de la membrana fueron fijadas en 1% paraformaldehído y los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich) (**Fig. 11 B**). Se capturaron 3 imágenes

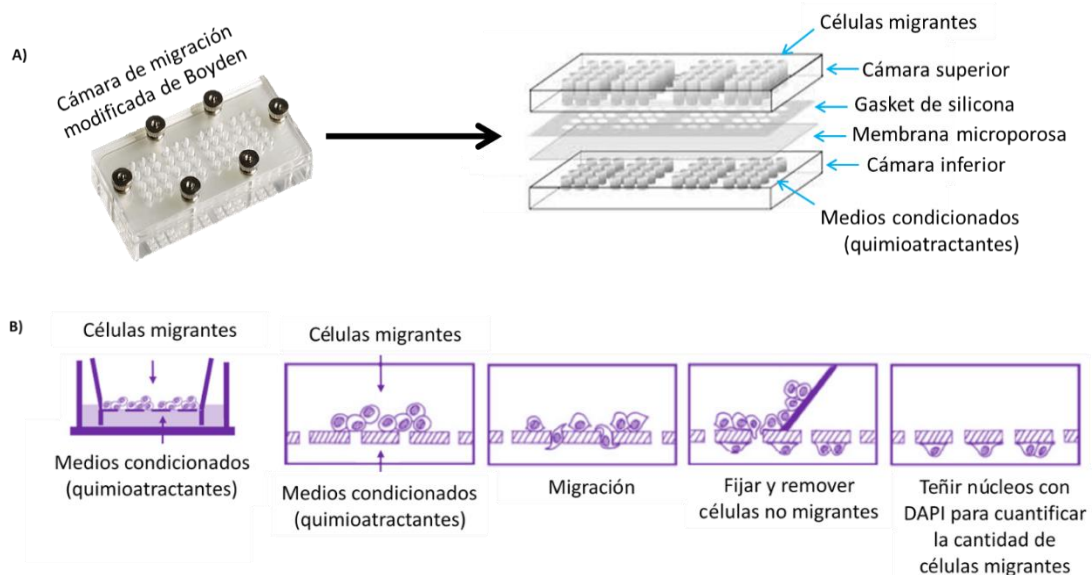


Figura 11. Ensayo de migración de células. La cámara modificada de Boyden consta de un dispositivo inferior en el que se coloca el medio condicionado o quimioattractante separado por una membrana porosa del dispositivo superior en el que se colocan las células. Las células con capacidad de migrar en respuesta al quimioattractante atravesarán los poros situándose de esta manera en la cara inferior de la membrana.

representativas por pocillo usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 y fueron analizadas utilizando el software CellProfiler (www.cellprofiler.com).

3.19. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Las células tumorales MDA-MB-231, LoVo o H1299 fueron inoculadas subcutáneamente a una dosis de 1×10^7 células/animal en el flanco derecho de ratones Nu/Nu de 4-6 semanas de edad. Luego de evaluar el crecimiento tumoral, a los 10 días los tumores con un volumen similar se inocularon con Mo/MØ de dadores sanos tratados o no con AH (BPM o APM) o AHs. Se midieron los tamaños de los tumores 3 veces en la semana. El tamaño se calculó midiendo con un calibre automático el diámetro menor (d) y el diámetro mayor (D) del tumor, y luego se utilizó la siguiente fórmula para obtener el volumen en mm^3 : $V = D \times d^2 \times 0,52$. Después de 30 días o al alcanzar un tamaño 500 mm^3 , los animales fueron sacrificados, se extrajeron los tumores, se fijaron en formalina al 4% y se incluyeron en parafina. Con un micrótopo se cortaron secciones de $3 \mu\text{m}$, las cuales se desparafinaron con Xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol para luego realizar las tinciones que se explicarán en los siguientes ítems.

3.20. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina para el respectivo análisis histológico. Mediante esta tinción se observó la arquitectura general del tejido tumoral y las zonas necróticas (100).

3.21. TINCIÓN CON GSL I PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Los cortes histológicos del ítem 3.19 se tiñeron con $20 \mu\text{g/ml}$ de lectina I proveniente de Griffonia simplicifolia (Bandeiraea) marcada con fluoresceína (GSL I, Vector Laboratories), la cual se une específicamente a células endoteliales murinas (101), y con DAPI ($0,3 \mu\text{g/ml}$) para detectar los núcleos. Las micrografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, EE. UU.).

3.22. TINCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE AH Y TSG-6

Para detectar AH, se incubaron los cortes histológicos con HABP biotinilada y con avidina-FITC. La detección de TSG-6 se realizó incubando con el anticuerpo RAH-1 mencionado anteriormente

y con su respectivo anticuerpo secundario conjugado con PE. Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, EE. UU.).

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

4. RESULTADOS

4.1. PARTE I: EFECTO DEL AH SOBRE MO/MØ EN UN CONTEXTO TUMORAL

En esta primera parte se evaluó la acción de AH nativo de distinto peso molecular, alto y bajo, sobre Mo/MØ en un contexto tumoral para cumplir el primer y segundo objetivo.

4.1.1. MODELO *IN VITRO* CON MO/MØ DE DADORES SANOS

Primero, se utilizaron Mo/MØ de dadores sanos y se los incubó con AH BPM o APM y lisado celular (LC) o medio condicionado (MC) derivados de líneas celulares de cáncer de mama y carcinoma colorrectal, MDA-MB- 231 y LoVo respectivamente (**Fig. 12**). De esta manera se evaluó la acción de AH sobre Mo/MØ considerando factores tumorales.

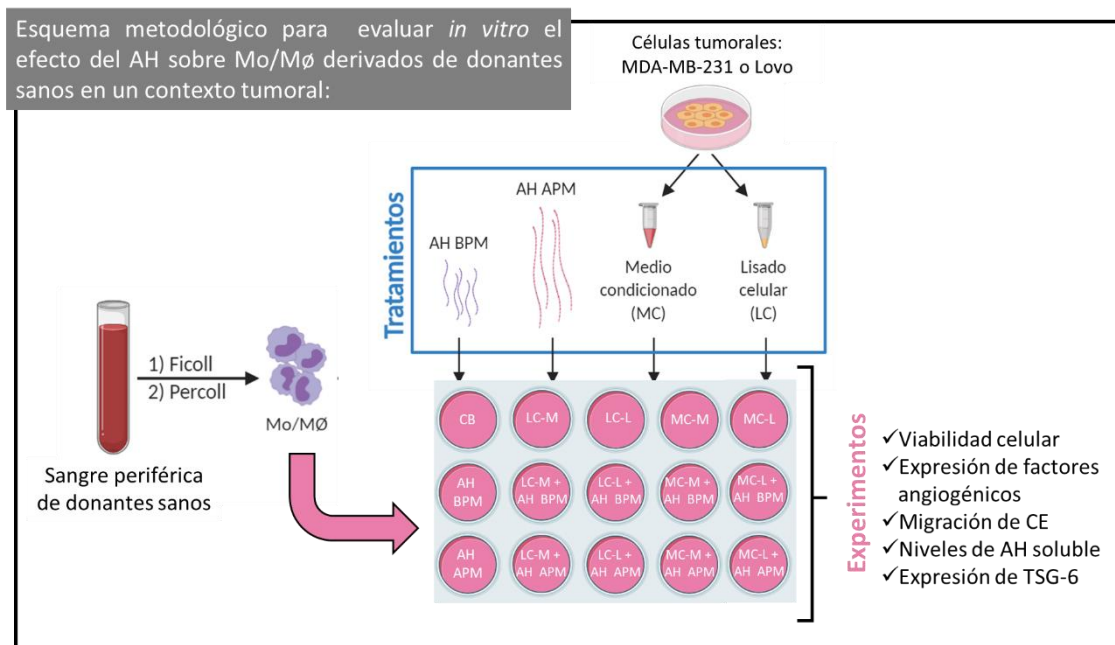


Figura 12. Diseño experimental para evaluar *in vitro* el efecto del AH sobre Mo/MØ derivados en un contexto de cáncer de mama o colorrectal. Brevemente, se purificaron las células monocíticas de sangre periférica derivado de donantes sanos y se trataron con medios condicionados o lisados celulares en conjunto con AH BPM o APM. Las células y sobrenadantes se utilizaron para realizar los experimentos cuyos resultados se describen en esta sección.

4.1.1.1. Viabilidad y modulación del fenotipo

Primero, se evaluaron distintas concentraciones proteicas del LC y MC derivados de las líneas celulares para descartar que estos inhiban la viabilidad de los Mo/MØ (**Fig. 13**). Se utilizaron 100, 200 y 400 µg/ml de lisado celular y se observó que la concentración de 200 µg/ml, en ambos

tipos tumorales, era la máxima concentración testada que no inducía una disminución en la viabilidad de las células Mo/MØ (Fig. 13A).

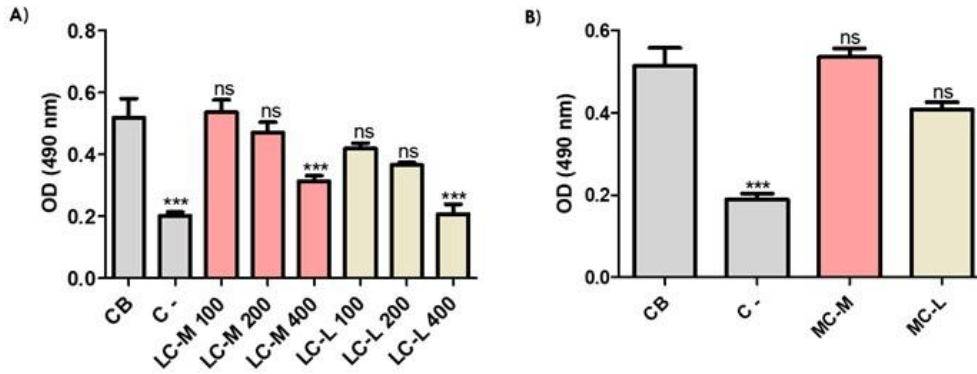


Figura 13. Viabilidad celular de Mo/MØ en presencia de factores tumorales (LT o MC). A) Efecto de los (LC) en diferentes concentraciones (100, 200 y 400 ug/ml) de células MDA-MB-231 o LoVo. B) Efecto de los medios condicionados de MDA-MB-231 o LoVo. ns = no significativo, (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). C- = control negativo con Tritón x100. CB = control basal, sin tratamiento. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231; OD: densidad óptica.

Una vez determinada la concentración a utilizar se continuo con la caracterización fenotípica de los Mo/MØ derivados de sangre periférica y para ello se analizaron mediante citometría distintos marcadores de superficie: CD14, CMH II, CD80 y CD206. Se realizó un “gate” de los monocitos mediante una expresión positiva de CD14. En promedio, un 80% de las células en cultivo expresaron este marcador, indicando una homogeneidad alta del cultivo y de su linaje monocítico. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cambio de expresión de los marcadores analizados luego de los tratamientos. El AH (APM o BPM) y los factores derivados de células tumorales (LC o MC) no fueron capaces de modular la expresión de estas moléculas en estas condiciones experimentales (Fig. 14).

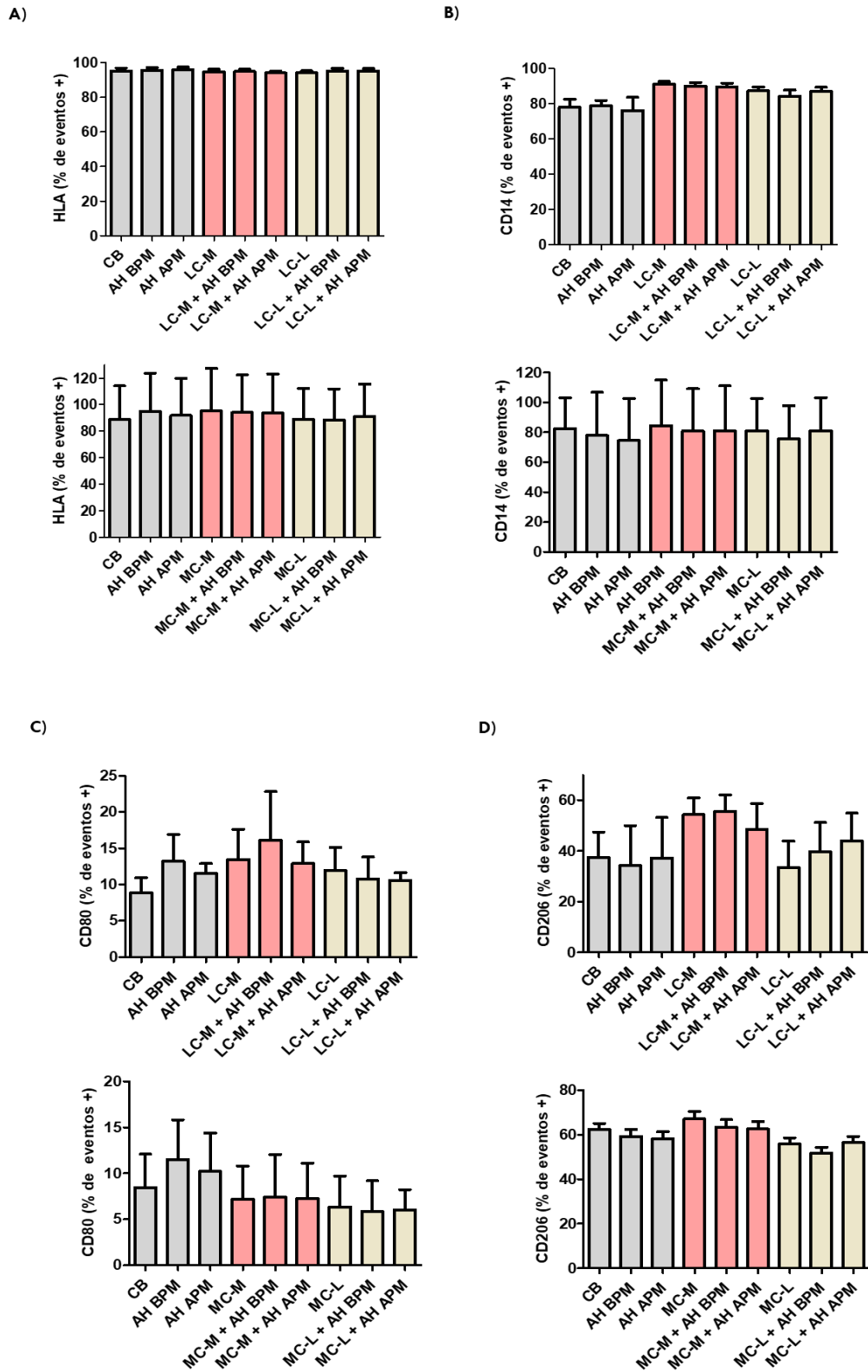


Figura 14. Caracterización de Mo/MØ por citometría de flujo. Los Mo/MØ cultivados con los distintos tratamientos, fueron marcados con anticuerpos contra (A) CMH II, (B) CD14, (C) CD80 y (D) CD206. Se hizo un gate en la población de Mo/MØ y se analizó la expresión de estos marcadores. En el panel superior se encuentran los tratamientos con lisados celulares de las líneas tumorales y en el panel inferior los tratamientos con medios condicionados de células tumorales. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231

4.1.1.2. Niveles de expresión de factores angiogénicos

Como se mencionó anteriormente, una de las acciones más importantes de los TAMs en el entorno tumoral es contribuir a la vascularización mediante la liberación de distintos factores angiogénicos entre los que se incluyen VEGF, FGF-2 e IL-8. Por lo tanto, se analizó la expresión de estos factores para evaluar el efecto del AH (APM o BPM) en Mo/MØ tratados con LC o MC de células de cáncer de mama MDA-MB-231 o cáncer colorrectal LoVo. Observamos que los Mo/MØ tratados con LC o MC de MDA-MB-231 en conjunto con AH APM aumentaron los niveles de expresión del principal factor angiogénico VEGF (NRQ: $3,769 \pm 0,9416$; NRQ: $3,216 \pm 0,06561$; respectivamente) (Fig. 10 A-B), así como la expresión de otras moléculas proangiogénicas: IL-8 (NRQ: $5,761 \pm 1,461$; NRQ: $10,61 \pm 0,4400$; respectivamente) (Fig 10 C-D) y FGF-2 (NRQ: $2,972 \pm 0,8020$; NRQ: $4,150 \pm 0,2656$; respectivamente) (Fig. 15 E-F). En cambio, los Mo/MØ tratados con AH APM o BPM en un contexto colorrectal (LoVo) no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión de dichos factores (Fig. 15). Estos resultados indican que el AH APM es capaz de aumentar los factores angiogénicos en Mo/MØ en un contexto de cáncer de mama.

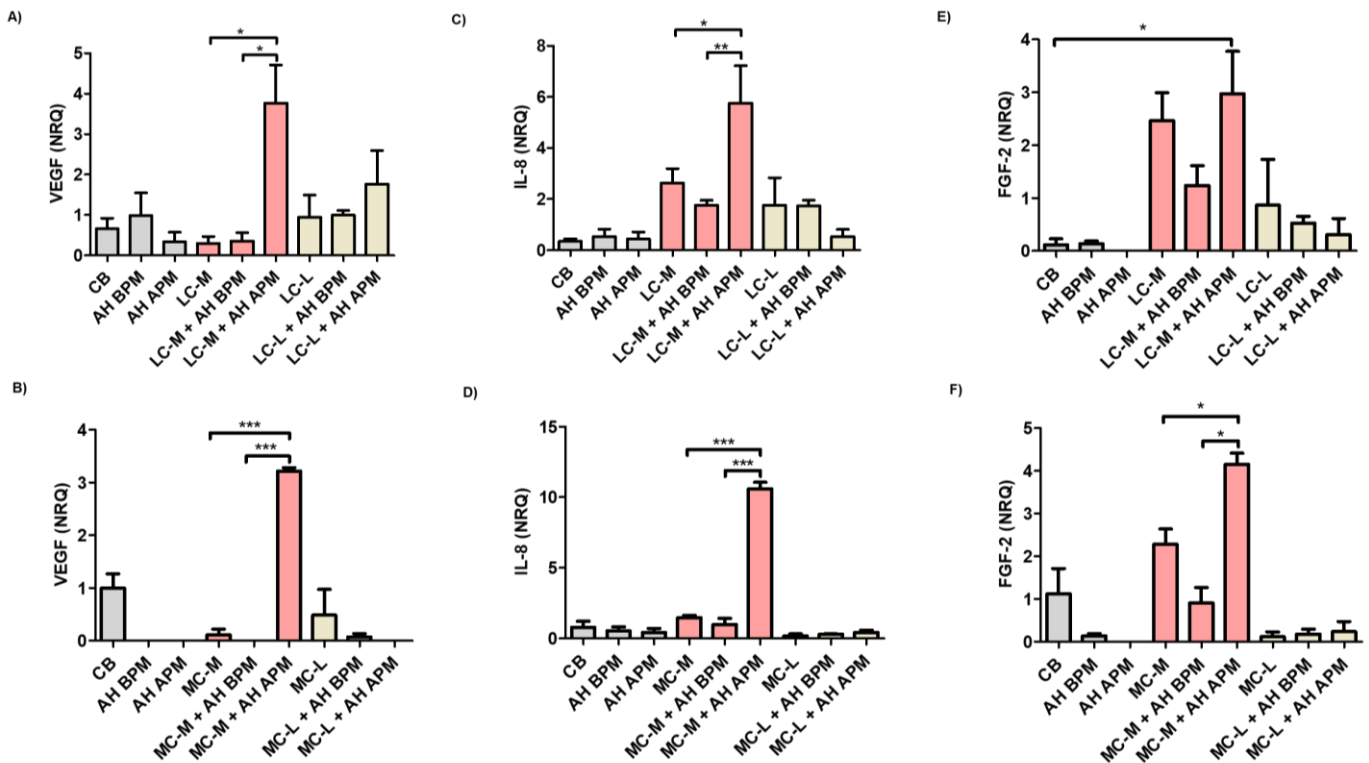


Figura 15. Niveles de expresión de factores angiogénicos. Se midieron los niveles de expresión por RT-qPCR de (A y B) VEGF, (C y D) IL-8 y (E y F) FGF-2. En el panel superior se encuentran los tratamientos con lisados celulares (LC) de las líneas tumorales y en el panel inferior los tratamientos con medios condicionados (MC) de células tumorales. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231.

4.1.1.3. Niveles de expresión y actividad de MMPs

En el contexto del tumor, los Mo/MØ expresan MMP-2 y MMP-9 dos metaloproteinasas de matriz cuya actividad proteolítica estimula la degradación de la matriz extracelular y la biodisponibilidad de factores angiogénicos (102). Por lo tanto, se analizó la actividad de MMPs por zimografía de gelatina como otro mecanismo pro-angiogénico que puede ser regulado por AH. El análisis de los zimogramas reveló que la actividad de MMP-9 no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de AH en ambos contextos tumorales (**Fig. 16 A**). Sin embargo, el tratamiento con LC de MDA-MB-231 más AH APM incrementó la actividad de MMP-2 (fc: $5,685 \pm 0,2162$) en comparación con el control basal (fc: $1,0 \pm 0,0$) (**Fig. 16 C**). Aún más, para corroborar estos resultados se analizaron los niveles de expresión de ARNm de MMP-9 y MMP-2. En concordancia con los resultados de la zimografía, los niveles de ARNm de MMP-9 no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (**Fig. 16 B**) mientras que los niveles de MMP-2 aumentaron significativamente con el tratamiento de LC de MDA-MB-231 y AH APM (NRQ: $3,752 \pm 0,2242$) en comparación con el tratamiento de LC de MDA-MB-231 solo (NRQ: $0,1272 \pm 0,06667$) (**Fig. 16 D**). Los Mo/MØ tratados con los MC tanto de MDA-MB-231 como de LoVo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de AH (**Fig. 16 E-H**).

4.1.1.4. Migración de células endoteliales

Se prosigió a analizar la capacidad migratoria de CE hacia los sobrenadantes de los Mo/MØ tratados, como una forma de evaluar *in vitro* la modulación de las CE involucradas en la formación de vasos sanguíneos. Se observó una mayor migración de CE hacia los sobrenadantes de los Mo/MØ tratados con LC de MDA-MB-231 y AH APM (índice de migración: $6,830 \pm 1,465$) en comparación con el LC de MDA-MB-231 solo (índice de migración: $3,523 \pm 0,5100$) o con AH BPM (índice de migración: $1,380 \pm 0,2287$) (**Fig. 17**). Sin embargo, los sobrenadantes de los Mo/MØ tratados con LC de LoVo no mostraron diferencias significativas en los niveles de migración de CE (**Fig. 17**).

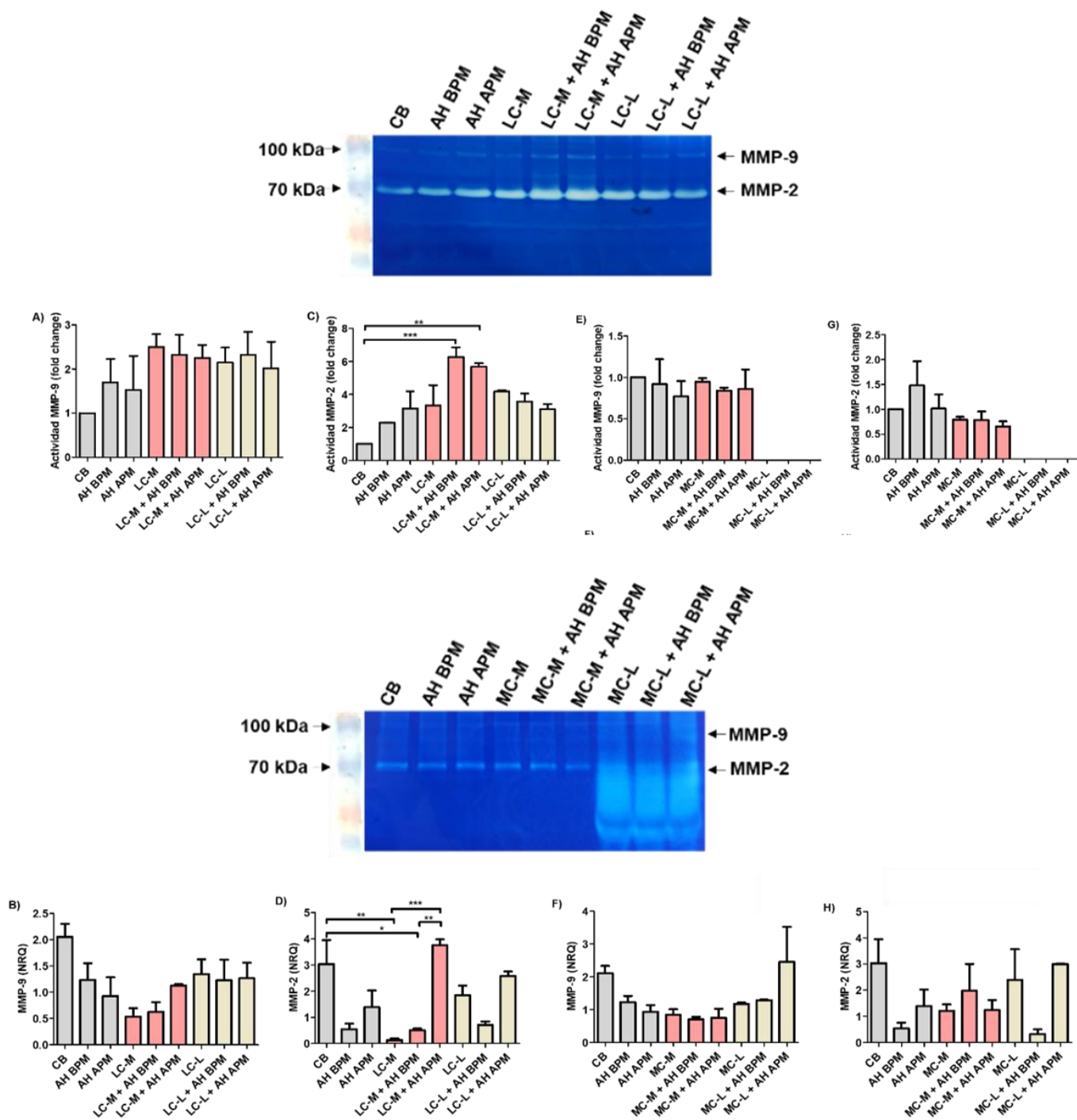


Figura 16. Niveles de expresión y actividad de MMPs. La actividad de MMPs se analizó por zimografía de gelatina (A, C, E y G). Los niveles de expresión de MMPs se evaluó por RT-qPCR (B, D, F y H). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231; fc: fold change.

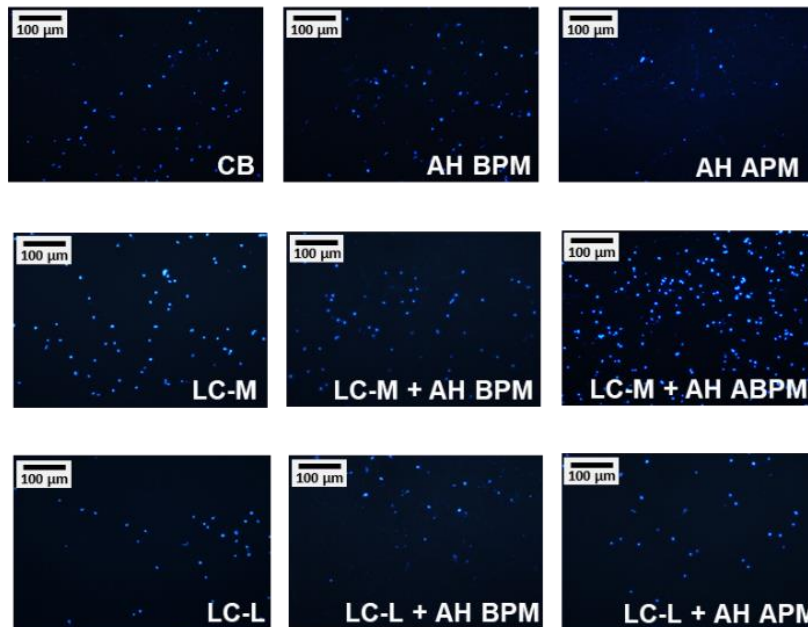
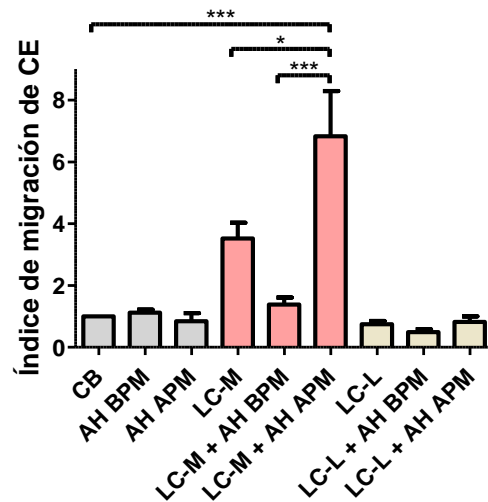


Figura 17. Niveles de migración de células endoteliales hacia sobrenadantes de Mo/MØ tratados con AH y LC. Los resultados se expresaron como índice de migración de células respecto al control basal. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231; CE: células endoteliales.

4.1.1.5. Expresión de receptores de AH

Como se mencionó en secciones anteriores, el AH induce la señalización celular mediante distintos receptores, como CD44, TLR4 y RHAMM. Como estos receptores están involucrados en las respuestas de los Mo/MØ, se examinaron sus niveles de expresión en los distintos tratamientos con LC o MC tumoral con o sin AH. El tratamiento con LC de MDA-MB-231 y AH APM disminuyó los niveles de CD44 (NRQ: $0,5866 \pm 0,05340$) (**Fig. 18 A**) y TLR4 (NRQ: $0,4602 \pm 0,1234$) (**Fig. 18 C**), en comparación con el tratamiento de LC de MDA-MB-231 sin AH (CD44 NRQ:

1,126 ± 0,1413; TLR4 NRQ: 2,043 ± 0,4256). Los niveles de RHAMM no fueron modulados por este tratamiento en forma significativa (**Fig. 18 E**). En el caso del tratamiento con MC de MDA-MB-231 y AH APM, mostró una disminución de los niveles de TLR-4 (NRQ: 0,7250 ± 0,01500) en comparación con el tratamiento con MC de MDA-MB-231 solo (NRQ: 1,635 ± 0,03500), pero no modificó la expresión de CD44 y RHAMM. Mientras que cuando se analizó la expresión de los receptores con los tratamientos con LC o MC de LoVo, no se observaron diferencias significativas en ausencia o presencia de AH APM o BPM.

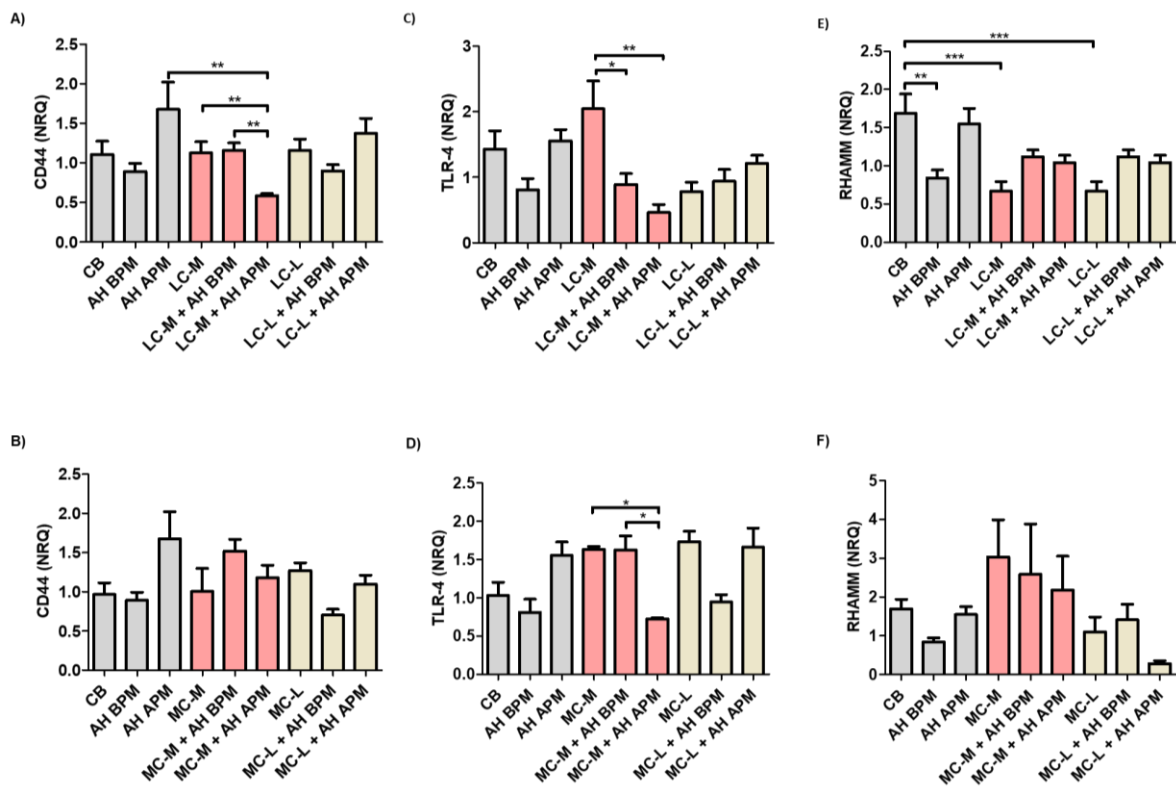


Figura 18. Niveles de expresión de receptores de AH. Niveles de expresión medidos por RT-qPCR de (A y B) CD44, (C y D) TLR-4 y (E y F) RHAMM; medidos en Mo/Mφ tratados con AH y LC (arriba) o MC (abajo). (*) p < 0,05, (**) p < 0,01 and (***) p < 0,001. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231.

4.1.1.6. Expresión proteica de TSG-6

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se podría pensar que los Mo/Mφ producen diferencialmente algún tipo de factor, y relacionado con la acción de AH, cuando son estimulados con AH APM en un contexto de cáncer de mama, pero no colorrectal. Por lo tanto decidimos evaluar la expresión de TSG-6, una proteína de unión de AH que modula su función en procesos inflamatorios (103, 104). Primero, se decidió buscar en bases de datos si los macrófagos expresaban TSG-6 y si se observaban diferencias entre los TAMs y los macrófagos

aislados de bazo. Para ello se utilizó la herramienta GEO2R, con la cual se realizó una búsqueda de los niveles de mRNA en macrófagos en dos bases de datos: carcinoma mamario (GSE18404) y colorrectal (GSE67953). Se observó expresión de TSG-6 en ambas bases de datos, sin embargo, no se observaron diferencias en su expresión entre los TAMs y los macrófagos de bazo (**Fig. 19**).

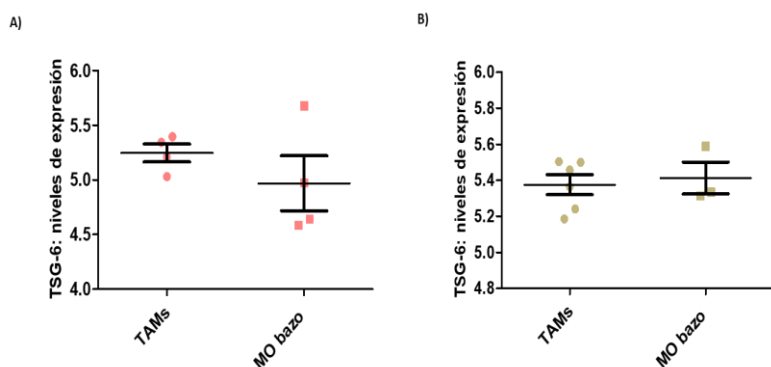


Figura 19. Niveles de mRNA en bases de datos. Se utilizaron dos bases de datos de microarreglos para comparar los niveles de expresión de TSG-6 en TAMs y en MO de bazo. Se utilizó la herramienta NCBI GEO2R.

Luego, se analizaron por western blot los niveles de TSG-6 en los sobrenadantes de Mo/MØ tratados con MC o LC y AH APM o BPM. Se detectaron dos especies: i) ~35 kDa corresponde a la especie a TSG-6 libre y ii) ~120 kDa que corresponde al complejo generado por TSG-6 y las cadenas pesadas de IαI (HC) como fue descrito por otros autores (105). Se observó una disminución en los niveles de la especie de 120 kDa en los sobrenadantes de Mo/MØ tratados con LC de MDA-MB-231 y AH APM (UA: 4,650 ± 0,3180) en comparación con LC de MDA-MB-231 sin AH (UA: 10,69 ± 1,297) (**Fig. 20 A**). Lo mismo ocurrió con el tratamiento con LC de LoVo y AH APM (UA: 3,813 ± 0,6749) en comparación con LC de LoVo sin AH (UA: 11,56 ± 1,054) (**Fig. 20 A**).

También se evaluaron los niveles de TSG-6 en los sobrenadantes de Mo/MØ tratados con MC de MDA-MB-231 y MC de LoVo (**Fig. 20 B**). El tratamiento con MC de MDA-MB-231 y AH APM (UA: 9,755 ± 0,07500) aumentó los niveles de TSG-6 libre en comparación con el tratamiento MC de MDA-MB-231 sin AH (UA: 4,675 ± 0,3850). Mientras que, ese mismo tratamiento MC de MDA-MB-231 junto con AH APM (UA: 5,347 ± 1,509) disminuyó los niveles de la especie de ~120 kDa en comparación con el tratamiento de MC de MDA-MB-231 sin AH (UA: 17,46 ± 2,211) (**Fig. 20 B**). En cuanto a los tratamientos con MC de LoVo no mostraron diferencias significativas.

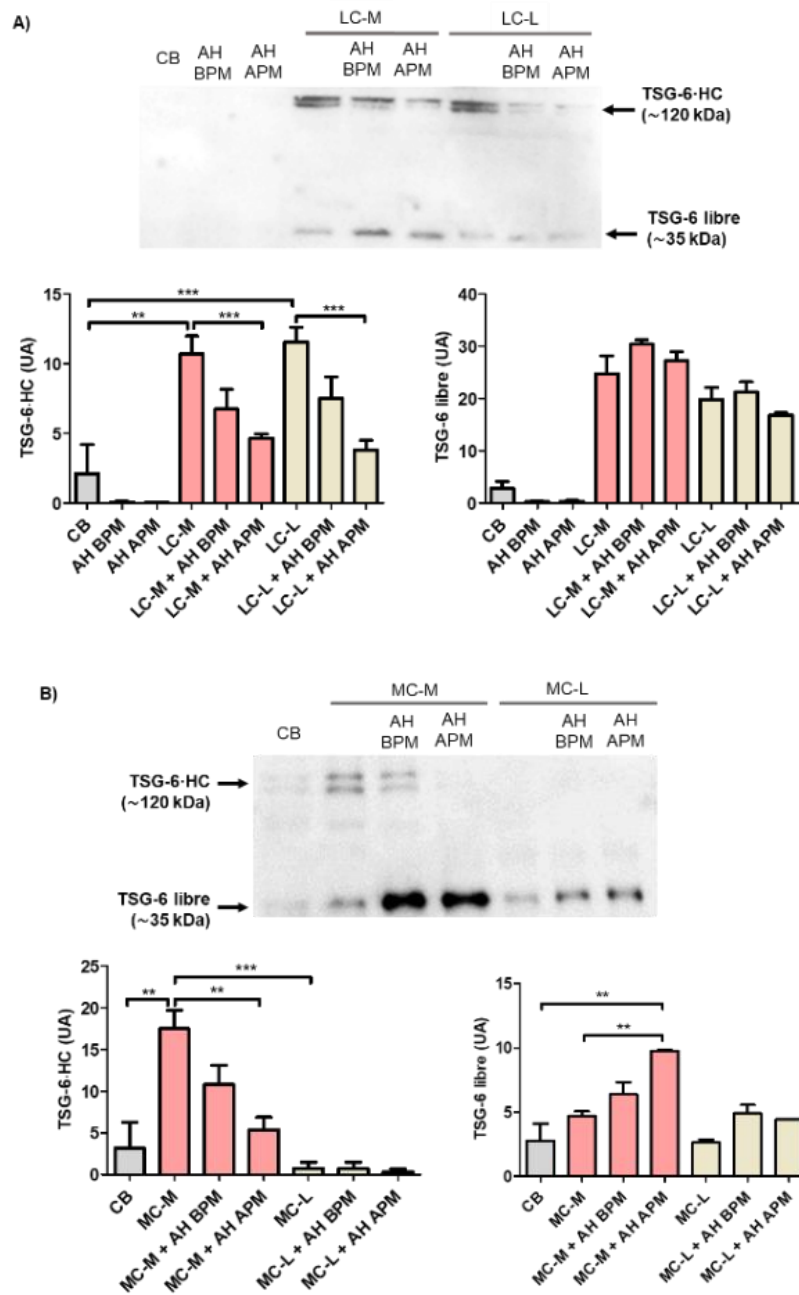


Figura 20. Niveles proteicos de TSG-6 en Mo/MØ tratados. Los niveles de TSG-6 fueron medidos por western blot en el sobrenadante de Mo/MØ tratados con LC (A) o MC (B) en conjunto con AH (BPM o APM). Se pudieron detectar dos especies una de ~120 kDa que corresponde a la unión TSG-6·HC y otra de ~35 kDa que corresponde a TSG-6 libre. Los niveles proteicos se cuantificaron por densitometría. () $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. MC-M: Medio condicionado de MDA-MB-231; MC-L: Medio condicionado de LoVo; LC-L: Lisado celular de LoVo; LC-M: Lisado celular de MDA-MB-231; UA: unidades arbitrarias.**

4.1.2. MODELO *IN VIVO*

Además del análisis de la acción *in vitro* de AH sobre Mo/MØ, como se explicó en la sección materiales y métodos, se realizó un modelo *in vivo* tumoral de cáncer de mama y colorrectal. Se usaron ratones *Nu/Nu* a los cuales se les inoculó Mo/MØ tratados previamente con AH BPM o APM (Fig. 21). El volumen tumoral se midió semanalmente y no se observaron diferencias en el crecimiento tumoral entre grupos al momento de la inoculación de los Mo/MØ. Al día 30 o hasta alcanzar un volumen de 500 mm³, los animales fueron sacrificados para extraer el tumor. Los tumores se fijaron y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para evaluar cambios en la histología tumoral. Las secciones de tejido tumoral de cada modelo y tratamientos presentaron una estructura similar sin área necróticas.

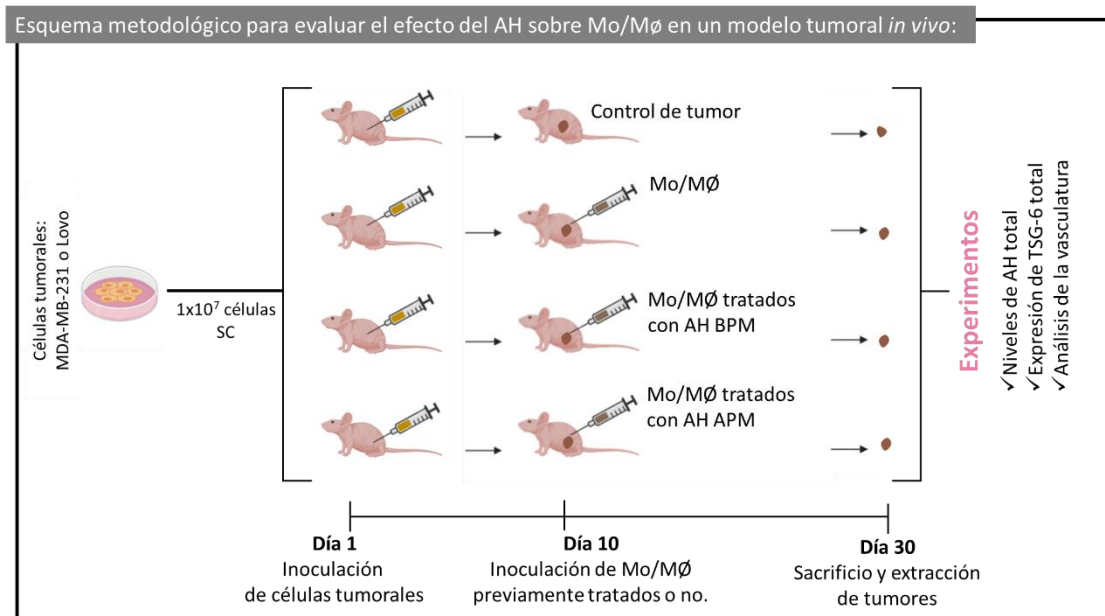


Figura 21. Diseño experimental para evaluar *in vivo* el efecto del AH sobre Mo/MØ. Brevemente, se inocularon 1×10^7 células tumorales (MDA-MB-231 o LoVo) subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. A los 10 días se inoculó intratumoral Mo/MØ derivados de sangre periférica de donantes sanos tratados o no con AH BPM o APM. En el día 30, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se los incluyó en parafina para luego realizar la inmunofluorescencia para detectar los niveles de la vasculatura tumoral, de TSG-6 y de AH.

4.1.2.1. Análisis de la vasculatura tumoral

En las secciones de los tejidos se analizó la vasculatura de los tumores por inmunofluorescencia usando GSL-1-FITC, la cual se une específicamente a células endoteliales. Se observó que, en el modelo de cáncer de mama, los Mo/MØ preincubados con AH APM indujeron un incremento significativo de la vasculatura tumoral (UA: $1,759 \pm 0,1173$) en comparación con aquellos Mo/MØ sin tratamiento (UA: $1,158 \pm 0,1193$) y preincubados con AH BPM (UA: $1,017 \pm 0,07250$)

(Fig. 22 A y C). Aún más, la vasculatura tumoral disminuyó en aquellos animales inoculados con Mo/MØ preincubados con AH BPM (AU: $1,017 \pm 0,07250$) en comparación con el control de tumor (UA: $1,602 \pm 0,1307$) (Fig. 22 A y C). En el caso del modelo de carcinoma colorrectal, no

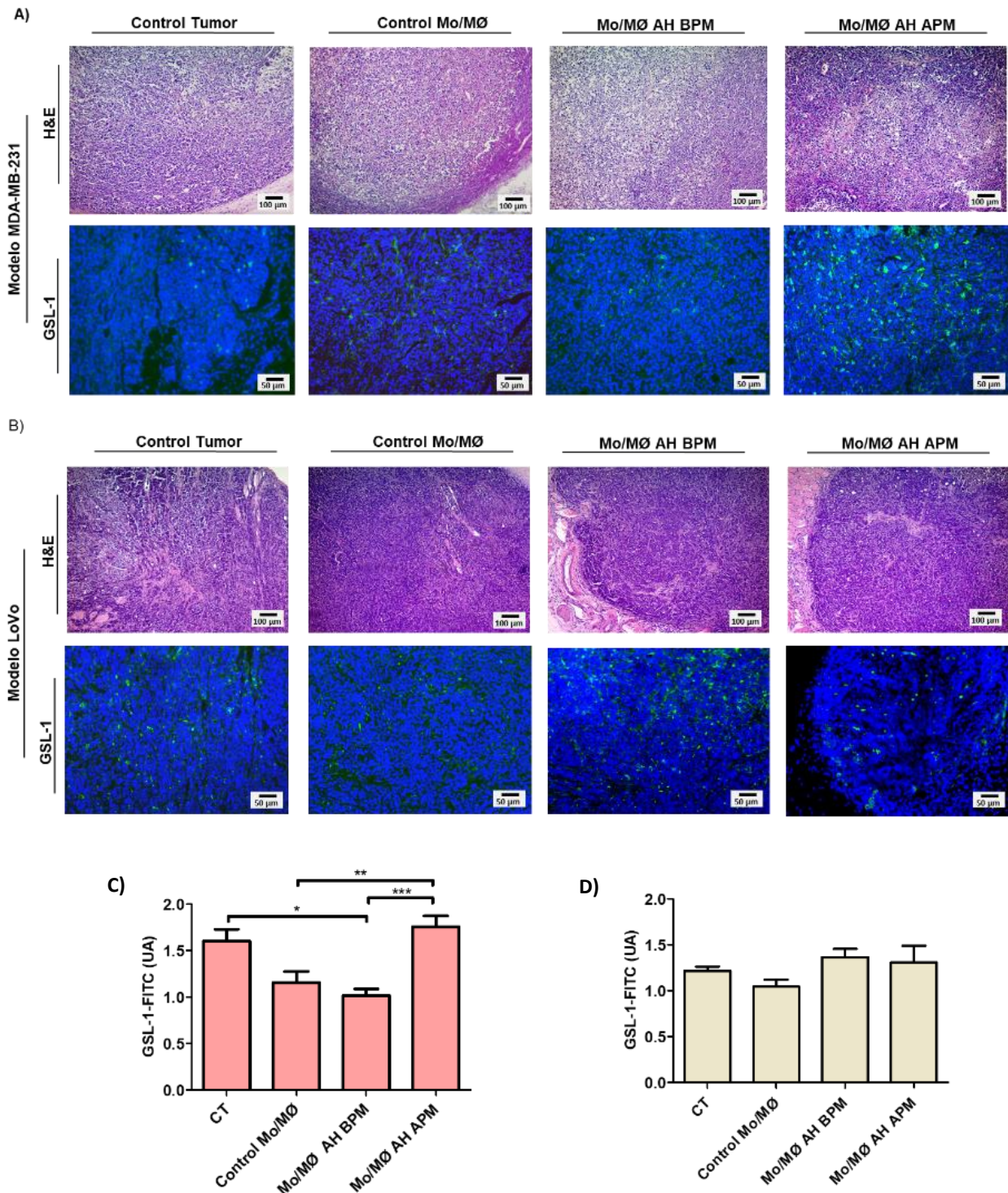


Figura 22. Análisis de la vasculatura tumoral. Se desarrollaron dos modelos tumorales in vivo, inoculando en ratones Nu/Nu células MDA-MB-231 (A) o LoVo (B), a los que luego se les inoculó MO/MØ previamente tratados con AH BPM o APM. Los tumores se fijaron y se tiñeron con GSL-1-FITC que detecta células endoteliales murinas (verde) y DAPI (azul, núcleos). Análisis de la intensidad de fluorescencia de los modelos MDA-MB-231 (C) y LoVo (D) (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. UA: unidades arbitrarias.

se observaron diferencias en los niveles de vasculatura tumoral entre los tratamientos (**Fig. 22 B y D**). Estos datos *in vivo* avalan y están en concordancia con los resultados *in vitro*, en donde el tratamiento de Mo/MØ con AH APM en un contexto de carcinoma mamario aumenta la expresión de factores proangiogénicos y la migración de células endoteliales.

4.1.2.2. Análisis de los niveles de AH y TSG-6 en el tumor

En las secciones de los tumores se analizó también la expresión de TSG-6 y AH por inmunofluorescencia. En el modelo de MDA-MB-231, los ratones inoculados con Mo/MØ sin tratamiento aumentaron los niveles de TSG-6 en comparación con el control de tumor. Aún más, los ratones inoculados con Mo/MØ preincubados con AH APM disminuyeron significativamente la intensidad de fluorescencia de TSG-6 total (UA: $1,820 \pm 0,1436$), en comparación con aquellos inoculados con Mo/MØ sin tratamiento (UA: $3,201 \pm 0,3712$) (**Fig. 23 A**). En contraste, los niveles de TSG-6 en el modelo LoVo no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (**Fig. 23 A**).

Al analizar los niveles de AH endógeno en los tumores, no se encontraron diferencias en el modelo MDA-MB-231 (**Fig. 23 B**). Contrariamente, las secciones tumorales derivadas del modelo LoVo inoculados con Mo/MØ preincubados con HA APM, presentaron un incremento significativo en la cantidad total de AH (UA: $2,872 \pm 0,2153$) en comparación con los demás tratamientos: control de tumor (UA: $1,602 \pm 0,1307$), inoculados con Mo/MØ sin tratamiento (UA: $1,158 \pm 0,1193$) o Mo/MØ con AH BPM (UA: $1,017 \pm 0,07250$) (**Fig. 23 B**).

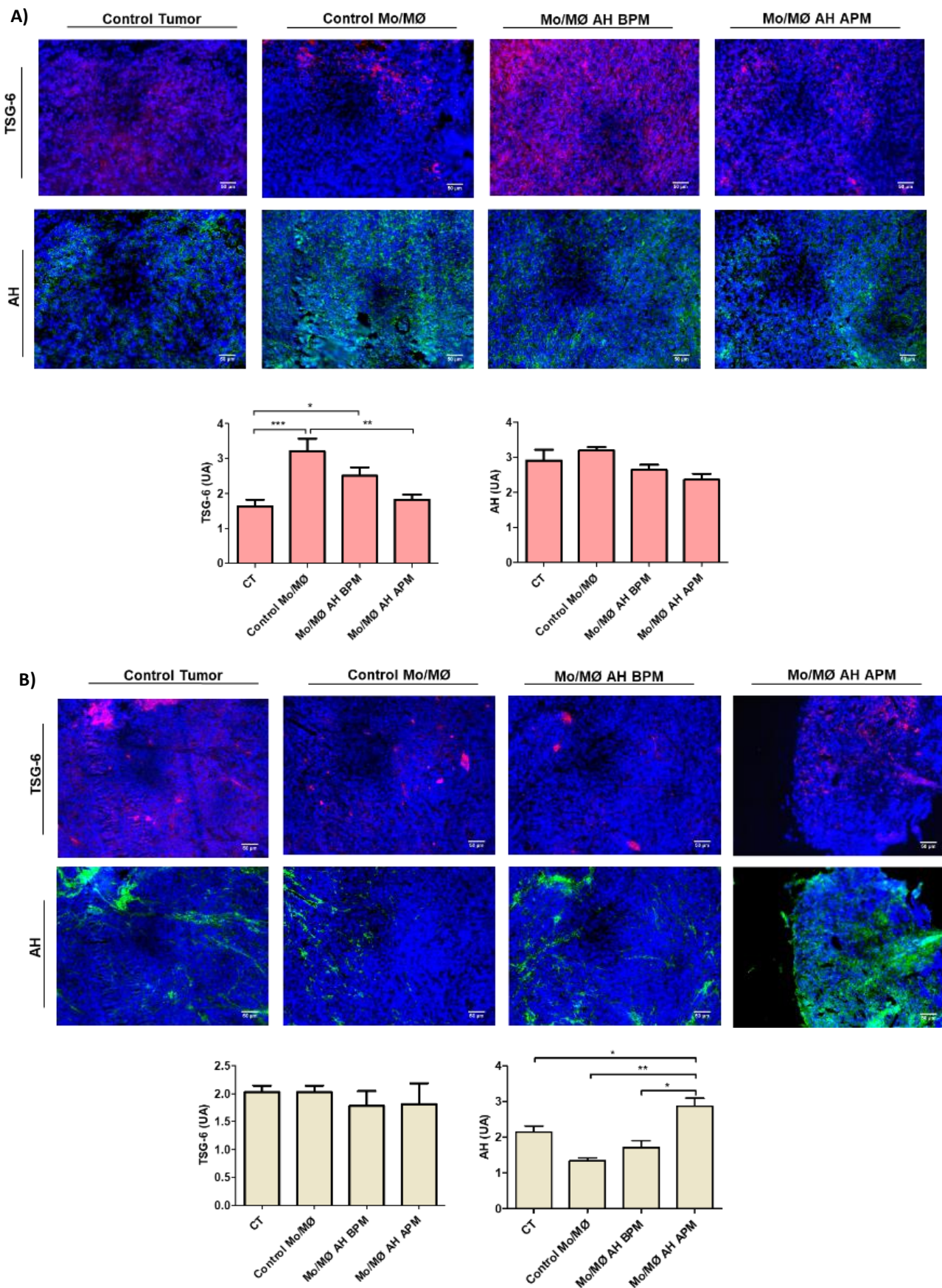


Figura 23. Inmunofluorescencia de TSG-6 y AH en tumores del modelo *in vivo*. (A) Modelo MDA-MB-231, (B) Modelo LoVo. Las secciones tumorales se marcaron con: i) TSG-6 y un anticuerpo secundario conjugado con Texas Red (rojo, TSG-6) y ii) proteína de unión AH biotinilada y estreptavidina-FITC (verde, AH total). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$. UA: unidades arbitrarias.

4.1.3. MODELO *IN VITRO* CON MUESTRAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Considerando que el análisis usando células derivadas de dadores sanos puede no asociarse con el comportamiento en estado de enfermedad y para analizar con mayor profundidad el efecto del AH, se utilizaron Mo/MØ derivados de sangre periférica de pacientes oncológicos. Estas células fueron tratadas con AH BPM o APM y lisados de su propio tumor o de tejido adyacente al tumor (**Fig. 24**). Se utilizaron muestras de sangre periférica, de tumor y de tejido adyacente al tumor de pacientes con carcinoma mamario o colorrectal.

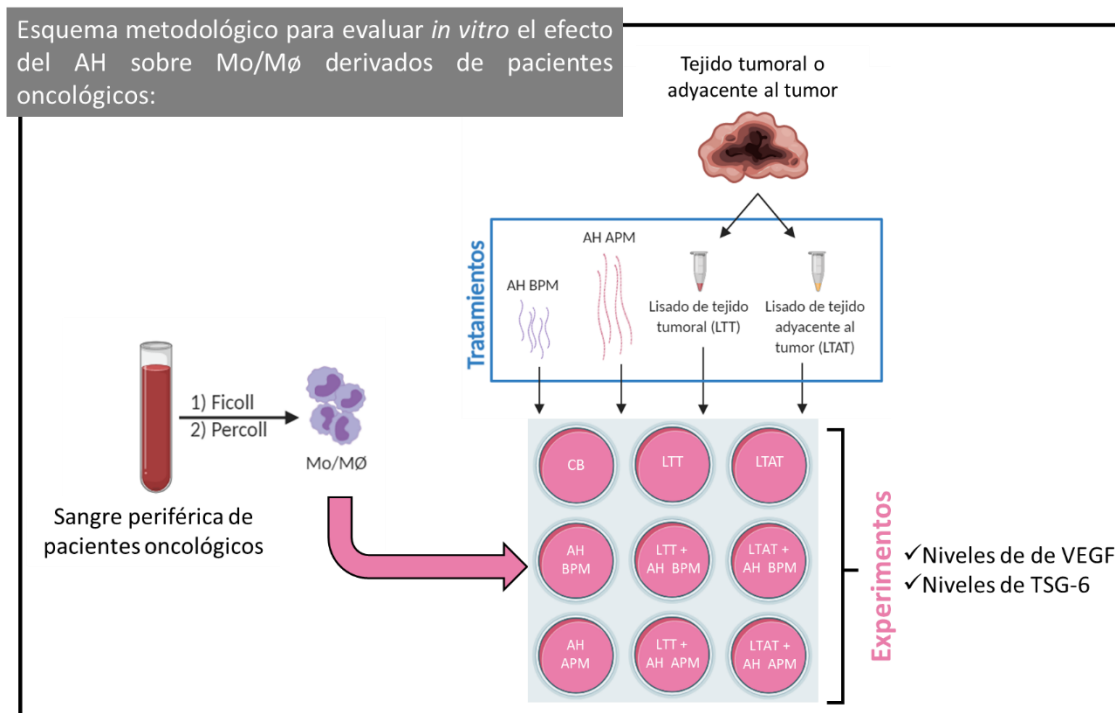


Figura 24. Diseño experimental para evaluar *in vitro* el efecto del AH sobre Mo/MØ derivados de pacientes con cáncer de mama o colorrectal. Brevemente, se purificaron las células monocíticas de sangre periférica derivado de pacientes oncológicos y se trataron con lisados de tejido tumoral o tejido adyacente al tumor en conjunto con AH BPM o APM. Las células y sobrenadantes se utilizaron para realizar los experimentos cuyos resultados se describen a continuación.

Primero se analizaron los niveles de VEGF en los medios condicionados de los Mo/MØ derivados de pacientes oncológicos y se observó un aumento de este factor angiogénico en aquellos tratamientos con lisado de tejido tumoral (LTT) de carcinoma mamario ($580,3 \pm 19,67$ pg/ml) en comparación con el control basal ($386,1 \pm 83,74$ pg/ml); siendo más pronunciado el aumento de VEGF en el tratamiento con AH APM ($605,0 \pm 34,83$ pg/ml) (**Fig 25 A**).

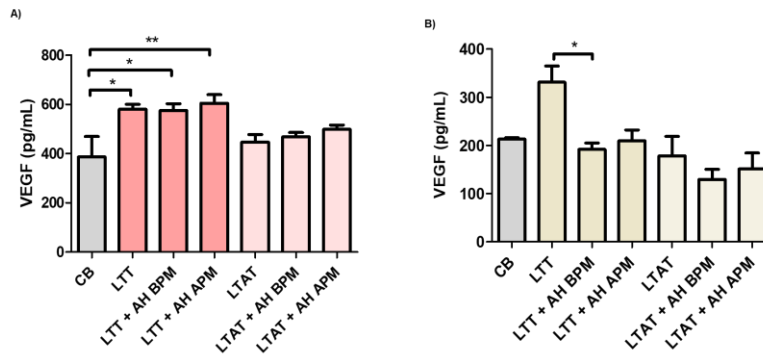


Figura 25. Análisis de la biodisponibilidad de VEGF en sobrenadantes de Mo/MØ derivados de pacientes oncológicos. Los niveles proteicos de VEGF fueron medidos por ensayo de ELISA en sobrenadantes de Mo/MØ derivados de pacientes oncológicos de (A) cáncer de mama y B) colorrectal. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$. LTT: lisado de tejido tumoral; LTAT: lisado de tejido adyacente al tumor.

Luego, en los Mo/MØ aislados de pacientes con cáncer de mama y cultivados *in vitro* para ser tratados con LTT y AH APM se vio un incremento en los niveles de TSG-6 libre (UA: $19,94 \pm 0,7000$) en comparación con el tratamiento de LTT sin AH (UA: $7,485 \pm 2,945$) (**Fig. 26 A**). Mientras que en los Mo/MØ tratados con lisado de tejido adyacente al tumor (LTAT) no se observaron diferencias en los niveles de TSG-6 libre (**Fig. 26 B**). En cuanto a la especie de 120 kDa de TSG-6, se observó una disminución en los tratamientos con LTT y AH APM (UA: $6,215 \pm 1,225$) (**Fig. 26 A**) en comparación con el tratamiento con LTT sin AH (UA: $16,34 \pm 2,895$); sin observarse diferencias en los tratamientos con LTAT (**Fig. 26 B**). Por otro lado, los tratamientos de Mo/MØ derivados de pacientes con cáncer colorrectal no presentaron diferencias significativas (**Fig. 26 A y B**).

Estos resultados con muestras de pacientes oncológicos están en concordancia con los resultados *in vitro* con dadores sanos y con los resultados del modelo *in vivo*.

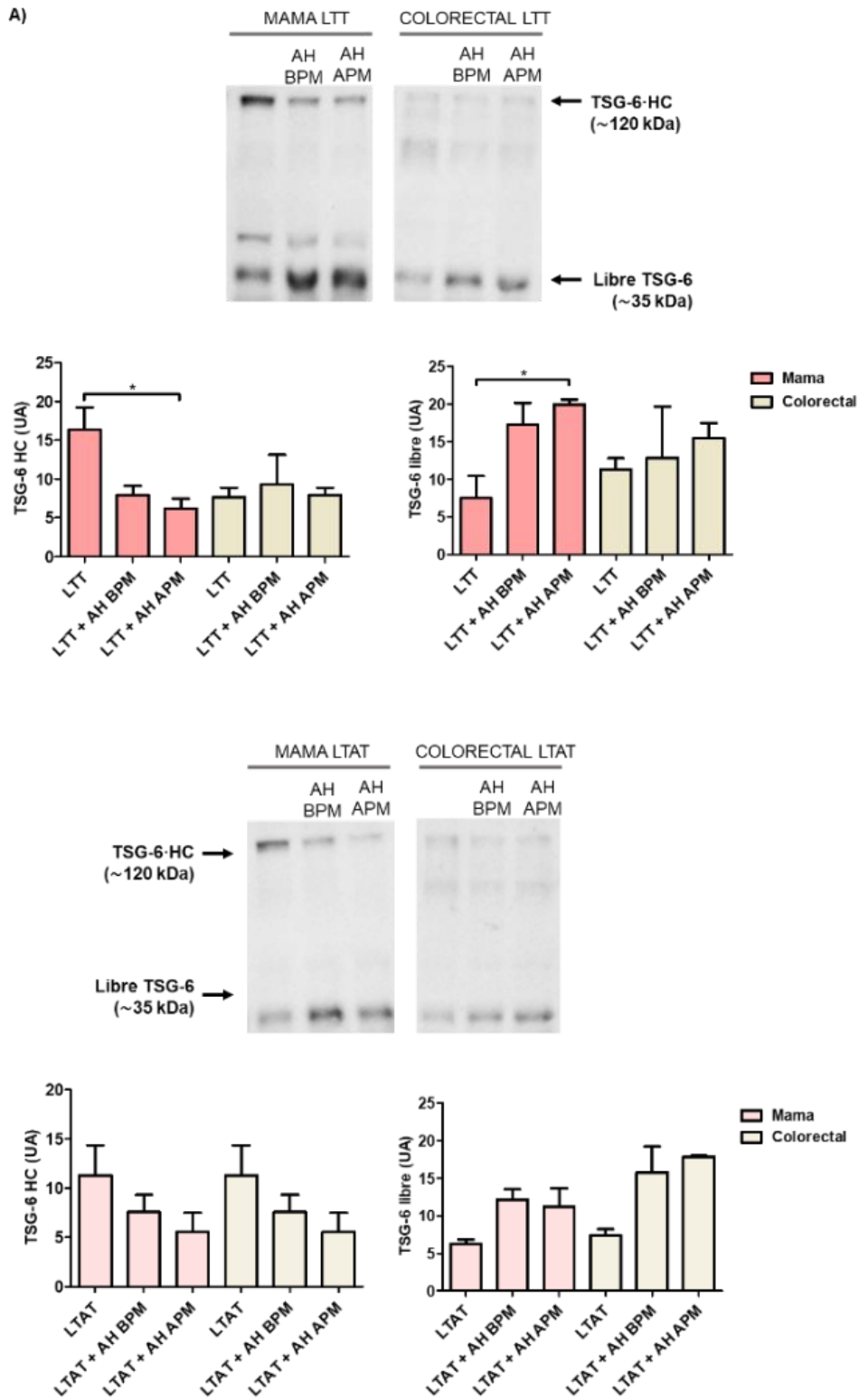


Figura 26. Niveles proteicos de TSG-6 en sobrenadantes de Mo/MØ derivadas de pacientes oncológicos. Se pudieron detectar por western blot dos especies una de ~120 kDa que corresponde a la unión TSG-6·HC y otra de ~35 kDa que corresponde a TSG-6 libre. Los niveles proteicos se cuantificaron por densitometría. (*) $p < 0,05$. LTT: lisado de tejido tumoral; LTAT: lisado de tejido adyacente al tumor. UA: unidades arbitrarias.

4.2. PARTE II: EFECTO DEL AH SULFATADO SOBRE CÉLULAS TUMORALES

En esta segunda parte se evaluó la acción del AHs, con distinto grado de sulfatación parcial y total sobre células tumorales de tal manera de cumplir con el tercer objetivo propuesto. En este objetivo nos propusimos evaluar si estos compuestos presentan acción moduladora tumoral y sobre el entorno inmunológico, representado por Mo/MØ.

Para ello se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama, de pulmón y colorrectal, MDA-MB-231, H1299 y LoVo respectivamente. El diseño experimental se muestra en la **Fig. 27**.

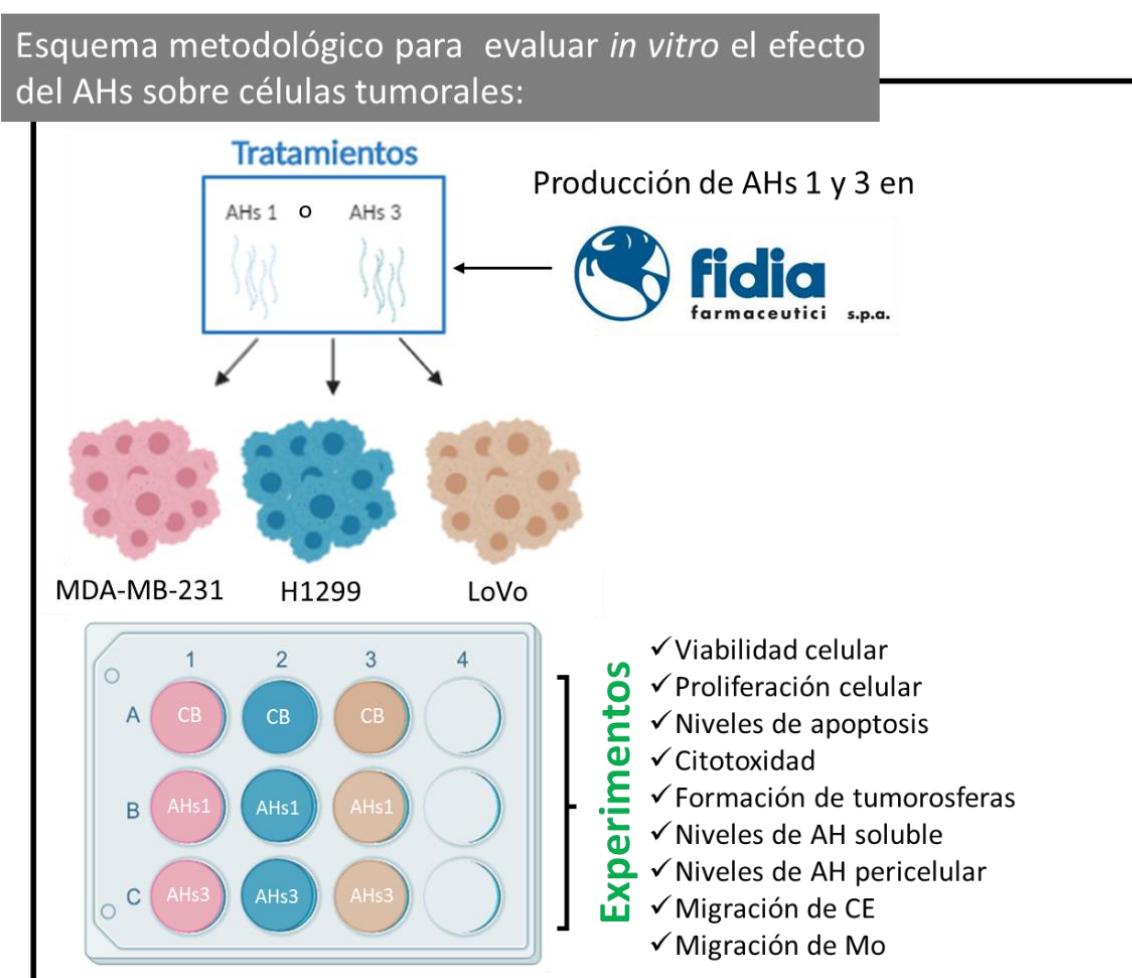


Figura 27. Diseño experimental para evaluar *in vitro* el efecto del AHs en células tumorales. Se utilizaron tres líneas tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231), de cáncer de pulmón (H1299) y de carcinoma colorrectal (LoVo) para evaluar el efecto del AHs parcial y totalmente sulfatado (1 y 3, respectivamente).

4.2.1. Viabilidad

En primer lugar, se analizó mediante el ensayo de MTS la viabilidad de las células tumorales tratadas en concentraciones crecientes de AHs 1 y 3 (0, 20, 100 y 1000 ug/ml); de manera tal de calcular la IC50 para utilizarla como única concentración en los experimentos posteriores. En el

caso de MDA-MB-231 se observó una disminución de la viabilidad con AHs1 en concentraciones de 100 y 1000 ug/ml y AHs3 en todas las concentraciones usadas; y fue posible calcular IC-50 para ambos AHs (Fig. 28 A). Sin embargo, con las líneas celulares H1299 y LoVo, el comportamiento frente a AHs fue diferente. Ambos AHs aumentaron la viabilidad celular y por lo tanto no fue posible calcular la IC50 (Fig. 28 B y C). Solo pudimos observar efecto inhibitorio a una dosis de 1000 ug/ml de AHs3 en H1299 (Fig. 23 B)

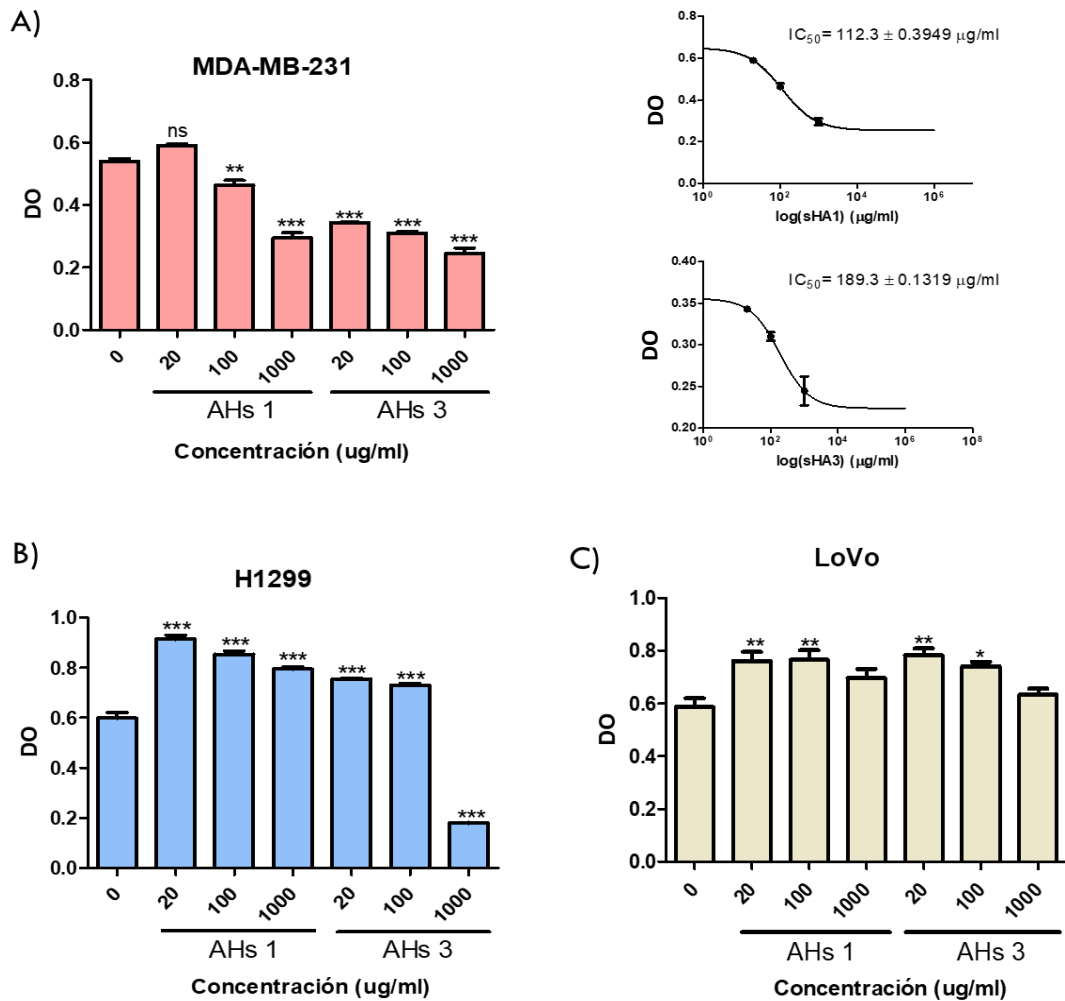


Figura 28. Viabilidad celular y cálculo de IC50 de células tumorales tratadas con AHs. (A) Viabilidad y cálculo de IC₅₀ de los tratamientos con AHs en MDA-MB-231. Viabilidad de células (B) H1299 y (C) LoVo; en estos casos no se pudo calcular IC₅₀ ya que aumentó la viabilidad con respecto al CB. (*) p<0,05, (**) p<0,01 y (***) p<0,001, en comparación con el control basal (CB). DO: densidad óptica.

4.2.2. Citotoxicidad

A continuación, se evaluó el LDH liberado por células dañadas como biomarcador de citotoxicidad celular y citólisis. Observamos que los tratamientos con AHs3 en la mayor dosis testada de 1000 µg/ml indujo en MDA-MB-231 (5,379 ± 0,3935 % de citotoxicidad) y H1299 (6,019±1,673 % de citotoxicidad) un aumento de la citotoxicidad celular en comparación con el

CB ($1,893 \pm 0,7918$ % de citotoxicidad, $1,015 \pm 0,5664$ % de citotoxicidad) (Fig. 29 A y B). Mientras que en LoVo se observó una tendencia a aumentar con ese mismo tratamiento en comparación con el CB (Fig. 29 C). En ninguna de las tres líneas tumorales se observaron diferencias significativas con los tratamientos de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dosis que se utilizará en futuros experimentos como se mencionó en el punto anterior (Fig. 29).

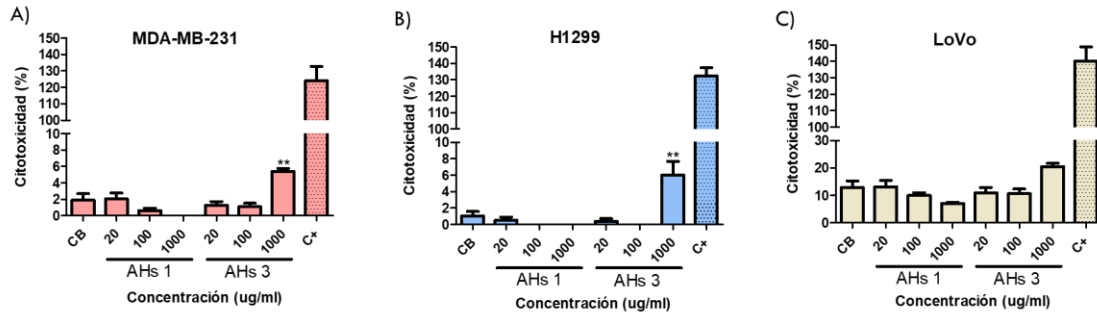


Figura 29. Citotoxicidad de AHs en células tumorales. Se analizó la liberación de LDH como marcador de citotoxicidad en respuesta a los tratamientos con AHs1 o AHs3 en distintas concentraciones. Se evaluó la citotoxicidad de los tratamientos en (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. Como control positivo se utilizó tritón X-100 1% como se indica en el protocolo. (***) $p < 0,01$ en comparación con el control basal (CB).

4.2.3. Apoptosis

También se realizaron ensayos de apoptosis por citometría de flujo para analizar el efecto de los AHs1 y AHs3 sobre las células tumorales. A las tres líneas celulares, MDA-MB-231, H1299 y LoVo, se las trató con AHs1 o AHs3 en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se analizó la apoptosis temprana y tardía. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con los distintos tratamientos en ninguna de las tres líneas (Fig. 30).

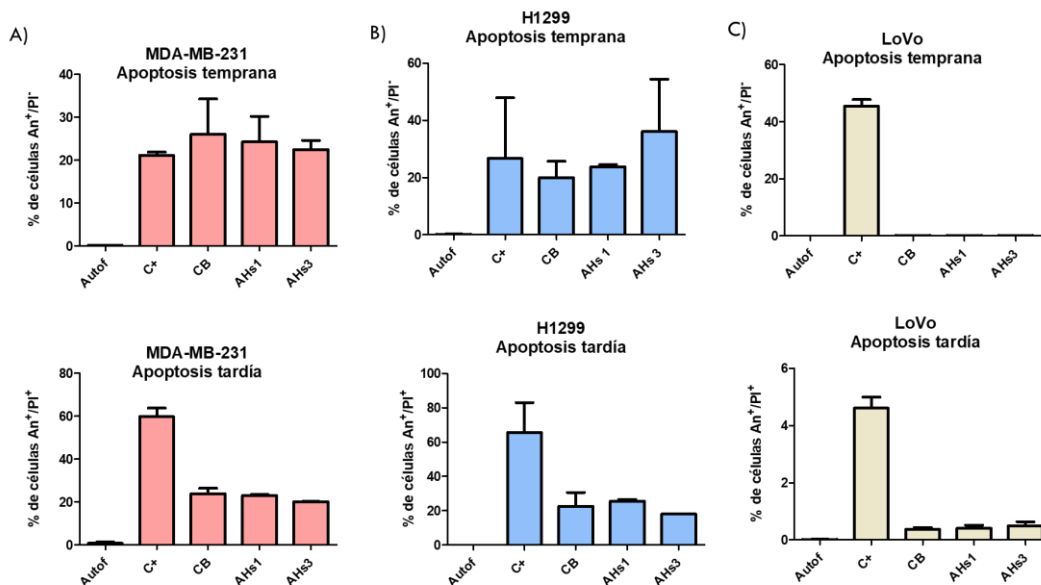


Figura 30. Apoptosis en células tumorales tratadas con AHs. Se analizaron los niveles de liberación de LDH como marcador de citotoxicidad en respuesta a los tratamientos con AHs1 o AHs3 en distintas concentraciones. Se evaluó la citotoxicidad de los tratamientos en (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. (***) $p < 0,01$. An: anexina; PI: ioduro de propidio.

4.2.4. Proliferación

Otro punto importante que se evaluó fue la proliferación celular para lo cual se analizó la incorporación de timidina tritiada a las nuevas hebras de ADN. En MDA-MB-231 no se observó una disminución en la proliferación, a pesar de que si se observó una disminución en la viabilidad celular (**Fig. 31 A**). En cambio, en H1299 y LoVo se observó una disminución en el porcentaje de proliferación celular relativizado al control basal con el tratamiento AHs3 (H1299: $35,74 \pm 13,76\%$; LoVo: $52,89 \pm 7,365\%$) (**Fig. 31 B-C**).

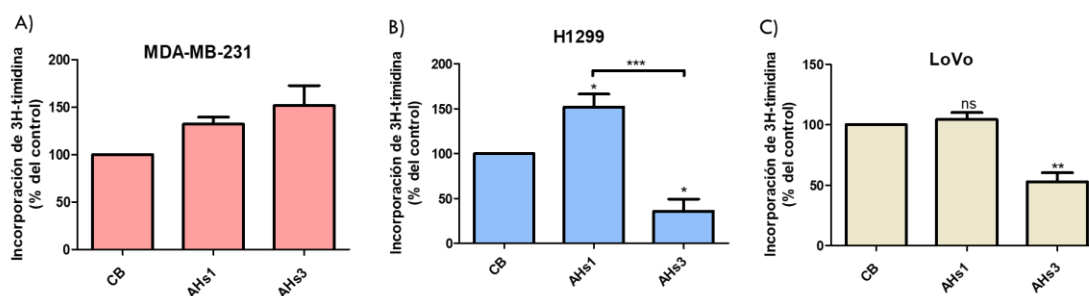


Figura 31. Proliferación de células tumorales tratadas con AHs. Se analizó mediante el ensayo de incorporación de 3H-timidina el efecto del AHs1 y 3 en la dosis de $100 \mu\text{g/ml}$ en la proliferación celular de (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, ns = no significativo, en comparación con el control basal (CB).

4.2.5. Ensayo de exclusión de partículas para la detección de AH pericelular

Con el fin de evaluar la capacidad de las células tumorales de generar una matriz intersticial o pericelular, principalmente formada por AH, se realizó un ensayo de exclusión de partículas, tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Durante este ensayo se pudo observar una disminución relativa en el área pericelular de las células MDA-MB-231 cuando fueron tratadas con AHs1 (UA: $1,742 \pm 0,05959$) y AHs3 (UA: $1,645 \pm 0,07777$) en comparación con el control basal (UA: $2,409 \pm 0,1183$) (**Fig. 32 A**). Mientras que en las células H1299 y LoVo se observó una disminución solo con el tratamiento AHs3 (H1299 UA: $1,568 \pm 0,04941$; LoVo UAs: $1,441 \pm 0,04873$) en comparación con el control basal (H1299 UA: $2,053 \pm 0,06817$; LoVo UA: $2,106 \pm 0,08626$) (**Fig. 32 B y C**).

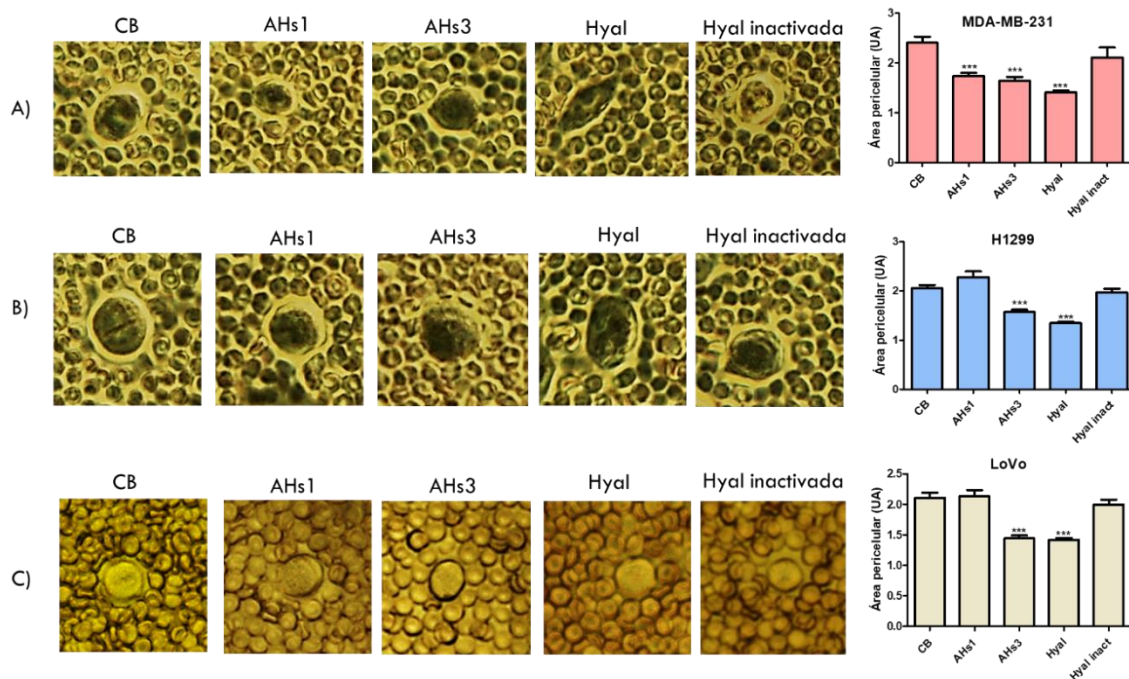


Figura 32. Ensayo de exclusión de partículas en células tumorales tratadas con AHs. Para realizar este ensayo de exclusión de partículas, se agregaron 2×10^7 glóbulos rojos fijados en cada well y se dejó decantar. Luego, se analizó en múltiples imágenes el área pericelular de las células (A) MDA-MB-231, (B) H1299 o (C) LoVo, tratadas o no con AHs1 o AHs3. El área pericelular es el área alrededor de cada célula que está compuesto principalmente por AH el cual bloquea partículas pequeñas y exógenas como los glóbulos rojos. Es decir, cuanto menos AH hay alrededor de la célula, se observa una menor exclusión y disminuye el área pericelular. A la izquierda se pueden observar los gráficos de análisis del tamaño del área pericelular de tres experimentos independientes. (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). UA: unidades arbitrarias.

4.2.6. Detección del AH secretado

Por otro lado, es sabido que no todo el AH sintetizado queda retenido a nivel de la membrana plasmática, sino que es liberado al sobrenadante de las células tumorales durante su cultivo. Para determinar los niveles de AH secretados al medio celular realizamos un ensayo tipo ELISA utilizando una proteína de unión específica al AH. En las condiciones experimentales no observamos diferencias significativas en la síntesis de AH bajo ningún tratamiento y en ninguna de las líneas celulares (**Fig. 33**).

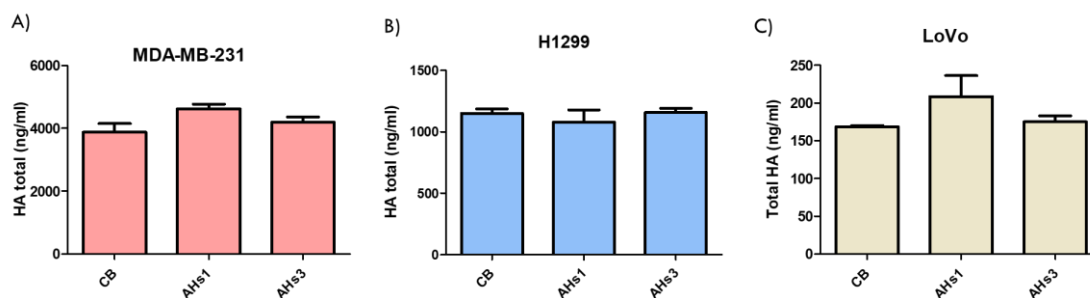


Figura 33. Detección del AH secretado. Para evaluar la concentración de AH secretado por las distintas células tumorales se realizó un ensayo tipo ELISA utilizando una proteína específica de unión a AH (HABP). Se detectó la cantidad total de AH soluble presente en el sobrenadante de las células tumorales: A) MDA-MB-231, B) H1299 y C) LoVo.

4.2.7. Análisis de formación de tumorosferas

Además, se realizaron cultivos para determinar la habilidad de generar tumorosferas *in vitro* y de crecer en un espacio tridimensional, simulando el contexto *in vivo*. En la línea MDA-MB-231 se observó una disminución en los tamaños de las tumorosferas cuando esta fueron tratadas con AHs3 (fc: $0,8496 \pm 0,04416$) en comparación con el control basal (fc: $1,0 \pm 0,0$) y con el tratamiento con AHs1 (fc: $1,102 \pm 0,04658$) (**Fig. 34 A**). En el caso de H1299, se produjo una disminución del tamaño de las tumorosferas con los tratamientos AHs1 (fc: $0,8053 \pm 0,01169$) y AHs3 (fc: $0,7311 \pm 0,02158$) en comparación con el control basal (fc: $1,0 \pm 0,0$) (**Fig. 34 B**). Mientras que en la línea celular LoVo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (**Fig. 34 C**).

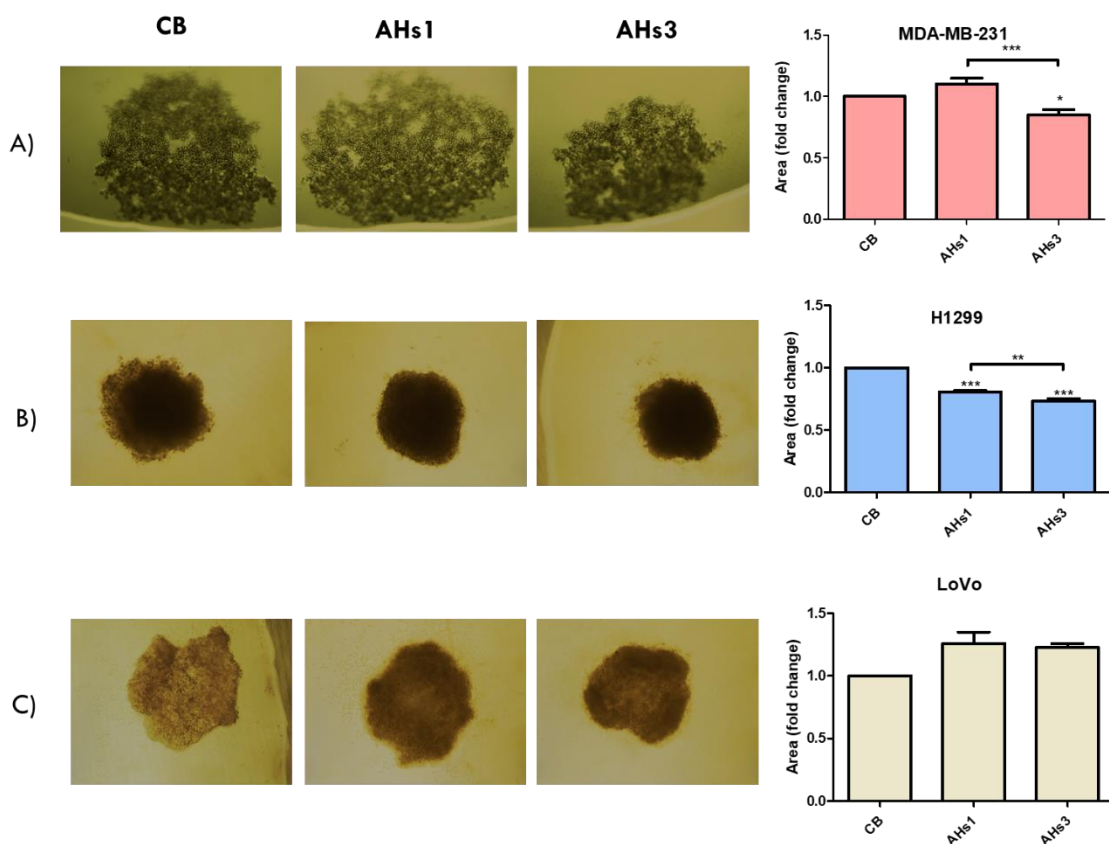


Figura 34. Formación de tumorosferas en presencia de los tratamientos con AHs. Se plaquearon las células tumorales en forma de gota con el tratamiento correspondiente de AHs1 o AHs3. Se dió vuelta la placa para que crezcan en 3D y se cultivaron hasta obtener las tumorosferas. Finalmente, se realizó un análisis de los tamaños de las tumorosferas generadas con las células tumorales: (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). fc: fold change.

Aún más, se analizaron los niveles totales de AH en las tumorosferas mediante inmunofluorescencia. Sorprendentemente, se observó un aumento en el AH total en las tumorosferas de MDA-MB-231 cultivadas con AHs3 (fc: $1,201 \pm 0,07693$), en comparación con el control basal (fc: $1,0 \pm 0,0$) y con AHs1 (fc: $0,8641 \pm 0,05048$) (**Fig. 35 A**). En cambio, en las

tumorosferas de H1299 se observó un aumento del AH en aquellas cultivadas con AHs1 (fc: 2,502 ± 0,1300) y una disminución con AHs3 (fc: 0,7130 ± 0,02743) en comparación con el CB (fc: 1,0 ± 0,0) (Fig. 35 B). En cuanto a las tumorosferas de LoVo, se detectó una muy baja cantidad de AH y no se observaron cambios entre los tratamientos (Fig. 35 C).

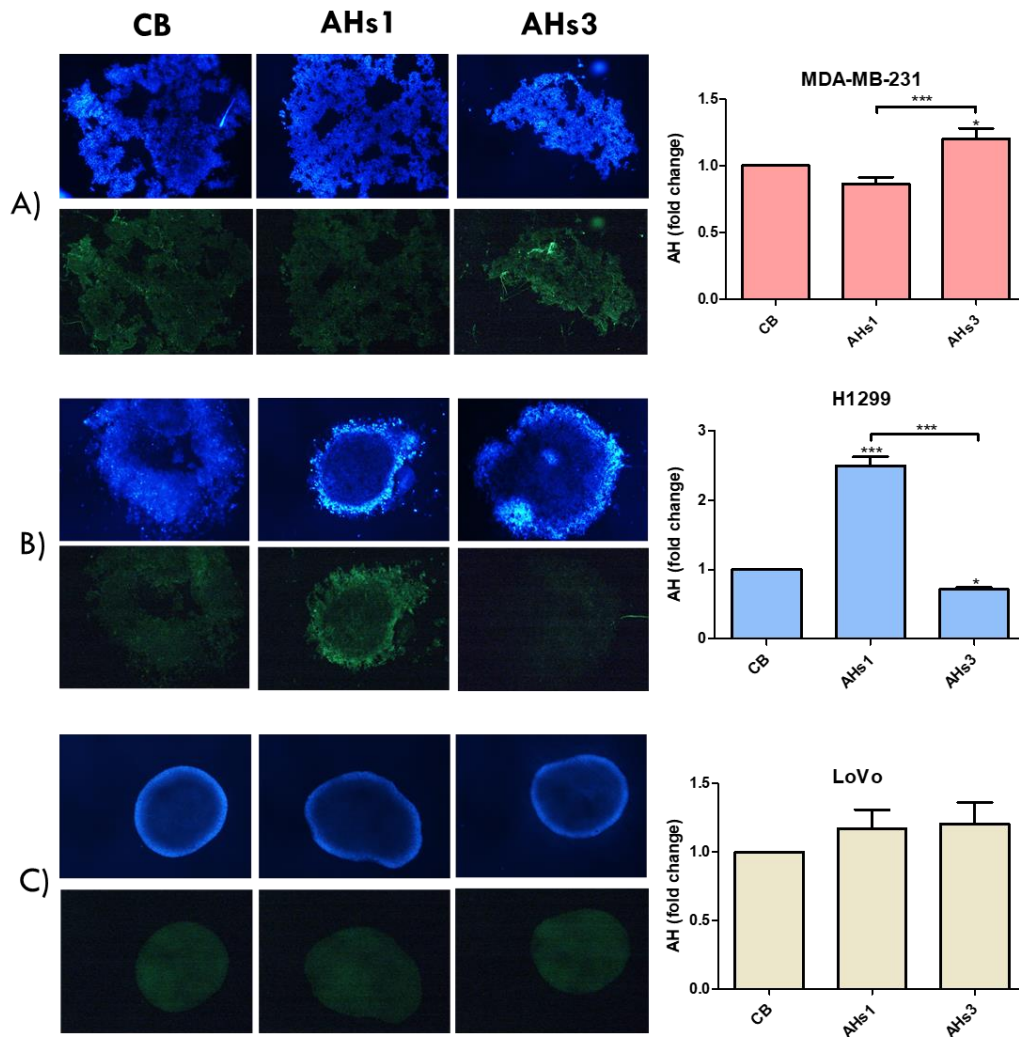


Figura 35. AH total en tumosferas formadas por (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. Brevemente, se plaquearon en forma de gota las distintas células tumorales con el tratamiento correspondiente de AHs1 o AHs3 y se cultivaron invertidas hasta obtener tumosferas. Una vez que estas se formaron, se fijaron y se marcó el AH en verde o los núcleos con DAPI en azul. Se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia y se analizaron con Image J. En los gráficos se muestran el análisis de la intensidad de fluorescencia del AH total en las tumosferas. (*) $p < 0,05$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). fc: fold change.

4.2.8. Migración de células endoteliales

Como se mencionó anteriormente, se propuso al AHs para un posible uso en terapias antiangiogénicas. Por tal motivo y para continuar evaluando la modulación del MAT, se decidió

analizar la migración de CE hacia los medios condicionados de los distintos tipos tumorales tratados o no con AHs1 o AHs3. Se observó que los medios condicionados de las células MDA-MB-231 tratados con AHs1 (índice de migración de CE: $0,3592 \pm 0,1180$) o AHs3 (índice de migración de CE: $0,09624 \pm 0,04045$) disminuyeron la migración de CE en comparación con el control basal (índice de migración de CE: $1,0 \pm 0,0$), es decir el medio condicionado sin tratamiento (control basal) (**Fig. 36 A**). En el caso de las células H1299 se observó el mismo comportamiento: disminuyó significativamente la migración de CE en aquellos medios condicionados de los tratamientos con AHs1 (índice de migración de CE: $0,1709 \pm 0,07566$) o AHs3 (índice de migración de CE: $0,2385 \pm 0,07643$) en comparación con el control basal (índice de migración de CE: $1,0 \pm 0,0$) (**Fig. 36 B**). En el caso de LoVo, no se observaron diferencias significativas en la migración de CE entre los tratamientos (**Fig. 36 C**). Como control se realizó la migración de CE con AHs1 y AH3 en la misma concentración con la que se trató a las células tumorales y sorpresivamente se observó que ambos derivados sulfatados estimulaban la migración de CE (índice de migración de CE: AHs1: $1,500 \pm 0,1112$; AHs3: $1,767 \pm 0,1566$) en comparación con el control basal (índice de migración de CE: $1,0 \pm 0,0$) (**Fig. 36 D**).

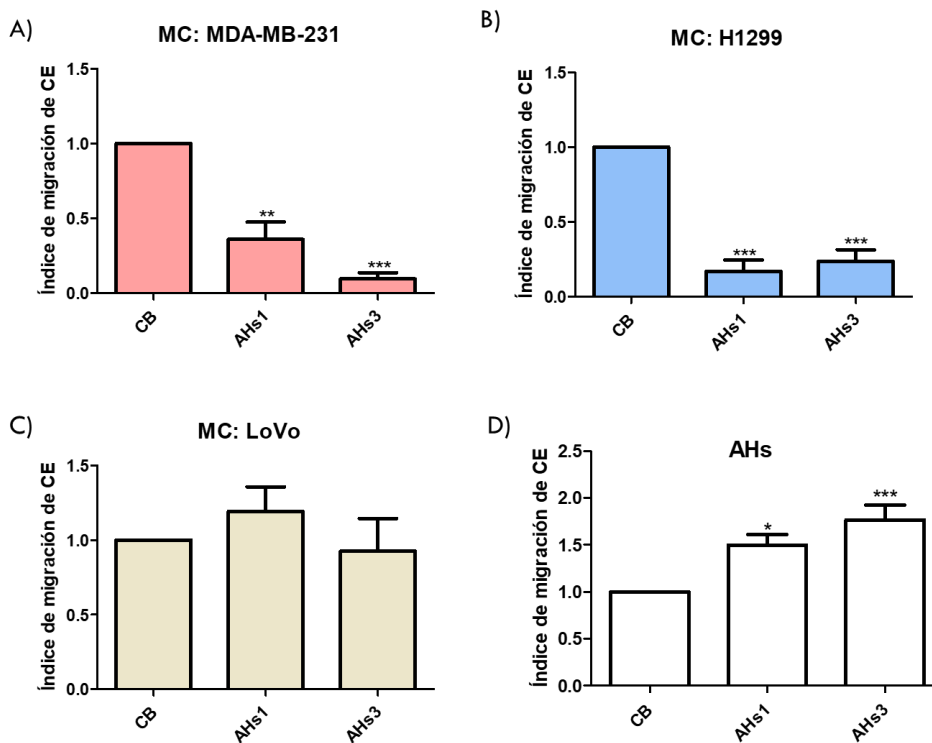


Figura 36. Migración de células endoteliales. Análisis de los índices de migración respecto al control basal de medios condicionados de (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. Mientras que (D) corresponde a la migración de CE hacia AHs1 o AHs3 en medio de cultivo acelular. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). MC: medio condicionado; CE: células endoteliales.

4.2.9. Migración de Mo/MØ

Con el fin de continuar evaluando la modulación de AHs sobre el MAT, se analizó la migración de células monocíticas hacia los medios condicionados de las células tumorales tratadas. Se observó que los medios condicionados de las células MDA-MB-231 tratadas con AHs3 (índice de migración de Mo/MØ: $0,3373 \pm 0,1132$) disminuyeron la migración de Mo/MØ (**Fig. 37 A**) en comparación con el CB (índice de migración de Mo/MØ: $1,0 \pm 0,0$). El mismo efecto se observó con los medios condicionados de H1299 (**Fig. 37 B**), el tratamiento con AHs3 sobre H1299 disminuyó la migración de Mo/MØ (índice de migración de Mo/MØ: $0,6266 \pm 0,07725$) en comparación con el CB (índice de migración de Mo/MØ: $1,0 \pm 0,0$). En el caso de los medios condicionados de LoVo no se observaron diferencias en la migración de Mo (**Fig. 37 C**). Como control se realizó la migración de Mo/MØ con AHs1 y AH3 en la misma concentración con la que se trató a las células tumorales, pero sin medio condicionado tumoral, y se observó una disminución en la quimiotaxis de Mo/MØ con el AHs3 (índice de migración de Mo/MØ: $0,3358 \pm 0,1616$) en comparación con el CB (índice de migración de Mo/MØ: $1,0 \pm 0,0$) (**Fig. 37 D**).

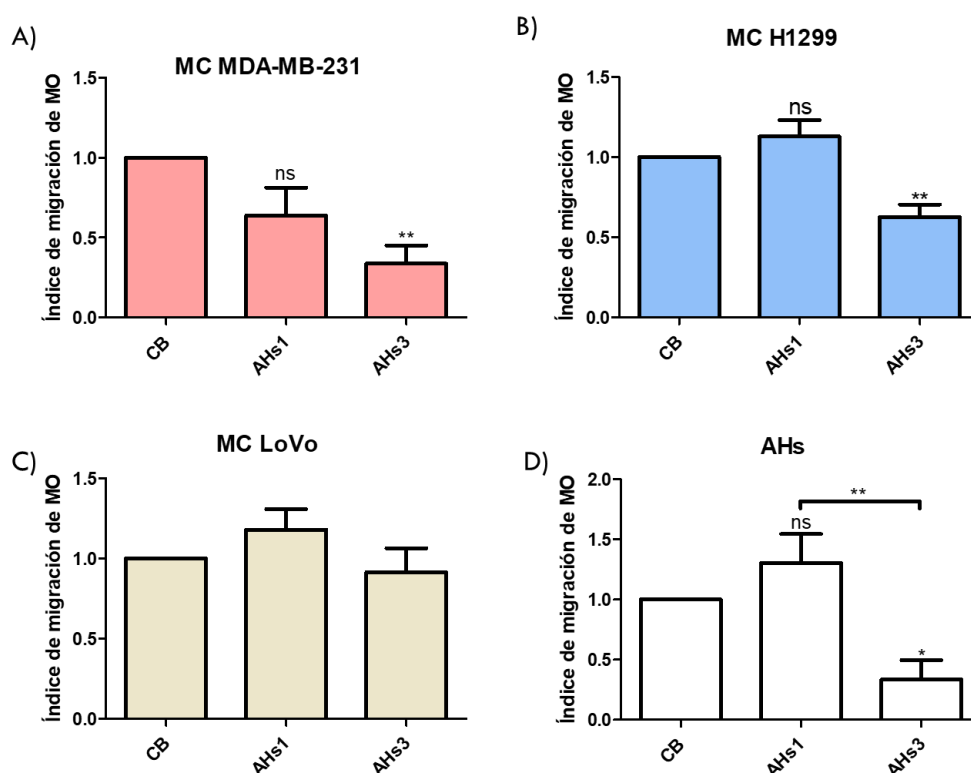


Figura 37. Migración de células monocíticas hacia los medios condicionados de células tumorales tratadas con AHs. Análisis de los índices de migración respecto al control basal de medios condicionados de (A) MDA-MB-231, (B) H1299 y (C) LoVo. Mientras que (D) corresponde a la migración de Mo hacia AHs1 o AHs3. ns = no significativo y (**) $p < 0,01$, en comparación con el control basal (CB). MC: medio condicionado.

Estos resultados en su conjunto indican que los AHs, independientemente de su grado de sulfatación, modulan sobre todo a las células MDA-MB-231, afectando su viabilidad, componentes de su matriz extracelular y su capacidad angiogénica. Algunos de estos efectos también se observan en las células H1299, pero no en la línea LoVo. En la próxima sección nos enfocamos sobre la acción de estos AH químicamente modificados sobre Mo/MØ en el contexto de los tumores evaluados en esta sección.

4.3. PARTE III: EFECTO DEL AH SULFATADO SOBRE MO/MØ EN UN CONTEXTO TUMORAL

Para continuar con el estudio de la modulación del MAT de los derivados sulfatos de AH, en esta tercera parte se evaluó su acción específicamente sobre Mo/MØ en un contexto tumoral. De esta manera, se cumple con los objetivos cuatro y cinco.

4.3.1. MODELO *IN VITRO* CON MO/MØ DE DADORES SANOS

Para evaluar la acción moduladora de AHs, se purificaron Mo/MØ derivados de sangre periférica de donadores sanos, los cuales fueron cultivados y tratados con AHs1 o AHs3 y medio condicionado derivados de líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y colorrectal, MDA-MB-231, H1299 y LoVo respectivamente. En la **Fig. 38** se muestra el esquema metodológico aplicado para cumplir con los objetivos.

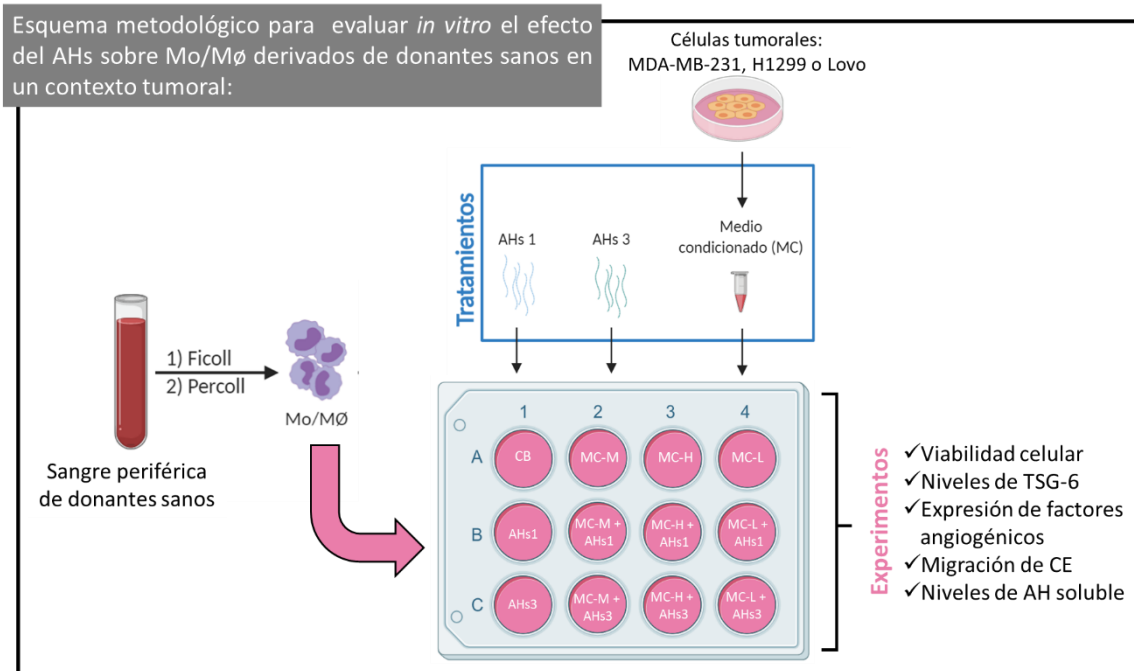


Figura 38. Diseño experimental para evaluar *in vitro* el efecto del AH sulfatado sobre Mo/MØ derivados en un contexto de cáncer de mama, pulmón o colorrectal. Brevemente, se purificaron los Mo/MØ de sangre periférica derivado de donantes sanos y se trataron con medios condicionados de células tumorales en conjunto con AHs1 o AHs3. Las células y sobrenadantes se utilizaron para realizar los experimentos cuyos resultados se describen en esta sección.

4.3.1.1. Viabilidad de Mo/MØ frente a AHs

Primero, se determinó mediante el ensayo de MTS la viabilidad celular de los Mo/MØ en presencia de concentraciones crecientes de AHs 1 y 3 (0, 20, 100 y 1000 µg/ml). Se observó un aumento en la viabilidad de estas células con ambos derivados AHs y en las tres concentraciones probadas (**Fig. 39**). Este resultado permitió continuar con los experimentos y se decidió utilizar

la concentración de 100 µg/ml ya que es la misma que se utilizó para tratar a las células tumorales.

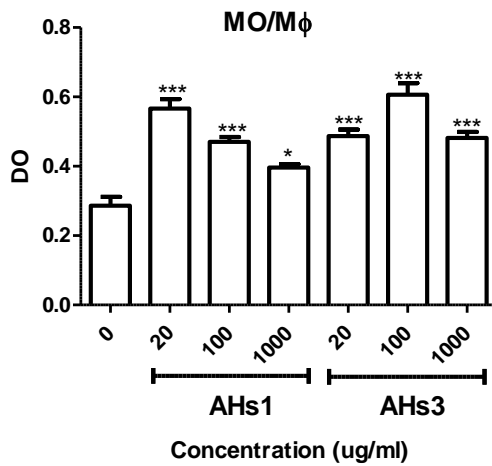


Figura 39. Viabilidad celular de Mo/Mφ en presencia de AHs. Efecto de distintas concentraciones de AHS1 y AHS3 sobre la viabilidad de Mo/Mφ evaluado por el ensayo de MTS. (*) p<0,05 y (***) p<0,001, en comparación con el control basal (CB). DO: densidad óptica.

4.3.1.2. Modulación inmunológica de AHs en un contexto tumoral

Una vez que se detectó que los AHs no disminuía la viabilidad de estas células, se decidió caracterizar el perfil inmunológico que adoptaron los Mo/Mφ en presencia de AHs y en un contexto tumoral. Como se mostró anteriormente, en nuestro diseño experimental no se logró detectar una modulación de los marcadores de superficie de Mo/Mφ (**Fig. 14**), por lo tanto, se decidió analizar la producción de diferentes citoquinas mediante ELISA: IL-4, IL-12, TGF-β1 total, TGF-β1 activo e IL-1β. Por un lado, no se detectaron niveles de IL-4 e IL-12 en los sobrenadantes de los Mo/Mφ en nuestro diseño experimental. Por otro lado, al analizar TGF-β1 total se observó una disminución en la cantidad de este cuando se trató a los Mo/Mφ con MC de MDA-MB-231 y AHS3 ($456,3 \pm 18,16$ ng/µl) en comparación con el tratamiento con MC de MDA-MB-231 solo ($611,4 \pm 26,04$ ng/µl) o con AHS1 ($716,1 \pm 43,30$ ng/µl) (**Fig. 40 A**); sin embargo, al detectar la forma activa de TGF-β1, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (**Fig. 40 B**). Al analizar IL-1β, no se observaron diferencias significativas en un contexto de cáncer de mama ni de pulmón. Sin embargo, en un contexto de carcinoma colorrectal se observó una disminución en los tratamientos con MC de LoVo en conjunto con AHS1 ($830,2 \pm 0,8750$ ng/µl) o AHS3 ($304,7 \pm 7,015$ ng/µl), en comparación con el tratamiento solo con MC de LoVo solo ($1966 \pm 12,28$ ng/µl) (**Fig. 40 C**).

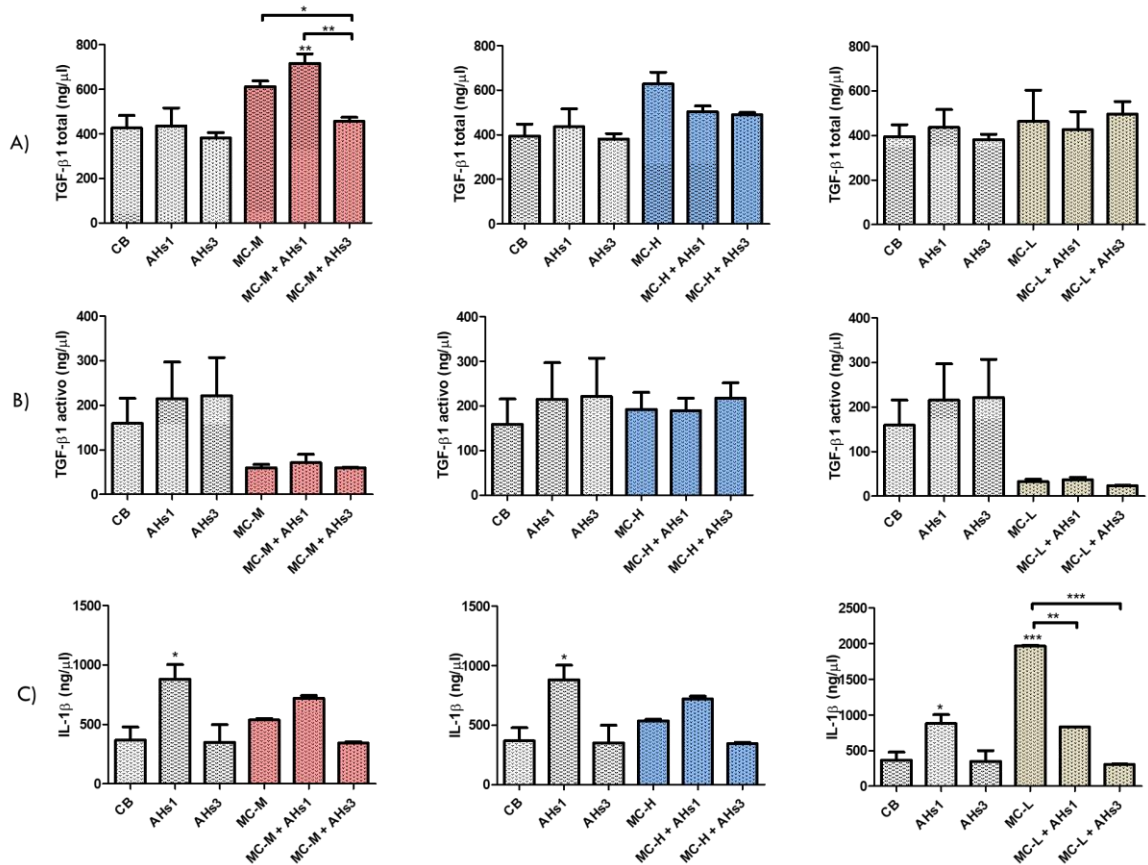


Figura 40. Detección de citoquinas en sobrenadantes de Mo/MØ tratados con AHs en distintos contextos tumorales. Se analizó mediante ELISA la concentración de distintas citoquinas A) TGF-β1 total, B) TGF-β1 activo y C) IL-1β en los sobrenadantes de Mo/MØ tratados con AHs1 o 3 y medios condicionados de distintas células tumorales. MC-M = medio condicionado de MDA-MB-231, MC-H = medio condicionado de H1299, MC-L = medio condicionado de LoVo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). MC-M: medio condicionado de MDA-MB-231; MC-H: medio condicionado de H1299; MC-L: medio condicionado de LoVo.

4.3.1.3. Migración de células endoteliales

Para continuar, se decidió analizar la modulación de AHs en el perfil angiogénico de Mo/MØ en un contexto tumoral. Para ello, se analizó la capacidad migratoria de CE hacia los sobrenadantes de los Mo/MØ previamente incubados con los MC de células tumorales y AHs1 o AHs3. Al analizar las migraciones, se observó una disminución de la quimiotaxis de CE hacia los sobrenadantes de los Mo/MØ tratados con MC de MDA-MB-231 y AHs1 (índice de migración de CE: $0,5970 \pm 0,1156$) o AHs3 (índice de migración de CE: $0,6741 \pm 0,03566$) en comparación con MC de MDA-MB-231 solo (índice de migración de CE: $1,404 \pm 0,1645$) (**Fig. 41**). En el caso de los sobrenadantes de los Mo/MØ tratados con MC de H1299 y AHs1 (índice de migración de CE: $0,7335 \pm 0,09753$) o AHs3 (índice de migración de CE: $0,7307 \pm 0,05515$) en comparación con el tratamiento de MC de H1299 sin AHs (índice de migración de CE: $1,209 \pm 0,1083$) (**Fig. 41**). En el

contexto de carcinoma colorrectal, se ve una tendencia similar a los MC de las otras líneas en los niveles de migración de CE con los tratamientos de Mo/MØ con LC de LoVo, sin embargo, estas diferencias no son significativas (**Fig. 41**).

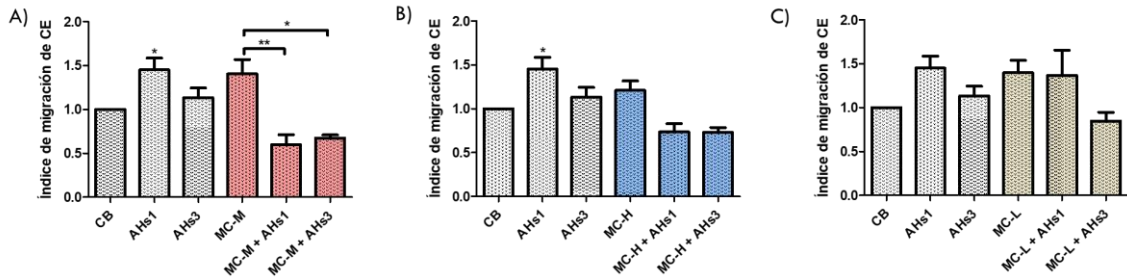


Figura 41. Migración de CE hacia los sobrenadantes de Mo/MØ previamente tratados con AHs1 o AHs3. Se realizaron ensayos de migración de células HMEC-1 endoteliales utilizado como estímulo los sobrenadantes de Mo/MØ tratados. Los resultados se expresaron como índice de migración de células respecto al control basal. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). MC-M: medio condicionado de MDA-MB-231; MC-H: medio condicionado de H1299; MC-L: medio condicionado de LoVo.

4.3.1.4. Niveles de expresión de factores angiogénicos

Para completar el análisis del perfil angiogénico de los Mo/MØ, se analizó por qPCR los niveles de VEGF, FGF-2 e IL8; factores angiogénicos que producen los Mo/MØ cuando adoptan un perfil pro-angiogénico. Se decidió analizarlo en un contexto de carcinoma mamario ya que fue donde se observaron diferencias en los niveles de migración de CE. El tratamiento con los AHs parece inhibir completamente la expresión de estos factores puesto que no se detectaron niveles de expresión de VEGF, FGF-2 e IL8 al tratar los Mo/MØ con ambos tipos de AHs con o sin MC de MDA-MB-231 (**Fig. 42**).

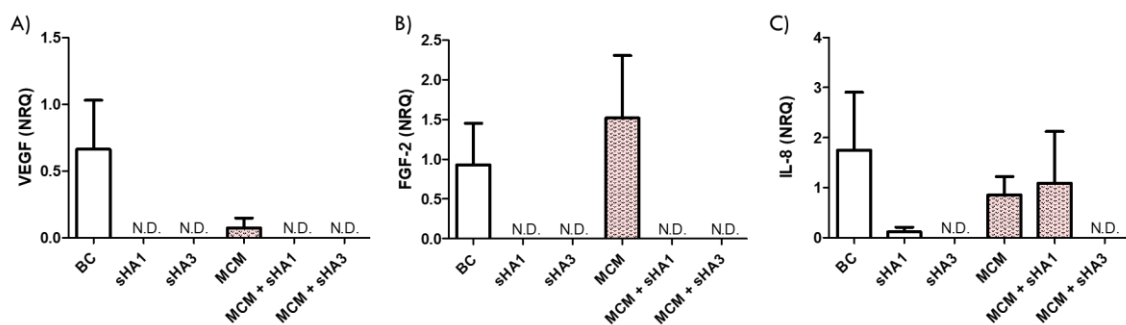


Figura 42. Niveles de expresión de factores angiogénicos. Se midieron por RT-qPCR los niveles de expresión de VEGF (A y B), IL-8 (C y D) y FGF-2 (E y F) en Mo/MØ tratados con MC tumoral y AHs1 o AHs3. N.D. = no detectado. MC-M = medio condicionado de MDA-MB-231. MC-M: medio condicionado de MDA-MB-231.

4.3.1.5. Expresión proteica de TSG-6

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los AHs, se podría decir que los Mo/MØ en contexto de cáncer de mama y de pulmón no tienen una acción angiogénica luego del tratamiento con AHs y por lo tanto, al igual que en la primera parte, decidimos evaluar los niveles de TSG-6 en los sobrenadantes de los tratamientos de Mo/MØ, como proteína reguladora de la funcionalidad de AH. Como se mencionó, al analizar por western blot los niveles de TSG-6 se pueden detectar dos especies: i) ~35 kDa corresponde a la especie a TSG-6 libre y ii) ~120 kDa que corresponde al complejo generado por TSG-6 y las cadenas pesadas de IαI (HC). Se observó que el tratamiento con MC de MDA-MB-231 junto con AHs3 (UA: $21,50 \pm 1,836$) aumentó los niveles de la especie de 120 kDa correspondiente a TSG-6•HC en comparación con el tratamiento MC de MDA-MB-231 con AHs1 (UA: $7,869 \pm 0,9809$) (**Fig. 43 A**). No se observaron diferencias en los niveles de esta especie de TSG-6 entre los tratamientos de Mo/MØ con MC de H1299 o de LoVo. En cuanto a los niveles de TSG-6 libre, el tratamiento MC de MDA-MB-231 en conjunto con AHs3 (UA: $7,216 \pm 0,3861$) disminuyó en comparación con el tratamiento con AHs1 (UA: $17,11 \pm 2,719$) (**Fig. 43 B**). En el caso de los tratamientos de Mo/MØ con MC de H1299, se observó un aumento de TSG-6 libre en el tratamiento en conjunto con AHs1 (UA: $17,02 \pm 0,6729$)

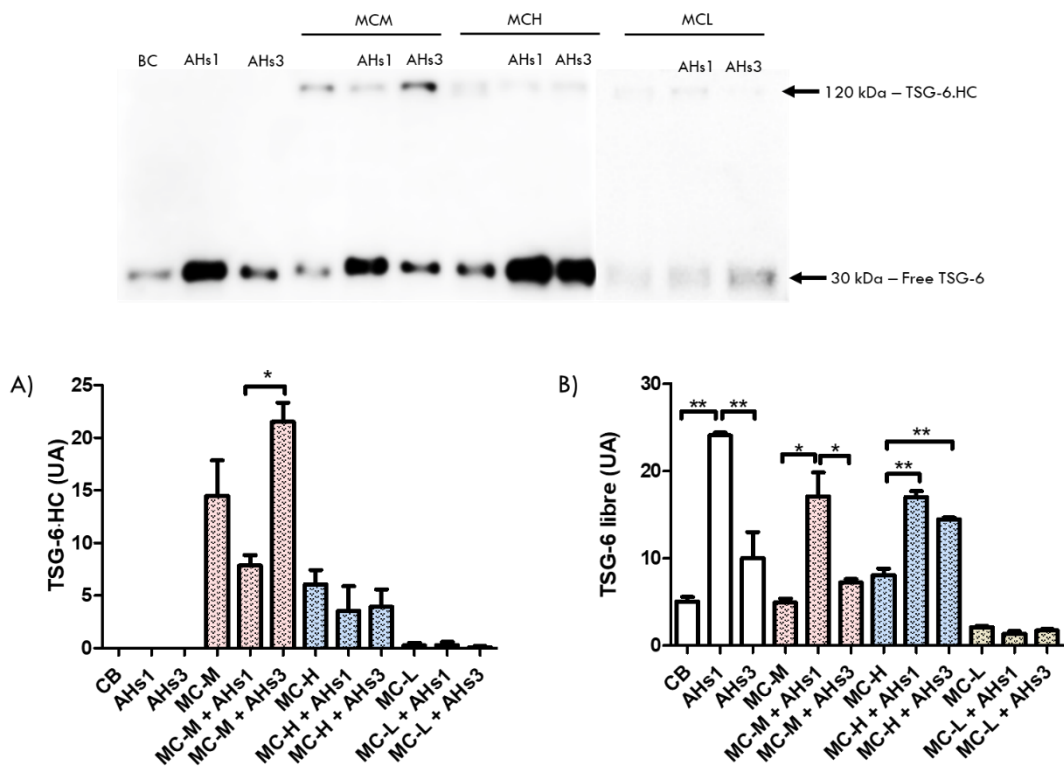


Figura 43. Detección de TSG-6 en los sobrenadantes de Mo/MØ tratados con AHs. Se pudieron detectar dos especies una de (A) ~120 kDa que corresponde a la unión TSG-6•HC y otra de (B) ~35 kDa que corresponde a TSG-6 libre. Los niveles proteicos se cuantificaron por densitometría. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$. MC-M: medio condicionado de MDA-MB-231; MC-H: medio condicionado de H1299; MC-L: medio condicionado de LoVo; UA: unidades arbitrarias.

o AHs3 (UA: $14,48 \pm 0,1688$) en comparación con MC de H1299 solo (UA: $8,059 \pm 0,7654$) (**Fig. 43 B**).

4.3.1.6. Detección del AH secretado por los Mo/MØ

Luego, se analizaron los niveles del AH secretado al medio celular de los Mo/MØ tratados, de manera tal de evaluar si los AHs son capaces de modular su expresión. Para determinar los niveles de AH secretados se realizó un ensayo tipo ELISA utilizando una proteína de unión al AH. En primer lugar, es necesario aclarar que no se detectó AH en los medios condicionados tumorales en la concentración en la que se utilizaron en el cultivo de Mo/MØ, así como tampoco interfirió AHs1 o AHs3 en la cuantificación del AH secretado.

Sin embargo, en los medios de cultivo de los Mo/MØ se observó una disminución en la producción de AH luego del tratamiento con MC de MDA-MB-231 en conjunto con AHs1 ($20,55 \pm 11,86$ ng/ml) y una tendencia a disminuir no significativa con el tratamiento en conjunto con AHs3, en comparación con el tratamiento de MC de MDA-MB-231 solo ($118,0 \pm 13,34$ ng/ml) (**Fig. 44**). También se observó una disminución en los niveles de AH soluble al tratar Mo/MØ con MC de H1299 y AHs1 ($0,0700 \pm 0,06506$ ng/ml) en comparación con MC de H1299 solo ($20,35 \pm 2,133$ ng/ml); y al tratar Mo/MØ con MC de LoVo más AHs1 ($3,790 \pm 2,188$ ng/ml) en comparación con MC de LoVo solo ($45,60 \pm 3,801$ ng/ml).

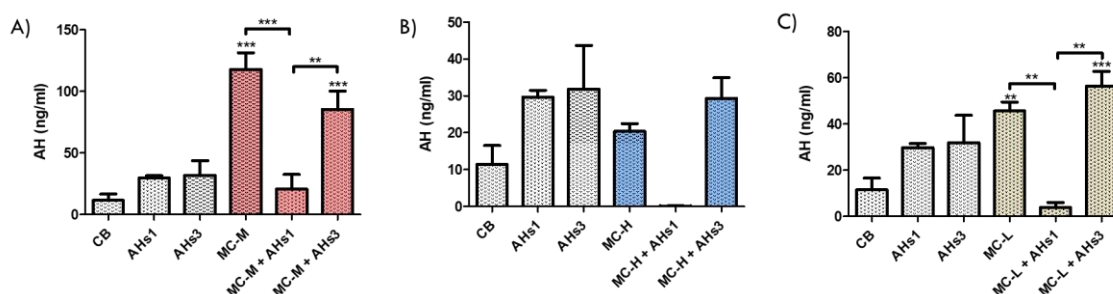


Figura 44. Detección del AH secretado. Para evaluar la concentración de AH secretado por los Mo/MØ con los distintos tratamientos se realizó un ensayo tipo ELISA utilizando una proteína específica de unión a AH (HABP). Se detectó la cantidad total de AH soluble presente en el sobrenadante de Mo/MØ tratados con medios condicionados de células tumorales: A) MDA-MB-231, B) H1299 y C) LoVo. (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control basal (CB). MC-M: medio condicionado de MDA-MB-231; MC-H: medio condicionado de H1299; MC-L: medio condicionado de LoVo.

4.3.2. MODELO *IN VIVO*

Dado que en el contexto de cáncer de mama se observaron los efectos más significativos del AHs, tanto a nivel de las células tumorales como de Mo/MØ en ese contexto, se decidió realizar un modelo *in vivo* con ratones *Nu/Nu* a los cuales se les inoculó MDA-MB-231 y luego Mo/MØ

tratados previamente con AHS1 o AHS3 para evaluar los efectos angiogénicos de estas células (Fig. 45).

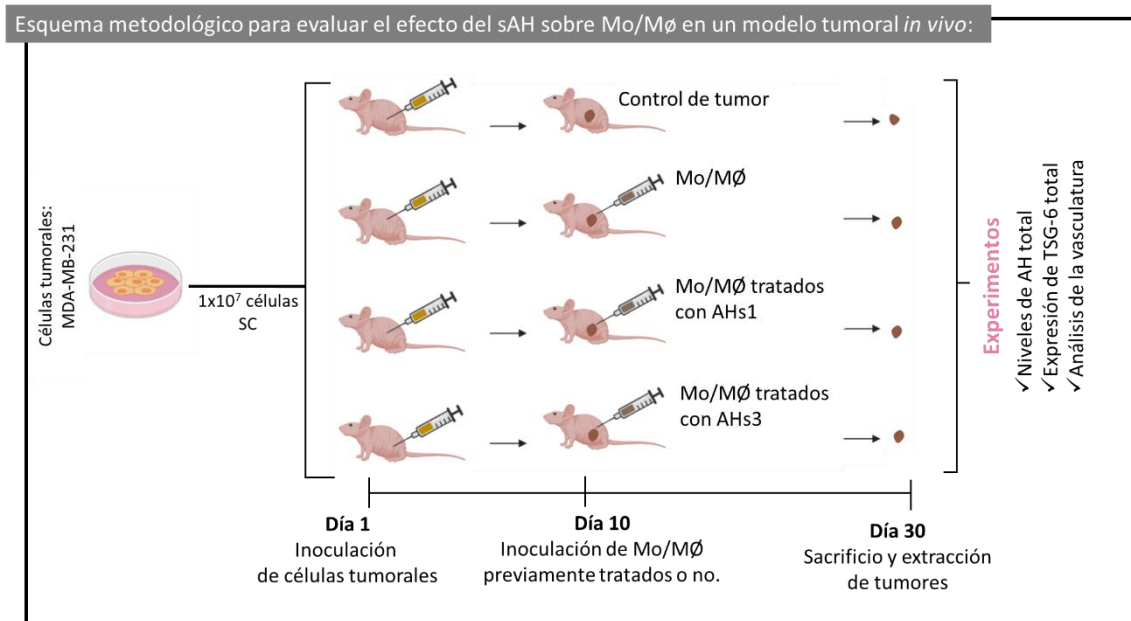


Figura 45. Migración de células endoteliales hacia los sobrenadantes de Mo/MØ previamente tratados. Brevemente, se inocularon 1×10^7 células tumorales (MDA-MB-231) subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. A los 10 días se inoculó por vía intratumoral, Mo/MØ derivados de sangre periférica de donantes sanos tratados o no con AHS1 o AHS3. En el día 30, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se los incluyó en parafina para luego realizar la inmunofluorescencia para detectar los niveles de i) vasculatura tumoral, ii) TSG-6 y iii) AH.

4.3.2.1. Análisis de la vasculatura tumoral

Al analizar la vasculatura de los tumores por inmunofluorescencia de GSL-1-FITC, se observó que, en el modelo de cáncer de mama, la inoculación con Mo/MØ preincubados con AHS1 (UA: $1,113 \pm 0,02802$) o AHS3 (UA: $1,081 \pm 0,04106$) indujo una disminución significativa de la vasculatura tumoral en comparación con aquellos inoculados con Mo/MØ sin tratamiento (UA: $1,412 \pm 0,04594$) o el control de tumor (UA: $1,977 \pm 0,1549$) (Fig. 46).

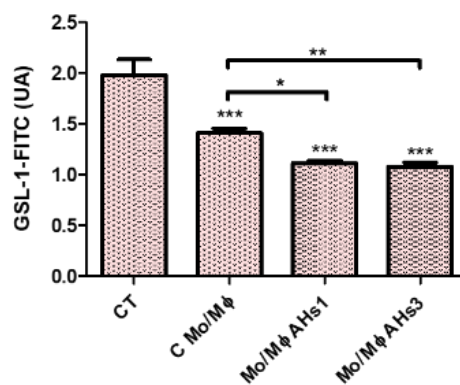
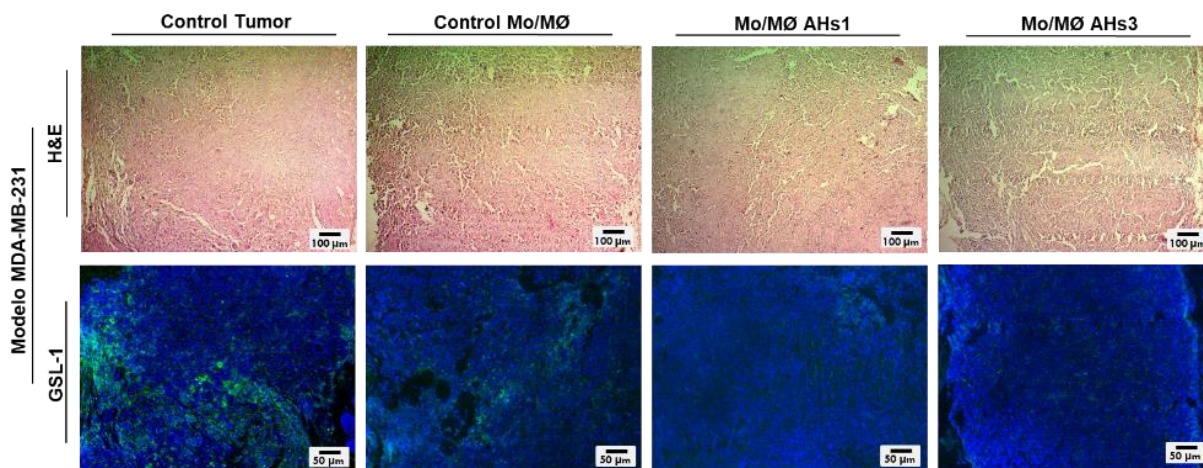


Figura 46. Análisis de la vasculatura tumoral. Se desarrolló un modelo tumoral in vivo, inoculando en ratones Nu/Nu células MDA-MB-231. Al tumor, luego, se les inyectó MO/MØ previamente tratados con AHs1 o AHs3. Los cortes histológicos de los tumores se fijaron y se tiñeron con GSL-1-FITC que detecta células endoteliales murinas (verde) y DAPI (azul, núcleos). Se analizó y graficó la intensidad de fluorescencia de GSL-1. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control de tumor (CT). UA: unidades arbitrarias.

4.3.2.2. Análisis de los niveles de AH y TSG-6 en el tumor

También se analizó en los tumores de los distintos grupos de ratones los niveles de TSG-6 y AH endógeno mediante inmunofluorescencia. Se observó una disminución de TSG-6 total en los tumores inoculados con Mo/MØ previamente tratados con AHs1 (UA: $1,058 \pm 0,03222$) y AHs3 (UA: $1,083 \pm 0,04172$) en comparación con aquellos animales inoculados con Mo/MØ sin tratamiento (UA: $2,530 \pm 0,1283$) (**Fig. 47 A**). En cuanto a los niveles de AH también se observó una disminución en los tumores inoculados con Mo/MØ pretratados con AHs1 (UA: $1,521 \pm 0,1040$) o AHs3 (UA: $2,069 \pm 0,05575$) en comparación con aquellos inoculados con Mo/MØ sin tratamiento (UA: $2,642 \pm 0,1122$) o con el control de tumor (UA: $2,828 \pm 0,2007$) (**Fig. 47 B**).

Los resultados de esta parte muestran que los AHs modulan también a las células Mo/MØ en un contexto tumoral. Principalmente, en un contexto de carcinoma mamario estos AHs inducen en Mo/MØ un perfil antiangiogénico que se pudo observar tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*.

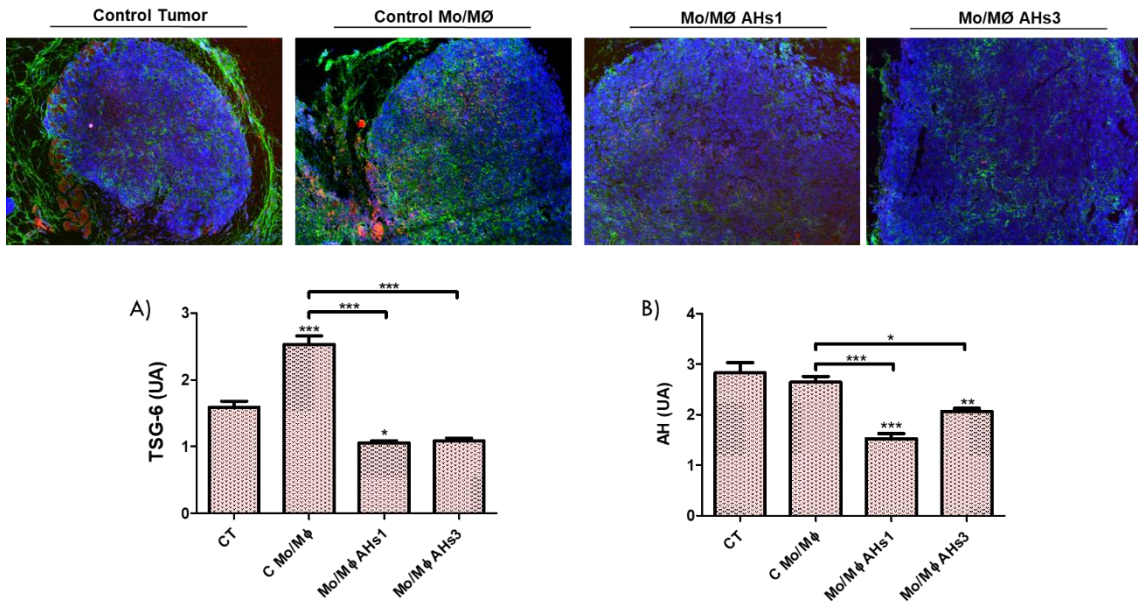


Figura 47. Inmunofluorescencia de TSG-6 y AH en tumores del modelo MDA-MB-231. Las secciones tumorales se fijaron y marcaron con: i) TSG-6 y un anticuerpo secundario conjugado con Texas Red (rojo, TSG-6), ii) proteína de unión AH biotinilada y estreptavidina-FITC (verde, AH total) y DAPI (Azul, núcleos). Se analizó y graficó la intensidad de fluorescencia de AH y TSG-6. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, en comparación con el control de tumor (CT). UA: unidades arbitrarias.

5. DISCUSIÓN

5.1. PARTE I: EFECTO DEL AH SOBRE MO/MØ EN UN CONTEXTO TUMORAL

Como se mencionó anteriormente, el microambiente tumoral regula el crecimiento y la progresión del tumor. Este está formado por diferentes poblaciones de células además de las tumorales, como los macrófagos, las células endoteliales y otras células estromales. El microambiente tumoral también contiene diversos componentes no celulares, como la matriz extracelular, cuyas interacciones influyen en el comportamiento tumoral. Esta matriz extracelular está alterada en cuanto a composición y disposición en el microambiente tumoral, modulando distintos procesos claves del desarrollo tumoral como la migración, angiogénesis, proliferación y supervivencia (106), los cuales fueron evaluados en este trabajo de tesis. En esta matriz extracelular tumoral, el glicosaminoglicano AH es uno de los componentes cuya síntesis y degradación están desregulados. Este glicosaminoglicano es capaz de interactuar con Mo/MØ a través de distintos receptores y principalmente por CD44, induciendo señalización que favorecen su migración y liberación de quimioquinas, factores de crecimiento y expresión de MMPs (14). Aún más, *Zhang et al.* demostraron que el AH derivado de cultivos de células de cáncer de mama induce un fenotipo inmunosupresión en MØ (107). Por otro lado, es sabido que la acción del AH depende de su tamaño ya que los distintos pesos moleculares del AH pueden influenciar de distintas maneras en la activación de los receptores y en su señalización río abajo (108). En cuanto al efecto sobre los Mo/MØ en el contexto tumoral, se ha implicado al AH con su reclutamiento y adhesión (14). Aún más, estudios previos sugieren una correlación en el número de Mo/MØ infiltrantes con una MAT rico en AH (70, 71). Sin embargo, estas observaciones son controversiales y varían entre los tipos tumorales. Es por ello que el objetivo de esta primera parte de la tesis fue dilucidar si el AH, de distintos pesos moleculares, es capaz de afectar la respuesta de Mo/MØ en un contexto de carcinoma mamario o colorrectal.

Primero se analizó el comportamiento de dichas células exponiéndolas a lisados celulares (LC) o factores solubles del medio condicionado (MC) de células tumorales, con el objeto de exponerlas a distintos tipos de antígenos tumorales y mimetizar la activación en el contexto tumoral necrótico, apoptótico o proliferante. Estudios previos demuestran que la necrosis está relacionada con un microambiente más angiogénico e inflamatorio en varios tipos tumorales (109, 110) incluido el carcinoma mamario (111). Por lo tanto, se decidió evaluar el comportamiento de los macrófagos expuestos tanto a LC como a MC derivados de células tumorales.

En este sentido, se observó que el AH, tanto BPM como APM, en presencia de LC o MC derivado de células tumorales de mama o colon, no afectó los marcadores de superficie que definen el fenotipo de los MØ. Sin embargo, es importante considerar que el comportamiento y función de estas células no está definido solo por marcadores de superficie. Es más, está demostrado que los MØ, además de su rol inmunológico, exhiben una diversidad de comportamientos. Por ejemplo, estas células como respuesta ante ciertos estímulos, como hipoxia y necrosis, secretan factores para el crecimiento y el remodelado de la vasculatura durante la angiogénesis, tales como VEGF, FGF-2, IL-8, PIGF, PDGF, MMPs (24). Por lo tanto, se decidió evaluar si los tratamientos con AH BPM o APM son capaces de modular el comportamiento angiogénico de Mo/MØ en ambos contextos tumorales. Se observó que el AH APM en presencia de antígenos de carcinoma mamario (LC-M o MC-M) aumentó significativamente los niveles de expresión de ARNm de VEGF, así como de otros factores proangiogénicos como IL-8 y FGF-2. Además, se encontró un aumento significativo en la actividad de MMP-2 cuando los Mo/MØ fueron tratados con AH en presencia de LC-M. Estudios previos demuestran que MMP-2 cliva el colágeno tipo IV y se asocia con la migración de CE, afectando su capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (112). Aún más, se analizó mediante un ensayo de migración de CE, la funcionalidad de los factores proangiogénicos liberados con el tratamiento de AH APM en un contexto de carcinoma mamario. Se observó una mayor migración de CE hacia los sobrenadantes de los Mo/MØ con dicho tratamiento. Resultados similares se observaron en el ensayo *in vivo*, al analizar la vasculatura mediante la detección de CE: se observó un aumento de ECs en el tejido tumoral del modelo MDA-MB-231 inoculados con Mo/MØ previamente tratados con AH APM. En resumen, estos resultados demuestran que el AH APM sería capaz de inducir en Mo/MØ una acción proangiogénica en un contexto de carcinoma mamario.

También, en la primera parte de la tesis, se evaluaron los receptores y proteínas de unión involucradas en la repuesta de los Mo/MØ, ya que la modulación de estos afecta su función dentro del microambiente tumoral. Se observó que el AH APM en conjunto con MC-M indujo una disminución de la expresión de CD44 y TLR4. Esta modulación podría tener una relación con la regulación de la angiogénesis ya que ambos receptores se han reportado en mecanismos moduladores de la angiogénesis tumoral (24), sin embargo pero poco se sabe de esta modulación en células del sistema inmune.

Cabe aclarar que estos efectos que se demostraron en un contexto de carcinoma mamario, no se observaron al exponer a los Mo/MØ a antígenos derivados de carcinoma colorrectal. Por lo tanto, es posible hipotetizar que existen ciertos componentes en el contexto de carcinoma mamario, pero no en el colorrectal, que pueden estar modulando la función del AH APM en Mo/MØ.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizaron experimentos para identificar una proteína de unión al AH que sea capaz de modular su respuesta angiogénica manera dependiente del tipo tumoral. Se reconoce ampliamente que el AH no está covalentemente unido a un núcleo proteico, pero puede interactuar con proteínas de unión o hialaderinas, que a su vez modulan su estructura y función. Como se mencionó anteriormente TSG-6, es una hialaderina, que interactúa con AH y que media la unión de AH con $\alpha 1$ permitiendo la estabilización de la MEC y afectando la función del AH (56). La expresión de TSG-6 es estimulada por citoquinas u otros factores liberados durante la inflamación o procesos de injuria. Distintos trabajos proponen a TSG-6 como un regulador de la respuesta inflamatoria manteniendo, de esta forma, la homeostasis de la MEC (56). Más aún, se ha observado que la unión de esta proteína con AH genera estructuras tipo cables que permiten la movilización, activación y liberación de factores de crecimiento por parte de células mononucleares como los Mo/M \emptyset en sitios de inflamación (113). En esta tesis, por primera vez se analizó la expresión de esta proteína en el contexto tumoral y su asociación con la respuesta angiogénica de Mo/M \emptyset . Observamos una reducción de la expresión correspondiente al complejo de TSG-6 con las cadenas pesadas de $\alpha 1$ (complejo TSG-6-HC) solo cuando los Mo/M \emptyset fueron tratados con AH en un contexto de carcinoma mamario (MC-M o LC-M), indicando que antígenos de este tipo tumoral puede inducir señales inmunosupresoras y angiogénicos en M \emptyset mediante la modulación de TSG-6 y su interacción con componentes de la matriz extracelular como AH. El complejo TSG-6-HC es un indicador de la actividad enzimática de TSG-6, ya que este cataliza la transferencia de las cadenas pesadas (HC) de $\alpha 1$ al AH (57, 58). Esta interacción afecta tanto la estructura del AH como su capacidad de unión a receptores y por ende su función (103), lo que sugiere que esta molécula afectaría la respuesta de Mo/M \emptyset a AH en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, se utilizó un modelo tumoral de carcinoma mamario o colorrectal de xenoinjerto en ratones Nu/Nu, que no permiten el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa y de manera tal de analizar solo la respuesta angiogénica de los Mo/M \emptyset . En concordancia con los datos *in vitro*, se observó en los modelos de carcinoma mamario una reducción en la cantidad total de TSG-6 en aquellos ratones inoculados con Mo/M \emptyset preincubados con AH APM. Sin embargo, en este modelo tumoral no se observó una diferencia en los niveles totales de AH. Esto indica que la función diferencial del AH depende de factores o antígenos del microambiente tumoral más que de la cantidad de AH. Aún más, se analizaron *in vitro* Mo/M \emptyset derivados de pacientes oncológicos con carcinoma mamario o colorrectal, de esta forma pudimos extender nuestros resultados en diferentes tipos tumorales, así como estadios. Para ello, se aislaron Mo/M \emptyset de sangre periférica de los pacientes y se los trató con AH y con lisados del tejido tumoral o adyacente al tumor (LTT o LTAT, respectivamente) del mismo paciente. Se observó

una disminución en los niveles de TSG-6·HC en aquellos Mo/MØ derivadas de pacientes con carcinoma mamario tratados con LTT y AH APM. Mientras que no hubo modulación de TSG-6·HC con los tratamientos de LTAT. Estos resultados están en concordancia con el *in vitro* con muestras de dadores sanos y con el modelo *in vitro*, indicando que el AH APM modula TSG-6 y la angiogénesis en Mo/MØ en un modelo tumoral mamario.

En el contexto de carcinoma colorrectal, el tratamiento con AH APM no afectó la expresión de sus receptores, ni de TSG-6, ni moduló su capacidad angiogénica. Interesantemente, los MØ presentes en el microambiente presentan un rol controversial. Es decir, algunos estudios demuestran que los TAMs en ese contexto exhiben capacidades anti-tumorales, mientras que otros sostienen que estas células contribuyen a la promoción del tumor (114). Sin embargo, en cáncer de mama se demostró que una alta densidad de TAMs correlaciona con una baja prognosis, ya que estas células son capaces de inducir angiogénesis, remodelación de la MEC para promover la invasión, contribuir a la evasión de la respuesta inmune anti-tumoral y reclutar leucocitos inmunosupresores al microambiente tumoral (115).

En resumen, en esta primera parte de la tesis se demuestra que AH APM, una molécula muy conservada y poco inmunogénica, desregula los niveles de TSG-6 en Mo/MØ modulando su comportamiento angiogénico en un contexto de carcinoma mamario, pero no en un contexto de carcinoma colorrectal. Además, es interesante destacar que MC-M induce una disminución del complejo TSG-6·HC que podría ser esencial para la angiogénesis, ya que este efecto no se observó con el MC de LoVo.

5.2. PARTE II: EFECTO DEL AH SULFATADO SOBRE CÉLULAS TUMORALES

Luego de establecidos los efectos del AH nativo, decidimos iniciar los estudios usando los derivados químicos parcial o totalmente sulfatados de AH (AHs1 o AHs3, respectivamente) sobre células tumorales de distintos tipos: mama, pulmón y colorrectal. Estos compuestos fueron producidos durante mi estadía en la empresa Fidia Farmaceutici S.p.A. (Italia) donde se pusieron a punto protocolos de producción manteniendo un rango de peso molecular determinado, con el objeto de evaluar su acción antitumoral, no solo sobre células tumorales sino también sobre células del microambiente como lo son los Mo/MØ y CE. Por otro lado, se decidió ampliar agregando el modelo de células de carcinoma pulmonar no microcíticas (línea celular H1299) ya que junto con los otros dos corresponden a los tres tipos de tumores más frecuentes en nuestro país. En este aspecto, estudios previos demuestran que en los tumores de pulmón y de mama la expresión de HYAL-1 se encuentra elevada (47-49, 116) y es sabido que el AHs un potente inhibidor de esta enzima (117). Si bien nuestro objetivo principal es evaluar su acción sobre

Mo/MØ en el microambiente tumoral (parte III), se decidió también analizar su acción sobre células tumorales pues estudios previos que indican que los AHs tienen una acción antitumoral y antiangiogénica en cáncer de próstata y vejiga por acción directa sobre estas células (84, 85). Aún más, estos estudios indican que los tratamientos con AHs en células tumorales de próstata y vejiga inhibe la acción de HYALs tanto por mecanismos competitivos como no competitivos, y en consecuencia observaron una inhibición del crecimiento tumoral así como de la angiogénesis tumoral (84, 85). Por otra parte, no hay antecedentes de la acción de AHs en los tipos tumorales del interés de esta tesis.

En primer lugar, se analizó el efecto de AHs1 o AHs3 sobre distintas funciones celulares claves para el mantenimiento y crecimiento tumoral, analizando efectos sobre la viabilidad, proliferación, apoptosis y acción citotóxica. En el caso de la viabilidad solo se observó una disminución con los tratamientos de AHs en las células de carcinoma mamario MDA-MB-231, en donde se pudo determinar la IC50 para determinar la concentración de trabajo de 100 µg/ml, menor al IC50 y que no era citotóxica. En las líneas celulares de carcinoma de pulmón (H1299) solo se observó una disminución de la viabilidad con el tratamiento de AHs3 en la mayor concentración (1000 µg/ml) que corresponde con un aumento de la citotoxicidad. En el caso de las células de carcinoma colorrectal (LoVo) no se observó una disminución de la viabilidad con ninguno de los tratamientos de los dos tipos de AHs, ni tampoco efectos citotóxicos. Teniendo en cuenta estos resultados se puede deducir que los AHs ejercieron una acción antitumoral en las células MDA-MB-231, de carcinoma mamario afectando la viabilidad de las mismas. Sin embargo, con H1299 y LoVo se observó principalmente un efecto anti-proliferativo con el tratamiento de AHs3 en la concentración de 100 µg/ml. El hecho de que no se haya observado una reducción de la proliferación con los tratamientos en MDA-MB-231 puede deberse a que se está usando en la concentración IC50 y, por lo tanto, que en esta concentración no se llegue a observar el efecto.

Posteriormente, sabiendo que AHs inhibe a HYAL-1 resultó interesante evaluar la acción de AHs1 o AHs3 sobre el AH endógeno producido por las distintas células tumorales, ya que en varios tumores se reportó una sobreexpresión de hialuronidasas y en muchos de ellos se propuso como un biomarcador (45, 46). Aún más, varios antecedentes demuestran que el sistema AH tumoral-HYALs promueve el crecimiento tumoral, la invasión/metástasis y la angiogénesis (118-120). Para analizar la posible acción sobre esta enzima u otras isoenzimas involucradas en la degradación de AH evaluamos en cultivos *in vitro* el área pericelular que generan las células en presencia de estos derivados de AH. En general se considera que la matriz intersticial o pericelular está compuesta principalmente por AH (94), Para tal fin llevamos a cabo un ensayo de exclusión de partículas que permite evaluar la dinámica de generación de AH usando un

control con Hyal, que específicamente degrada este GAG. Los resultados mostraron que el AHs3 indujo una disminución del área pericelular en las tres líneas celulares, indicando una reducción del AH y otros proteoglicanos presentes alrededor de la célula. Por otro lado, cuando se analizó el AH soluble total, es decir aquel secretado total al medio de cultivo, no se observaron cambios en su concentración con los distintos tratamientos. Sin embargo, esta técnica detecta el AH total que las células liberaron al microambiente y no el rango de pesos moleculares que posiblemente sea lo que está variando en los tratamientos. Cabe destacar que, basalmente las células MDA-MB-231 producen una mayor cantidad de AH que las células H1299 y ambas sintetizan más AH que las células LoVo. Esto resulta interesante ya que MDA-MB-231 sería un tumor rico en AH y es la línea celular de las tres que más AH produce, es con la que se detectan más efectos con los tratamientos con AHs mientras que con las células LoVo, las que menos AH producen, no se observaron efectos con los tratamientos con AHs.

Dado que los cultivos tumorales 2D, donde las células crecen en monocapa, no representan de la mejor manera la interacción entre las células tumorales y la MEC (121), se decidió realizar cultivos 3D de las células tumorales para evaluar el AH presente en la MEC y compararlo con el AH producido en los distintos tratamientos de AHs. Mas aún, se considera que los tumores *in vivo* crecen formando estructuras 3D, que es crucial para interactuar con los distintos componentes de la MEC tumoral (121), como lo es el AH. Sorpresivamente, nuestros resultados mostraron en MDA-MB-231 que el tratamiento con AHs3 aumentó los niveles de AH total en las tumorosferas, mientras que en H1299 esto ocurrió con AHs1. En el caso de LoVo los niveles de AH no fueron detectados en las tumorosferas mediante esta técnica, lo cual se relaciona con los bajos niveles de AH total soluble detectados en el ensayo tipo ELISA. Aún más, se observó una disminución en el tamaño de las tumorosferas de MDA-MB-231 con el tratamiento de AHs3 y en H1299 con ambos tratamientos de AHs, lo cual indicaría que estos tratamientos alterarían el estado de proliferación de estas células en estos tipos de cultivos por inducir cambios en el contenido de AH. En vista de que fue observado, un aumento en los cultivos en 2D, esto podría indicar que en las tumorosferas se afecta el acceso a nutrientes esenciales para las células, que no ocurre cuando se hacen cultivos en 2D. Este es un aspecto interesante de continuar estudiando pues indica que el AH modificado químicamente y por lo tanto exógeno afecta el metabolismo del propio AH endógeno. Por otro lado estos cultivos 3D tienen una composición de tipos celulares con fenotipo stem cell diferente al observado en los cultivos 2D (122) que explican el cambio de expresión y contenido de AH.

Debido a los antecedentes previos que demuestran que AHs tiene una acción anti-angiogénica (84-86), se decidió también evaluar la acción de los tratamientos en las células tumorales sobre la quimioatracción de CE. Los sobrenadantes de las MDA-MB-231 y H1299 tratadas con AHs1 o

AHs3 redujeron significativamente la quimioatracción de células endoteliales; sin embargo, ese efecto no se observó con la línea celular LoVo. Interesantemente, se observó un aumento en la migración de CE hacia AHs1 o AHs3 sin el sobrenadante tumoral. Estos resultados indicarían que AHs1 y AHs3 tienen un efecto anti-angiogénico sólo en un contexto tumoral, y principalmente en el mamario y pulmonar, pero no colorrectal.

Para continuar y relacionar estos resultados con uno de los objetivos principales de la tesis que es evaluar la acción de AHs en Mo/MØ (parte III), se realizaron ensayos de migración con Mo derivados de sangre periférica de donantes sanos. Interesantemente, los sobrenadantes de células MDA-MB-231 o H1299 tratadas con AHs3 disminuyeron la migración de Mo/MØ; efecto que también se observó con el tratamiento AHs3 solo. En el caso de la línea celular LoVo, no se observaron diferencias en quimioatracción de Mo/MØ entre los tratamientos. Los Mo son intensamente reclutados en tumores en crecimiento mediante factores quimioattractantes secretados por células tumorales y estromales del microambiente (123). En cáncer de mama se demostró que una alta densidad de TAMs correlaciona con una baja prognosis (124), con lo cual una disminución en la atracción de Mo podría resultar beneficioso para lograr un efecto anti-tumoral de otras terapias.

En resumen, en esta segunda parte se puede concluir que el AHs sobre todo el derivado totalmente sulfatado (AHs3) presentó una posible acción antitumoral y antiangiogénica en células tumorales de mama y en menor medida de pulmón. Mientras que en células tumorales de carcinoma colorrectal no demostró tener el mismo efecto. Si bien más estudios son necesarios, estos resultados son de gran interés ya que AHs3 podría ser un potencial agente antitumoral para complementar las quimioterapias actuales en cáncer de mama y posiblemente también en cáncer de pulmón.

5.3. PARTE III: EFECTO DEL AH SULFATADO SOBRE MO/MØ EN UN CONTEXTO TUMORAL

Finalmente, se estudió el efecto de los AHs en Mo/MØ en un contexto tumoral, si bien se tuvieron en cuenta los tres tipos tumorales mencionados en la Parte II, se priorizaron algunos experimentos con el contexto de carcinoma mamario ya que fue en donde se observaron mayores efectos de este AH modificado. Si bien en la sección anterior se observó que la migración de Mo/MØ disminuye hacia sobrenadantes de MDA-MB-231 o H1299 tratadas con AHs3, esta tercera parte se enfoca sobre la modulación de AHs3 en Mo/MØ en un contexto tumoral. Sobre todo, se enfoca en analizar si estos AH químicamente modificados son capaces de modular el perfil inmunológico como el comportamiento angiogénico de estas células. Lo

primero que se evaluó fue la viabilidad en Mo/MØ derivados de sangre periférica de donantes sanos al ser tratados con distintas concentraciones de AHs1 o AHs3. Se observó que ambos AHs en todas las concentraciones testeadas aumentó la viabilidad de Mo/MØ, con lo cual se decidió continuar utilizando en los experimentos y utilizar la concentración de 100 µg/ml que es la misma que se utilizó en la parte II con las células tumorales.

Estudios previos demuestran que una matriz compuesta de colágeno I y AHs tiene la capacidad *in vitro* en MØ derivados de sangre periférica de dadores sin patologías, de promover la producción de citoquinas similar a un perfil M2 y reducir aquellas características de un perfil M1 (87, 89). Sin embargo, no existen datos sobre la acción de AHs soluble en MØ en un contexto tumoral, ni tampoco su efecto sobre la capacidad angiogénica de estas células. Entonces, una vez que se detectó que los AHs no disminuyen la viabilidad de Mo/MØ se continuó evaluando la modulación inmunológica que estos ejercen. Como se mostró en la parte I, en nuestro diseño experimental no se pudo detectar cambios en los marcadores de superficie en Mo/MØ, por lo tanto, para esta parte se evaluó la biosíntesis de ciertas citoquinas involucradas no solo en su acción inmunológica sino también por sus efectos en la angiogénesis. Tal es el caso de TGF-1β, la cual es una citoquina con una acción antiinflamatoria y a su vez en un contexto tumoral es capaz de inducir un efecto pro angiogénico (125). Por otra parte, IL-1β es el principal mediador de la respuesta inflamatoria Mo/MØ y también es un potente inductor de la angiogénesis tumoral (126, 127). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se observó que en un contexto de carcinoma mamario los Mo/MØ tratados con AHs3 produjeron una disminución en la síntesis de TGF-1β; no obstante, esta disminución no se observó al detectar la forma activa de TGF-1β. En este mismo contexto, no se observó una modulación de los niveles de IL-1β; sin embargo, se observó una tendencia a disminuir en el tratamiento con AHs3. Estos resultados de TGF-1β e IL-1β indicarían que AHs3 induciría en Mo/MØ una reducción en la angiogénesis tumoral en un contexto de carcinoma mamario. En el caso de un contexto de carcinoma pulmonar, los tratamientos con AHs no modularon la expresión de estas citoquinas en Mo/MØ. Sorpresivamente, en el caso de un contexto de carcinoma colorrectal se observó que ambos tratamientos de AHs indujeron una disminución de la síntesis de IL-1β en Mo/MØ, el contexto tumoral esta citoquina tiene amplios efectos pro-tumorales. Si bien más estudios son necesarios para afirmarlo, se podría hipotetizar que AHs en un contexto de carcinoma colorrectal reduce la acción de esta citoquina y serán necesarios establecer el impacto en la progresión del tumor.

Como se discutió ampliamente a lo largo de esta tesis, está demostrado que los MØ, además de su rol inmunológico, modulan la angiogenesis tumoral. Por otro lado, tanto en esta tesis como en estudios previos se observó un rol anti-angiogenico del AHs en células tumorales. Teniendo todo esto en cuenta, resulta pertinente evaluar la accion de AHs1 y AHs3 sobre el

comportamiento angiogénico de Mo/MØ en un contexto tumoral. Es interesante destacar, que los Mo/MØ en un contexto de MDA-MB-231 y tratados con AHs1 o AHs3 no presentaron expresión de factores angiogénicos, disminuyeron la quimiotaxis de CE y en un modelo *in vivo* también redujeron la vasculatura tumoral. Indicando que, en este contexto de carcinoma mamario, AHs1 y AHs3 indujeron en Mo/MØ una respuesta anti-angiogénica. Estos resultados indican que ambos AHs ejercen una acción antiangiogénica sobre los Mo/MØ en un contexto de carcinoma mamario.

Por otro lado, en la parte I de la tesis se reportó que el AH APM inducía un comportamiento proangiogénico en Mo/MØ en cáncer de mama y al mismo tiempo disminuyó los niveles del complejo TSG-6·HC. Estudios previos, además, reportan que TSG-6 si bien no es un promotor de la angiogénesis, la regula indirectamente (56, 60). Teniendo en cuenta estos antecedentes se analizaron los niveles de TSG-6 por western blot y aquellos Mo/MØ tratados con MC de MDA-MB-231 en conjunto con AHs3 aumentó el complejo TSG-6·HC y una disminución de TSG-6 libre. Estos resultados indican nuevamente una posible relación entre la disminución de su comportamiento angiogénico y una modulación de TSG-6. En cuanto al ensayo *in vivo* demuestra también que en modelos tumorales de MDA-MB-231, aquellos ratones a los que se les inoculó Mo/MØ tratados previamente AHs1 o AHs3 decrecieron tanto los niveles de TSG-6 como de AH total, al mismo tiempo que disminuyó la vasculatura tumoral. En definitiva, en esta última parte de la tesis se demuestra que AHs modula negativamente el comportamiento angiogénico en Mo/MØ en un contexto de carcinoma mamario y al mismo tiempo desregula los niveles de TSG-6 tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

6. CONCLUSIONES GENERALES

A) En un contexto de carcinoma mamario el tratamiento con AH APM sobre Mo/MØ:

i) estimuló su capacidad angiogénica; ii) moduló la expresión de ciertos receptores de AH como CD44 y TLR-4; y iii) moduló los niveles de TSG-6, una proteína de unión al AH. Este tratamiento en un contexto de carcinoma colorrectal no desencadenó dichos efectos. En cuanto a los derivados sulfatados de AH (AHs1 y AHs3) modularon negativamente la angiogénesis en células tumorales y Mo/MØ en un contexto de carcinoma mamario, en menor medida en carcinoma pulmonar; pero no en un contexto de carcinoma colorrectal. Por lo tanto, como conclusión general del trabajo es posible postular que los tratamientos con AH exógeno de alto peso molecular (AH APM) o químicamente modificados con distintos grados de sulfatación (AHs1, AHs3) son capaces de modular la respuesta angiogénica de los Mo/MØ dependiendo del tipo tumoral con el que se encuentran. Así como también modular proteínas de unión al AH que son capaces de regular su función y estructura, como TSG-6 que probablemente en este contexto tenga una acción regulatoria de la respuesta angiogénica de estas células.

B) Además, los dos tipos de AHs podrían ejercer un rol antitumoral y antiangiogénico tanto en células tumorales, así como en Mo/MØ de un contexto de carcinoma mamario. Estos resultados son de gran interés ya que permitirían complementar y aumentar el éxito de los agentes antiangiogénicos e inmunológicos en las quimioterapias actuales, principalmente en cáncer de mama. En otros tipos de tumores, más estudios serían necesarios para validar este efecto.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. H. Patel, P. Nilendu, D. Jahagirdar, J. K. Pal, N. K. Sharma, Modulating secreted components of tumor microenvironment: A masterstroke in tumor therapeutics. *Cancer Biol Ther* **19**, 3 (Jan 2, 2018).
2. M. J. Bissell, W. C. Hines, Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* **17**, 320 (Mar, 2011).
3. F. Fan, A. Schimming, D. Jaeger, K. Podar, Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol* **2012**, 281261 (2012).
4. W. Zou, Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* **5**, 263 (Apr, 2005).
5. M. J. Bissell, D. C. Radisky, A. Rizki, V. M. Weaver, O. W. Petersen, The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* **70**, 537 (Dec, 2002).
6. B. P. Toole, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature reviews. Cancer* **4**, 528 (Jul, 2004).
7. D. Jiang, J. Liang, P. W. Noble, Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual review of cell and developmental biology* **23**, 435 (2007).
8. C. Shi, E. G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762 (Oct 10, 2011).
9. P. Italiani, D. Boraschi, From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* **5**, 514 (2014).
10. B. Ruffell, L. M. Coussens, Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462 (Apr 13, 2015).
11. D. M. Mosser, J. P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958 (Dec, 2008).
12. L. Cassetta, J. W. Pollard, Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 887 (Dec, 2018).
13. A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, P. Allavena, Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399 (Jul, 2017).
14. T. Chanmee, P. Ontong, N. Itano, Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer Lett* **375**, 20 (May 28, 2016).
15. S. K. Biswas, A. Mantovani, Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889 (Oct, 2010).
16. M. Potente, H. Gerhardt, P. Carmeliet, Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873 (Sep 16, 2011).
17. N. Ferrara, Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 21 (Feb, 2010).
18. F. Mac Gabhann, A. S. Popel, Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* **15**, 715 (Nov, 2008).
19. P. Carmeliet, VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**, 4 (2005).
20. B. Z. Qian, J. W. Pollard, Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39 (Apr 2, 2010).
21. A. Zumsteg, G. Christofori, Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol* **21**, 60 (Jan, 2009).
22. C. Murdoch, M. Muthana, S. B. Coffelt, C. E. Lewis, The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 618 (Aug, 2008).

23. V. C. Hascall, The journey of hyaluronan research in the Journal of Biological Chemistry. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 1690 (February 1, 2019, 2019).
24. F. M. Spinelli, D. L. Vitale, G. Demarchi, C. Cristina, L. Alaniz, The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clin Transl Immunology* **4**, e52 (Dec, 2015).
25. P. W. Noble, Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* **21**, 25 (Jan, 2002).
26. R. K. Boregowda *et al.*, Expression of hyaluronan in human tumor progression. *J Carcinog* **5**, 2 (2006).
27. S. Misra, S. Ghatak, B. P. Toole, Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J Biol Chem* **280**, 20310 (May 27, 2005).
28. L. Alaniz, M. Garcia, M. Rizzo, F. Piccioni, G. Mazzolini, Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective. *Mini reviews in medicinal chemistry* **9**, 1538 (Nov 1, 2009).
29. C. C. Termeer *et al.*, Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* **165**, 1863 (Aug 15, 2000).
30. A. Josefsson *et al.*, Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome. *Am J Pathol* **179**, 1961 (Oct, 2011).
31. P. Auvinen *et al.*, Increased hyaluronan content and stromal cell CD44 associate with HER2 positivity and poor prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* **132**, 531 (Feb 1, 2013).
32. F. M. Spinelli *et al.*, Hyaluronan preconditioning of monocytes/macrophages affects their angiogenic behavior and regulation of TSG-6 expression in a tumor type-specific manner. *FEBS J*, (May 1, 2019).
33. P. Heldin *et al.*, Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem* **154**, 395 (Nov, 2013).
34. A. Passi, D. Vigetti, S. Buraschi, R. V. Iozzo, Dissecting the role of hyaluronan synthases in the tumor microenvironment. *FEBS J* **286**, 2937 (Aug, 2019).
35. N. Itano *et al.*, Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **274**, 25085 (Aug 27, 1999).
36. P. H. Weigel, V. C. Hascall, M. Tammi, Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* **272**, 13997 (May 30, 1997).
37. H. Itano *et al.*, Partial liquid ventilation for acute allograft dysfunction after canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg* **67**, 332 (Feb, 1999).
38. N. Itano, K. Kimata, Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* **54**, 195 (Oct, 2002).
39. Y. H. Kim *et al.*, Hyaluronic acid synthase 2 promotes malignant phenotypes of colorectal cancer cells through transforming growth factor beta signaling. *Cancer Sci* **110**, 2226 (Jul, 2019).
40. N. Nguyen, A. Kumar, S. Chacko, R. J. Ouellette, A. Ghosh, Human hyaluronic acid synthase-1 promotes malignant transformation via epithelial-to-mesenchymal transition, micronucleation and centrosome abnormalities. *Cell Commun Signal* **15**, 48 (Nov 14, 2017).
41. H. Yabushita *et al.*, Hyaluronan synthase expression in ovarian cancer. *Oncol Rep* **12**, 739 (Oct, 2004).
42. R. Golshani *et al.*, Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer Res* **68**, 483 (Jan 15, 2008).
43. V. K. Sa *et al.*, Hyaluronidases and hyaluronan synthases expression is inversely correlated with malignancy in lung/bronchial pre-neoplastic and neoplastic lesions, affecting prognosis. *Braz J Med Biol Res* **48**, 1039 (Nov, 2015).

44. Y. Li, L. Li, T. J. Brown, P. Heldin, Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *Int J Cancer* **120**, 2557 (Jun 15, 2007).
45. M. W. Kramer *et al.*, HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur Urol* **57**, 86 (Jan, 2010).
46. V. B. Lokeshwar *et al.*, Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* **276**, 11922 (Apr 13, 2001).
47. C. Velesiotis, S. Vasileiou, D. H. Vynios, A guide to hyaluronan and related enzymes in breast cancer: biological significance and diagnostic value. *FEBS J* **286**, 3057 (Aug, 2019).
48. V. K. de Sa *et al.*, Role of the extracellular matrix in variations of invasive pathways in lung cancers. *Braz J Med Biol Res* **46**, 21 (Jan, 2013).
49. N. Junker, S. Latini, L. N. Petersen, P. E. Kristjansen, Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol Rep* **10**, 609 (May-Jun, 2003).
50. G. Borland, J. A. Ross, K. Guy, Forms and functions of CD44. *Immunology* **93**, 139 (Feb, 1998).
51. Z. Yu, T. G. Pestell, M. P. Lisanti, R. G. Pestell, Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 2144 (Dec, 2012).
52. S. Garantziotis, R. C. Savani, Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol* **78-79**, 1 (May, 2019).
53. L. Y. Bourguignon *et al.*, Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 1356 (Jun, 2006).
54. C. Termeer *et al.*, Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99 (Jan 7, 2002).
55. L. Y. Bourguignon, G. Wong, C. A. Earle, W. Xia, Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFkappaB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 671 (Dec, 2011).
56. A. J. Day, C. M. Milner, TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol* **78-79**, 60 (May, 2019).
57. M. S. Rugg *et al.*, Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *J Biol Chem* **280**, 25674 (Jul 8, 2005).
58. D. C. Briggs *et al.*, Metal Ion-dependent Heavy Chain Transfer Activity of TSG-6 Mediates Assembly of the Cumulus-Oocyte Matrix. *J Biol Chem* **290**, 28708 (Nov 27, 2015).
59. H. He, S. Zhang, S. Tighe, J. Son, S. C. Tseng, Immobilized heavy chain-hyaluronic acid polarizes lipopolysaccharide-activated macrophages toward M2 phenotype. *J Biol Chem* **288**, 25792 (Sep 6, 2013).
60. D. Leali *et al.*, Long pentraxin 3/tumor necrosis factor-stimulated gene-6 interaction: a biological rheostat for fibroblast growth factor 2-mediated angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 696 (Mar, 2012).
61. R. I. Cordo Russo *et al.*, Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *Int J Cancer* **122**, 1012 (Mar 1, 2008).
62. V. B. Lokeshwar *et al.*, Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res* **70**, 2613 (Apr 1, 2010).
63. S. Misra, S. Ghatak, A. Zoltan-Jones, B. P. Toole, Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* **278**, 25285 (Jul 11, 2003).
64. R. H. Tammi *et al.*, Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* **18**, 288 (Aug, 2008).

65. B. Delpech *et al.*, Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. *Int J Cancer* **46**, 388 (Sep 15, 1990).
66. R. S. Yahya, A. A. El-Bindary, H. A. El-Mezayen, H. M. Abdelmaseh, M. A. Eissa, Biochemical evaluation of hyaluronic acid in breast cancer. *Clin Lab* **60**, 1115 (2014).
67. L. Alaniz *et al.*, Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response. *Cancer Lett* **278**, 9 (Jun 8, 2009).
68. A. T. Rowley, R. R. Nagalla, S. W. Wang, W. F. Liu, Extracellular Matrix-Based Strategies for Immunomodulatory Biomaterials Engineering. *Adv Healthc Mater* **8**, e1801578 (Apr, 2019).
69. J. E. Rayahin, J. S. Buhrman, Y. Zhang, T. J. Koh, R. A. Gemeinhart, High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng* **1**, 481 (Jul 13, 2015).
70. S. Tiainen *et al.*, High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology* **66**, 873 (May, 2015).
71. N. Kobayashi *et al.*, Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res* **70**, 7073 (Sep 15, 2010).
72. C. E. Clarkin, S. Allen, C. P. Wheeler-Jones, E. R. Bastow, A. A. Pitsillides, Reduced chondrogenic matrix accumulation by 4-methylumbelliferone reveals the potential for selective targeting of UDP-glucose dehydrogenase. *Matrix Biol* **30**, 163 (Apr, 2011).
73. I. Kakizaki *et al.*, Inhibition of hyaluronan synthesis in *Streptococcus equi* FM100 by 4-methylumbelliferone. *Eur J Biochem* **269**, 5066 (Oct, 2002).
74. H. Morohashi *et al.*, Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1454 (Jul 14, 2006).
75. V. B. Lokeshwar, S. Mirza, A. Jordan, Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy. *Adv Cancer Res* **123**, 35 (2014).
76. G. Baumgartner, C. Gomar-Hoss, L. Sakr, E. Ulsperger, C. Wogritsch, The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* **131**, 85 (Sep 11, 1998).
77. K. Pillwein *et al.*, Hyaluronidase additional to standard chemotherapy improves outcome for children with malignant brain tumors. *Cancer Lett* **131**, 101 (Sep 11, 1998).
78. J. Klocker, H. Sabitzer, W. Raunik, S. Wieser, J. Schumer, Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett* **131**, 113 (Sep 11, 1998).
79. C. J. Whatcott, H. Han, R. G. Posner, G. Hostetter, D. D. Von Hoff, Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look. *Cancer Discov* **1**, 291 (Sep, 2011).
80. C. B. Thompson *et al.*, Enzymatic Depletion of Tumor Hyaluronan Induces Antitumor Responses in Preclinical Animal Models. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 3052 (2010).
81. G. Huang, H. Huang, Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv* **25**, 766 (Nov, 2018).
82. J. H. Kim, M. J. Moon, D. Y. Kim, S. H. Heo, Y. Y. Jeong, Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers (Basel)* **10**, (Oct 12, 2018).
83. T. Ioyama *et al.*, Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. *Glycobiology* **16**, 11 (Jan, 2006).
84. A. Benitez *et al.*, Targeting hyaluronidase for cancer therapy: antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res* **71**, 4085 (Jun 15, 2011).

85. A. R. Jordan *et al.*, Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer. *Oncotarget* **8**, 24262 (Apr 11, 2017).
86. D. K. Lim, R. G. Wylie, R. Langer, D. S. Kohane, Selective binding of C-6 OH sulfated hyaluronic acid to the angiogenic isoform of VEGF(165). *Biomaterials* **77**, 130 (Jan, 2016).
87. S. Franz *et al.*, Artificial extracellular matrices composed of collagen I and high-sulfated hyaluronan promote phenotypic and functional modulation of human pro-inflammatory M1 macrophages. *Acta Biomater* **9**, 5621 (Mar, 2013).
88. F. Jouy *et al.*, Sulfated hyaluronan attenuates inflammatory signaling pathways in macrophages involving induction of antioxidants. *Proteomics* **17**, e1700082 (May, 2017).
89. J. Kajahn *et al.*, Artificial extracellular matrices composed of collagen I and high sulfated hyaluronan modulate monocyte to macrophage differentiation under conditions of sterile inflammation. *Biomatter* **2**, 226 (Oct-Dec, 2012).
90. F. Oliviero *et al.*, IL-1ss and IL-8 are scavenged by the hexadecylamide derivative of hyaluronic acid: a new mechanism. *Journal of biomedical materials research. Part A* **103**, 2823 (Sep, 2015).
91. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248 (May 7, 1976).
92. R. Foty, A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*, (May 6, 2011).
93. E. C. Costa *et al.*, 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv* **34**, 1427 (Dec, 2016).
94. M. A. Simpson, Hyaluronan Pericellular Matrix: Particle Exclusion Assay. *Methods Mol Biol* **1952**, 103 (2019).
95. J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesompele, qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**, R19 (2007).
96. S. Davis, P. S. Meltzer, GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* **23**, 1846 (Jul 15, 2007).
97. L. S. Ojalvo, W. King, D. Cox, J. W. Pollard, High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am J Pathol* **174**, 1048 (Mar, 2009).
98. R. Afik *et al.*, Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J Exp Med* **213**, 2315 (Oct 17, 2016).
99. L. Alaniz *et al.*, Modulation of matrix metalloproteinase-9 activity by hyaluronan is dependent on NF-kappaB activity in lymphoma cell lines with dissimilar invasive behavior. *Biochemical and biophysical research communications* **324**, 736 (Nov 12, 2004).
100. A. T. Feldman, D. Wolfe, Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol* **1180**, 31 (2014).
101. M. Pasarica *et al.*, Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* **58**, 718 (Mar, 2009).
102. E. I. Deryugina, J. P. Quigley, Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol* **44-46**, 94 (May-Jul, 2015).
103. A. J. Day, C. A. de la Motte, Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends in immunology* **26**, 637 (Dec, 2005).
104. A. J. Day, C. M. Milner, TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, (Jan 31, 2018).
105. S. Zhang, H. He, A. J. Day, S. C. Tseng, Constitutive expression of inter-alpha-inhibitor (IalphaI) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic

- membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex. *The Journal of biological chemistry* **287**, 12433 (Apr 6, 2012).
106. M. W. Pickup, J. K. Mouw, V. M. Weaver, The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **15**, 1243 (Dec, 2014).
 107. G. Zhang *et al.*, A novel role of breast cancer-derived hyaluronan on inducement of M2-like tumor-associated macrophages formation. *Oncimmunology* **5**, e1172154 (Jun, 2016).
 108. J. M. Cyphert, C. S. Trempus, S. Garantziotis, Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int J Cell Biol* **2015**, 563818 (2015).
 109. G. Bredholt *et al.*, Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* **6**, 39676 (Nov 24, 2015).
 110. D. E. Swinson *et al.*, Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung cancer* **37**, 235 (Sep, 2002).
 111. R. D. Leek, R. J. Landers, A. L. Harris, C. E. Lewis, Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *British journal of cancer* **79**, 991 (Feb, 1999).
 112. J. Xu *et al.*, Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol* **154**, 1069 (Sep 3, 2001).
 113. C. A. de la Motte, V. C. Hascall, J. Drazba, S. K. Bandyopadhyay, S. A. Strong, Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol* **163**, 121 (Jul, 2003).
 114. X. Zhong, B. Chen, Z. Yang, The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cell Physiol Biochem* **45**, 356 (2018).
 115. J. Choi, J. Gyamfi, H. Jang, J. S. Koo, The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol* **33**, 133 (Feb, 2018).
 116. J. X. Tan *et al.*, HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer* **128**, 1303 (Mar 15, 2011).
 117. M. Pavan *et al.*, A new potential spreading factor: *Streptomyces koganeiensis* hyaluronidase. A comparative study with bovine testes hyaluronidase and recombinant human hyaluronidase of the HA degradation in ECM. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 661 (Apr, 2016).
 118. V. B. Lokeshwar, W. H. Cerwinka, B. L. Lokeshwar, HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* **65**, 2243 (Mar 15, 2005).
 119. C. O. McAtee *et al.*, Hyaluronidase Hyal1 Increases Tumor Cell Proliferation and Motility through Accelerated Vesicle Trafficking. *J Biol Chem* **290**, 13144 (May 22, 2015).
 120. A. G. Bharadwaj *et al.*, Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am J Pathol* **174**, 1027 (Mar, 2009).
 121. M. Kapalczynska *et al.*, 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* **14**, 910 (Jun, 2018).
 122. N. Chaicharoenaudomrung, P. Kunhorm, P. Noisa, Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells* **11**, 1065 (Dec 26, 2019).
 123. R. C. Dandekar, A. V. Kingaonkar, G. S. Dhabekar, Role of macrophages in malignancy. *Ann Maxillofac Surg* **1**, 150 (Jul, 2011).
 124. H. Jeong, I. Hwang, S. H. Kang, H. C. Shin, S. Y. Kwon, Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer* **22**, 38 (Mar, 2019).
 125. S. Liu, S. Chen, J. Zeng, TGFbeta signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Mol Med Rep* **17**, 699 (Jan, 2018).

126. A. Mantovani, I. Barajon, C. Garlanda, IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev* **281**, 57 (Jan, 2018).
127. E. Voronov, Y. Carmi, R. N. Apte, The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol* **5**, 114 (2014).