

FORMULARIO II

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, NATURALES Y AMBIENTALES

PRESENTACIÓN DEL INFORME DEL TRABAJO FINAL PARA LICENCIATURA EN GENÉTICA

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

Me dirijo a Ud. a fin de solicitar la evaluación del Informe del Trabajo Final de la Carrera de Licenciatura en Genética.

Lugar y fecha: Pergamino, 16 de febrero de 2024

Firma y aclaración del Alumno:



Candela Morán Maidana

Firma y aclaración del Director:



Dra. Ina Sevic

Firma y aclaración del Codirector:

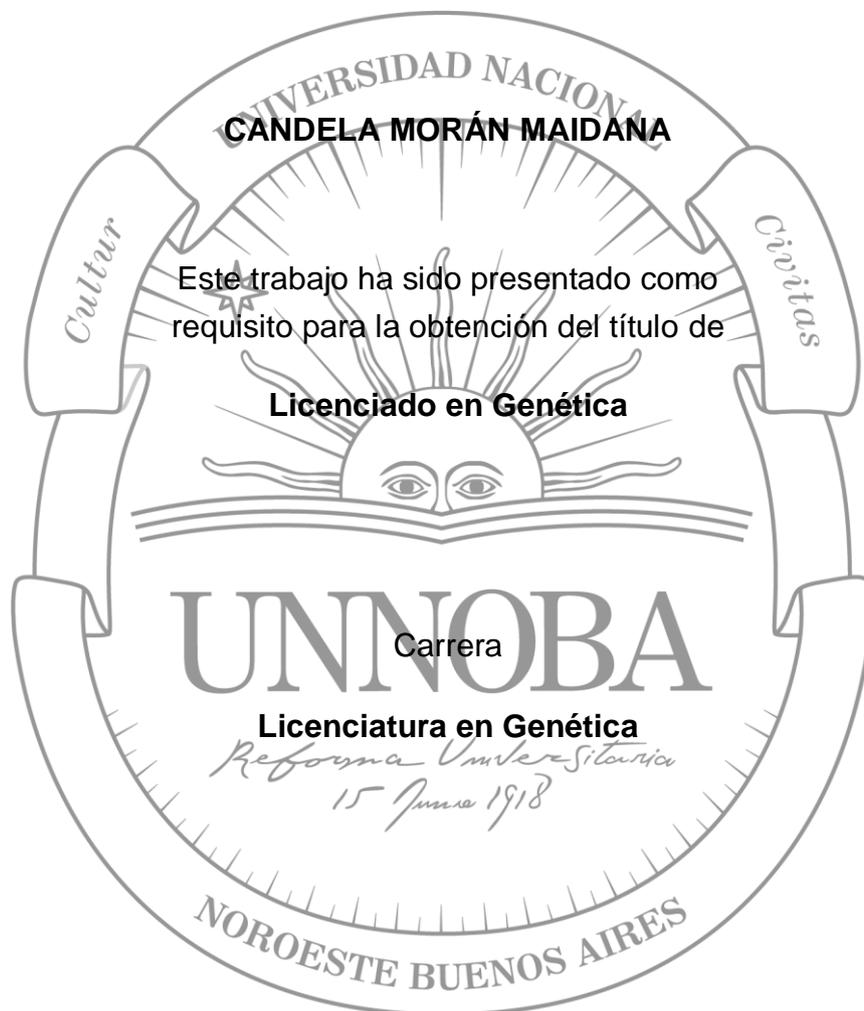


Dra. Daiana Vitale

**ESTUDIO DE COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE EN TUMORES HUMANOS:
ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO, GENES
INVOLUCRADOS EN SU METABOLISMO Y GENES DE REPARACIÓN DEL ADN EN
TEJIDO TUMORAL Y NO TUMORAL.**

Trabajo Final de Grado

de la alumna



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

Pergamino, 16 de febrero de 2024

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trayecto académico y personal, he contado con el apoyo de muchas personas e instituciones que merecen mi agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires (UNNOBA), por brindarme una formación académica de calidad y por permitirme crecer tanto académica como personalmente.

Al Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA) por recibirme con cariño y por brindarme todas las herramientas para poder realizar mi trabajo final de grado y culminar mis estudios. Especialmente a mi directora, Ina Sevic, y a mi codirectora, Daiana Vitale, por su compromiso constante, por apoyarme y orientarme en cada momento, han sido pilares fundamentales en cada etapa de este proceso. A Laura Alaniz, por brindarme la posibilidad ser parte del Laboratorio de Microambiente Tumoral, y a cada una de las personas con las que día a día compartimos el espacio, con quienes el trabajo diario en el laboratorio no hubiera sido el mismo: a Anto, Pao, Mica y Ale.

A mis compañeros de cursada, los de Junín y los de Pergamino, por todos los buenos momentos que pasamos durante estos años de estudio. A los amigos que me dejó la Universidad: Lula, Nico, Maxi, Anto, Flor y Male, por los días de estudio, las cenas compartidas y cada uno de los momentos vividos. Su amistad, comprensión y apoyo han hecho que este recorrido sea más llevadero.

A toda mi familia, y en especial a mis papas, Julián y Delia, y a mi hermana, Emilia, por el apoyo incondicional, por contenerme y ayudarme en cada momento. Apostaron por mí, y hoy estoy feliz de que me puedan ver concluir esta etapa tan importante de mi vida. Este logro no solo es un reflejo de mi esfuerzo, sino también de su incansable dedicación.

A mi novio, Julián, por creer en mí, crecer juntos y acompañarme incondicionalmente en cada momento, por escucharme y apoyarme en cada momento. A su familia, por el cariño y el apoyo que me han brindado durante este tiempo.

Quiero agradecer a cada una de las personas que, de una forma u otra, se han cruzado en mi camino y han hecho de esta etapa algo inolvidable. Gracias por su confianza, por su apoyo y por su amor.

ÍNDICE GENERAL

• Índice de figuras y tablas.....	8
• Abreviaturas	11
• Resumen.....	13
• Introducción.....	15
1. Cáncer	15
1.1. Definición y epidemiología.....	15
1.2. Cáncer colorrectal.....	15
1.3. Cáncer de mama.....	18
1.4. Genes de reparación del ADN en cáncer.....	21
2. Microambiente tumoral.....	22
2.1. Matriz extracelular tumoral.....	22
2.1.1. Ácido hialurónico.....	23
2.1.1.1. Metabolismo del ácido hialurónico.....	25
2.1.1.1.1. Biosíntesis del ácido hialurónico.....	26
2.1.1.1.2. Degradación del ácido hialurónico.....	28
2.1.1.1.3. Receptores de ácido hialurónico.....	30
2.1.2. Implicancia de la expresión de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> asociada a cambios en la matriz extracelular.....	30
• Hipótesis y objetivos.....	32
1. Hipótesis.....	33
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo general.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
2.2.1. Con muestras de pacientes oncológicos.....	33

2.2.2. En cultivo celular.....	34
• Materiales y métodos.....	35
1. Muestras de pacientes oncológicos.....	36
1.1. Obtención de muestras.....	36
1.2. Descripción de pacientes.....	36
1.3. Procesamiento de muestras.....	37
1.3.1. Preparación de muestras.....	37
1.3.2. Extracción de ARNm y retrotranscripción.....	38
1.3.3. Análisis de la expresión de AH, de genes implicados en su metabolismo (<i>CD44</i> , <i>HAS2</i> e <i>HYAL1</i>) y de reparación del ADN (<i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>)	39
1.3.3.1. RT-qPCR.....	39
1.3.3.2. Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de AH.....	39
1.3.3.3. Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de CD44.....	40
1.3.3.4. Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de BRCA1 y BRCA2....	41
2. Cultivo celular	42
2.1. Líneas celulares.....	42
2.2. Ensayo de formación de tumorosferas <i>in vitro</i>	42
2.2.1. Puesta a punto del ensayo de formación de tumorosferas.....	43
2.2.1.1. MDA-MB-231.....	43
2.2.1.2. MCF-7.....	44
2.2.1.3. Caco-2.....	45
2.2.1.4. Ensayo de viabilidad celular.....	46
2.2.1.5. Condiciones establecidas para el ensayo de formación de tumorosferas.....	47
2.2.2. Ensayo de formación de tumorosferas <i>in vitro</i>	47
2.2.2.1. Determinación de volumen y área.....	47
2.2.2.2. Extracción de ARNm y retrotranscripción.....	48

2.2.2.3. Análisis de genes involucrados en el metabolismo de AH (<i>CD44</i> , <i>HAS2</i> e <i>HYAL1</i>) y de reparación del ADN (<i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>) en tumorosferas.....	49
2.2.2.3.1. RT-qPCR.....	49
3. Análisis <i>in silico</i> de interacción de proteínas	51
4. Análisis estadístico	51
• Resultados	52
1. Muestras de pacientes oncológicos.....	53
1.1. Análisis de la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN y en el metabolismo de AH en pacientes con cáncer colorrectal.....	54
1.2. Análisis de la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN y en el metabolismo de AH en pacientes con cáncer de mama.....	59
1.3. Análisis de los niveles de AH en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama.....	63
1.4. Análisis de los niveles proteicos de CD44 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama.....	67
1.5. Análisis de los niveles proteicos de BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama.....	70
1.5.1. Análisis de los niveles proteicos de BRCA1 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama.....	70
1.5.2. Análisis de los niveles proteicos de BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama.....	74
1.6. Análisis de correlación de los marcadores evaluados.....	77
2. Cultivo celular	82
2.1. Ensayo de viabilidad celular.....	82
2.2. Volumen y área de tumorosferas.....	84
2.3. Análisis del ARNm.....	91
3. Análisis <i>in silico</i> de interacción de proteínas	96
• Discusión	99

- **Conclusión**.....110
- **Referencias bibliográficas** 111

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

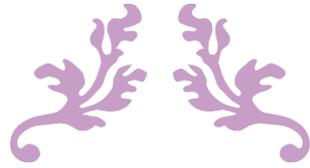
Figura 1. Esquematación de la anatomía del colon.	16
Figura 2. Esquematación de la anatomía de la mama.	18
Figura 3. Estructura molecular del ácido hialurónico	24
Figura 4. Metabolismo del AH.....	26
Figura 5. Ilustración esquemática de la biosíntesis del AH.....	28
Figura 6. Ilustración esquemática de la degradación de AH.....	29
Figura 7. Metodología para el procesamiento de muestras de pacientes con cáncer de mama o cáncer colorrectal.	38
Figura 8. Formación de tumorosferas de MDA-MB-231	44
Figura 9. Formación de tumorosferas de MCF-7.....	45
Figura 10. Formación de tumorosferas de Caco-2.	46
Figura 11. Determinación de volumen y área de tumorosferas <i>in vitro</i>	48
Figura 12. Análisis de genes involucrados en el metabolismo de AH y de reparación del ADN en tumorosferas	50
Figura 13. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en pacientes con cáncer colorrectal.....	56
Figura 14. Niveles de ARNm en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninos, (b) masculinos, (c) en estadio T3 y (d) en estadio N0.....	58
Figura 15. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en pacientes con cáncer de mama.	60
Figura 16. Niveles de ARNm en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 y (e) estadio N0.....	62
Figura 17. Inmunofluorescencia contra AH en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal.	64
Figura 18. Inmunofluorescencia contra AH en tejidos de pacientes con cáncer de mama.	65
Figura 19. Niveles de AH en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninos, (b) masculinos, (c) en estadio T3 y (d) en estadio N0.	66

Figura 20. Niveles de AH en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 Y (e) en estadio N0.	66
Figura 21. Inmunofluorescencia contra CD44 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal.	68
Figura 22. Inmunofluorescencia contra CD44 en tejidos de pacientes con cáncer de mama.....	69
Figura 23. Niveles de CD44 en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 y (e) estadio N0.....	70
Figura 24. Inmunofluorescencia contra BRCA1 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal.	72
Figura 25. Inmunofluorescencia contra BRCA1 en tejidos de pacientes con cáncer de mama	73
Figura 26. Inmunofluorescencia contra BRCA2 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal.	75
Figura 27. Inmunofluorescencia contra BRCA2 en tejidos de pacientes con cáncer de mama.	76
Figura 28. Niveles de BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninos, (b) masculinos, (c) estadio T3 y (d) estadio N0.	77
Figura 29. Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y valores <i>p</i> asociados.....	78
Figura 30. Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama y valores <i>p</i> asociados.....	79
Figura 31. Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y valores <i>p</i> asociados.....	80
Figura 32. Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama y valores <i>p</i> asociados.....	81
Figura 33. Ensayo de viabilidad celular de MDA-MB-231.....	82
Figura 34. Ensayo de viabilidad celular de MCF-7.....	83
Figura 35. Ensayo de viabilidad celular de Caco-2.	84
Figura 36. Crecimiento tridimensional de tumorosferas de MDA-MB-231 por método de gota colgante.	86
Figura 37. Volumen y área de tumorosferas de MDA-MB-231	87
Figura 38. Crecimiento tridimensional de tumorosferas de MCF-7 por método de gota colgante .	88
Figura 39. Volumen y área de tumorosferas de MCF-7.....	89

Figura 40. Crecimiento tridimensional de tumorosferas de Caco-2 por método de gota colgante .	90
Figura 41. Volumen y área de tumorosferas de Caco-2	91
Figura 42. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células MDA-MB-231	93
Figura 43. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células MCF-7.....	94
Figura 44. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células Caco-2	95
Figura 45. La compleja red de proteínas involucradas en el metabolismo de AH y la reparación del ADN	97
Tabla 1. Categorías T y criterios para cáncer colorrectal.....	17
Tabla 2. Categorías N y criterios para cáncer colorrectal.	17
Tabla 3. Categorías M y criterios para cáncer colorrectal	17
Tabla 4. Categorías T y criterios para cáncer de mama.....	19
Tabla 5. Categorías N y criterios para cáncer de mama	19
Tabla 6. Categorías M y criterios para cáncer de mama	19
Tabla 7. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores más utilizados y su asociación con subtipos moleculares para cáncer de mama.....	20
Tabla 8. Grado de Nottingham asociado a resultados obtenidos al sumar las calificaciones asignadas para formación de estructuras glandulares/tubulares, el pleomorfismo nuclear y la tasa mitótica.	21
Tabla 9. Datos de los pacientes tenidos en cuenta en el estudio.	37
Tabla 10. Lista de cebadores utilizados en el estudio.	50
Tabla 11. Datos clínicos de los pacientes con cáncer colorrectal tenidos en cuenta en el estudio.	53
Tabla 12. Datos clínicos de los pacientes con cáncer de mama tenidos en cuenta en el estudio....	54
Tabla 13. Resumen de los resultados para pacientes con cáncer colorrectal.	57
Tabla 14. Resumen de los resultados para pacientes con cáncer de mama.	61
Tabla 15. Resumen de los resultados para las tres líneas celulares.....	92

ABREVIATURAS

- *4-MU: 4-Metilumbeliferona*
- *AH APM: Ácido hialurónico de alto peso molecular*
- *AH BPM: Ácido hialurónico de bajo peso molecular*
- *AH: Ácido hialurónico*
- *ARNm: ARN mensajero*
- *GAGs: Glicosaminoglicanos*
- *H&E: Hematoxilina y eosina*
- *HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico*
- *HYAL: Hialuronidasa*
- *HABP: Proteína de unión a ácido hialurónico*
- *MAT: Microambiente tumoral*
- *MEC: Matriz extracelular*
- *NAT: No tumoral adyacente al tumor*
- *oAH: Oligómeros de ácido hialurónico*
- *PM: Peso molecular*
- *RE: Receptor de estrógenos*
- *RP: Receptor de progesterona*
- *RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real*
- *RT-PCR: PCR en transcriptasa reversa*
- *SFB: suero fetal bovino*
- *TT: Tejido tumoral*
- *UDP-GlcNAc: UDP-N-acetil-D-glucosamina*
- *UDP-GlcUA: Ácido-UDP-glucurónico*



RESUMEN

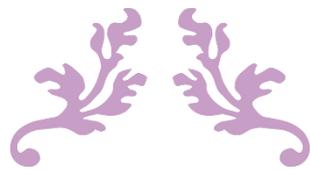


En los últimos años el cáncer ha experimentado un marcado aumento en las recurrencias, lo que se atribuye a su heterogeneidad y complejidad molecular. Esto podría explicar, al menos en parte, el fracaso en la eficacia del tratamiento de los pacientes con esta enfermedad. Por esta razón, es crucial el estudio de distintos marcadores que permitan predecir el desarrollo de la enfermedad y orientar posibles enfoques terapéuticos más personalizados.

El microambiente tumoral (MAT) es el conjunto de células y macromoléculas que rodean a una célula tumoral. El componente principal no celular del MAT es la matriz extracelular (MEC), una compleja red de macromoléculas que se encuentra altamente desregulada en el contexto tumoral. Entre los componentes de la MEC que están alterados en los tumores se encuentran el ácido hialurónico (AH) y las moléculas asociadas a su metabolismo. Por otra parte, se ha demostrado que los cambios en el MAT pueden provocar cambios en la expresión de algunos genes de relevancia en el desarrollo tumoral, como *BRCA1* y *BRCA2*. El objetivo de este trabajo fue analizar las modificaciones en la expresión de AH y de genes involucrados en su metabolismo en tejido tumoral (TT) y no tumoral adyacente al tumor (NAT) de pacientes con cáncer de mama y colorrectal, y su asociación con la expresión de genes de reparación del ADN (*BRCA1* y *BRCA2*) y con datos clínicos de los pacientes, además de analizar la expresión de estos genes en modelos tridimensionales de esferoides de líneas celulares de cáncer de mama y colon. La expresión de ARN mensajero (ARNm) fue evaluada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Por otro lado, los niveles de expresión de AH y de las proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 se analizaron mediante inmunohistoquímica. A su vez se analizó la expresión de estos mismos genes tras la degradación de AH o la inhibición de su síntesis en dos líneas celulares de cáncer de mama y una línea celular de cáncer de colon, evaluando a su vez su efecto sobre el volumen y área de los esferoides generados. Los pacientes con cáncer de mama mostraron menores niveles de ARNm de *HAS2*, una disminución de los niveles de proteínas BRCA1 y BRCA2 en TT con respecto a NAT y una fuerte correlación positiva entre el ARNm de *CD44* e *HYAL1*. Por otro lado, en cáncer colorrectal se obtuvo una disminución en los niveles proteicos de CD44 y BRCA1 en TT con respecto a NAT y una fuerte correlación positiva entre el ARNm de *BRCA1* y *BRCA2*, *BRCA1* y *HAS2* y *BRCA2* y *HAS2*, respaldando la importancia de los genes *BRCA* no solo en cáncer de mama, sino también en cáncer colorrectal. A su vez, se observó una disminución de volumen y área de los esferoides al inhibir la síntesis del AH.

Este trabajo presenta importante evidencia sobre la influencia del AH del MAT y de las moléculas asociadas a su metabolismo sobre los genes de reparación del ADN. Esto nos ayuda a comprender los complejos mecanismos moleculares que regulan la progresión tumoral, lo que resulta crucial para la identificación de marcadores clave para predecir el desarrollo de la enfermedad y orientar posibles enfoques terapéuticos.

Palabras claves: Microambiente tumoral, cáncer de mama, cáncer colorrectal, *BRCA1*, *BRCA2*, ácido hialurónico.



INTRODUCCIÓN



1. CÁNCER

1.1. Definición y epidemiología

El cáncer es una enfermedad con base multifactorial, que puede originarse en numerosas partes del organismo como consecuencia del crecimiento celular anormal y descontrolado, extendiéndose más allá de sus límites habituales. Estas células, denominadas células tumorales, son capaces de invadir el tejido circundante y provocan metástasis en puntos distantes del organismo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2023), el cáncer es considerado una de las principales causas de muerte poblacional a nivel mundial, reportando 9,3 millones de muertes en 2023. Si no se toman las medidas necesarias para prevenir y controlar el cáncer, se estima un alarmante aumento del 57% de casos de cáncer a nivel global y se prevé que el mayor incremento de casos se producirá en países de bajos y medianos ingresos. Esta tendencia se atribuye principalmente a la falta de recursos disponibles para tratar esta enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

En 2021, los tumores ocuparon la cuarta causa de mortalidad (14,3%) en Argentina (Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC), 2023). Entre 2012 y 2020, en mujeres, el cáncer de mama presentó la mayor frecuencia (31%), seguido por el cáncer de cuello de útero (20,9%) y colorrectal (6,9%). En hombres, el cáncer colorrectal fue el más frecuente (13,2%), seguido por el cáncer de pulmón (10,3%) y de próstata (9,2%) (Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC), s.f.). Por este motivo, el estudio de marcadores o factores biológicos que favorezcan la progresión de la enfermedad y las posibles fallas de los tratamientos es crucial para el desarrollo de terapias antitumorales eficaces. Las nuevas terapias en auge están dirigidas a frenar el crecimiento tumoral mediante la modulación de su entorno o microambiente, compuesto por diversos tipos celulares, factores solubles y moléculas.

1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el tipo de cáncer que afecta el colon (intestino grueso) o el recto. La anatomía del colon se esquematiza en la Figura 1.

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más frecuente a nivel global. Representa alrededor del 10% de todos los casos de cáncer y es la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo (World Health Organization, 2023a). En la mayoría de los casos de cáncer colorrectal se presenta el tipo adenocarcinoma. Este tipo de tumor se origina en las células que constituyen las glándulas responsables de producir el moco que lubrica el interior del colon y el recto.

Una de las clasificaciones más utilizadas para la caracterización del cáncer colorrectal es la clasificación TNM (Tumor, Ganglio linfático y Metástasis), establecida por el American Joint Committee on Cancer (AJCC). La misma categoriza a los pacientes según la extensión del tumor (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis distales (M) (Amin, et al., 2017). Las asignaciones de T, N y M se establecen mediante evaluación clínica y patológica. Los criterios utilizados para establecer el estadio TNM en cáncer colorrectal se detallan en la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3.

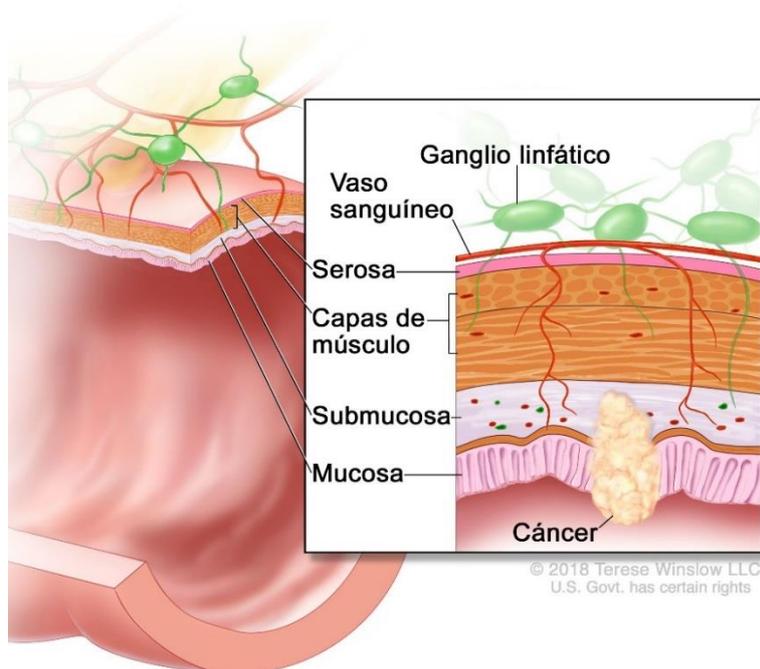


Figura 1. Esquemática de la anatomía del colon. En la figura se muestra esquemáticamente las diferentes capas que conforman el colon con presencia de cáncer en estadio 1. Tomado y adaptado de *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®) – Versión para profesionales de salud, 2024.*

Categoría T	Criterio
T0	Las células anormales están presentes, pero no se han diseminado al tejido adyacente.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> , carcinoma intramucoso (compromiso de la lámina propia sin diseminación a la capa muscular de la mucosa).
T1	Tumor con invasión de la submucosa (a través de la capa muscular de la mucosa, pero no dentro de la capa muscular propia).
T2	Tumor con invasión de la capa muscular propia.
T3	Tumor con invasión de los tejidos pericólicas a través de la capa muscular propia.
T4	Tumor con invasión del peritoneo visceral, o con invasión y adherencia a un órgano o estructura adyacente.

Tabla 1. Categorías T y criterios para cáncer colorrectal según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®) – Versión para profesionales de salud, 2024.*

Categoría N	Criterio
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1	Compromiso de 1 a 3 ganglios linfáticos regionales (tumor en los ganglios linfáticos regionales que mide $\geq 0,2$ mm), o cualquier cantidad de depósitos tumorales y todos los ganglios linfáticos identificables están libres de compromiso tumoral.
N2	Compromiso de 4 o más ganglios linfáticos regionales.
N3	Ganglios apicales o de troncos vasculares.

Tabla 2. Categorías N y criterios para cáncer colorrectal según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®) – Versión para profesionales de salud, 2024.*

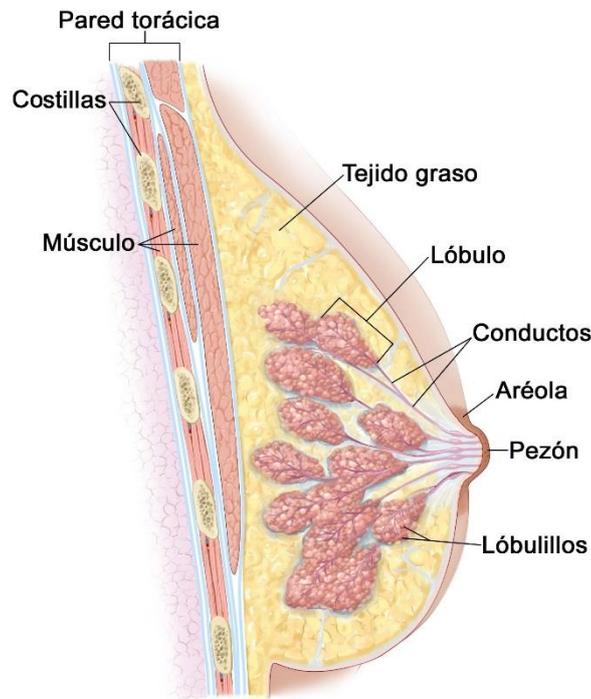
Categoría M	Criterio
M0	Sin indicios de metástasis a distancia en las pruebas con imágenes, etc.; sin indicios de tumor en sitios u órganos distantes.
M1	Hay propagación hacia tejidos u órganos distantes.

Tabla 3. Categorías M y criterios para cáncer colorrectal según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®) – Versión para profesionales de salud, 2024.*

1.3. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control. La anatomía de la mama se esquematiza en la Figura 2. El tipo de cáncer de mama depende de qué células de la mama se vuelven tumorales. Los tipos más comunes de cáncer de mama son el cáncer ductal, que se origina en las células de revestimiento de los conductos (representando el 85% de los casos), y el cáncer lobulillar, que surge del tejido glandular mamario (constituyendo el 15%) (Organización Panamericana de la Salud, s.f.).

La clasificación TNM también es ampliamente utilizada para la categorización de los tipos de cáncer de mama, la cual se describe en la Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6.



© 2011 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

Figura 2. Esquematización de la anatomía de la mama. Tomado y adaptado de *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud, 2023.*

Categoría T	Criterio
T0	Las células anormales están presentes, pero no se han diseminado al tejido adyacente.
Tis	Carcinoma ductal <i>in situ</i> .
T1	Tumor ≤20 mm en su mayor dimensión.
T2	Tumor entre 20 mm y 50 mm en su mayor dimensión.
T3	Tumor >50 mm en su mayor dimensión.
T4	Tumor de cualquier tamaño con diseminación directa a la pared torácica o a la piel

Tabla 4. Categorías T y criterios para cáncer de mama según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud, 2023.*

Categoría N	Criterio
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1	Con metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y/o en ganglios linfáticos mamaros internos.
N2	Con metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares y/o ganglios linfáticos mamaros internos.
N3	≥10 ganglios linfáticos axilares, infra o supraclaviculares o mamaros internos.

Tabla 5. Categorías N y criterios para cáncer de mama según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud, 2023.*

Categoría M	Criterio
M0	Sin indicios clínicos ni radiológicos de metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia detectada en la evaluación clínica o radiológica.

Tabla 6. Categorías M y criterios para cáncer de mama según *Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud, 2023.*

Sin embargo, incluso cuando los pacientes presentan el mismo estadio de cáncer, pueden no presentar el mismo desarrollo de la enfermedad, pronóstico o respuesta a la terapia. Por este motivo, en cáncer de mama, los pacientes también se dividen en subgrupos basados en la expresión de receptores hormonales presentes en las células tumorales. Entre los biomarcadores tumorales más utilizados se encuentran: el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El marcador de proliferación celular Ki67 también suele utilizarse para clasificar a los pacientes según subtipos moleculares y se ha indicado que su expresión predice la progresión del cáncer (Panal Cusati, y otros, 2014). En la

Tabla 7 se muestran los subtipos moleculares asociados a los marcadores más utilizados para cáncer de mama.

	Luminales		HER2		Triple negativo	
Frecuencia	50%	15%	20%		15%	
Subtipo molecular	Luminal A	Luminal B	Luminal	Enriquecido	No basal	Basal
RE	+++	++	++	-	-	-
RP	+++	+/-	+/-	-	-	-
HER2	-	-	+++	+++	-	-
CK 5/6	-	-	-	-	-	+++
HER1	-	-	-	-	-	+++
Ki67	<14%	14-30%	>14%	Alto	Alto	Alto
Pronóstico	Bueno	Intermedio	Intermedio	Malo	Malo	Malo

Tabla 7. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores más utilizados y su asociación con subtipos moleculares para cáncer de mama según Horvath (2021).

Los pacientes con cáncer de mama triple negativo o HER2+ presentan, con frecuencia, peor evolución y menor supervivencia que los pacientes con cáncer de mama luminal A o luminal B (Kyndi, et al., 2008; Lam, Jimenez, & Boven, 2014). Varios informes indican que el cáncer de mama luminal A es el subtipo más común de cáncer de mama (Uribe, y otros, 2010; Calderón-Garcidueñas, et al., 2012, Pérez-Rodríguez, 2015). No obstante, existen otras formas de clasificar el cáncer de mama. Una de ellas es la clasificación según el grado histológico de Nottingham. Este sistema de clasificación se basa en la examinación microscópica del tejido tumoral, considerando factores como el porcentaje de área tumoral con formación de estructuras glandulares/tubulares, el pleomorfismo nuclear y la tasa mitótica. Para cada una de estas características se asigna una puntuación de 1 a 3 y finalmente se suman entre sí para determinar el grado de Nottingham. Una puntuación de "1" significa que las células y el tejido del tumor exhiben, en su mayoría, una apariencia similar a las células y tejido normales circundantes, y una puntuación de "3" indica que las células y el tejido del tumor presentan mayoritariamente características anómalas o diferentes en comparación con las células y tejido normales (Elston & Ellis, 1991). La Tabla 8 indica el grado de Nottingham asociado a los resultados obtenidos al sumar las calificaciones asignadas.

Grado de Nottingham	Suma de calificaciones asignadas
1	3-5
2	6-7
3	8-9

Tabla 8. Grado de Nottingham asociado a resultados obtenidos al sumar las calificaciones asignadas para formación de estructuras glandulares/tubulares, el pleomorfismo nuclear y la tasa mitótica. El tejido tumoral se examina microscópicamente y luego se asignan valores de 1 a 3 para las características mencionadas previamente y luego se suman entre sí para determinar el grado de Nottingham. Cuanto mayor sea el valor del grado de Nottingham, más diferencias presentan las células tumorales con respecto a las células normales del tejido.

1.4. Genes de reparación del ADN en cáncer

La reparación del ADN es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genética durante los sucesivos ciclos celulares. Las células tumorales a menudo tienen menor habilidad de reparación del ADN en comparación con las células normales, lo que puede causar la acumulación de mutaciones oncogénicas que contribuyen a la inestabilidad genómica (Eberst, et al., 2017).

BRCA1 y *BRCA2* son genes que actúan como supresores tumorales ya que codifican proteínas esenciales en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, una mutación en alguno de estos genes que provoque la pérdida de función de la proteína correspondiente, aumenta la probabilidad de que ocurran lesiones en el ADN potencialmente mutagénicas y, en consecuencia, aumenta el riesgo de carcinogénesis (Narod & Rodríguez, 2011; Gao, et al., 2016). Las mutaciones en estos genes están vinculadas principalmente con el cáncer de mama y ovario (Antoniou, et al., 2003; Narod & Foulkes, 2004; Chen, et al., 2006). Con frecuencia, estos genes no se asocian con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. No obstante, estudios recientes han indicado que los genes *BRCA* pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Phelan, et al., 2014; Fujita M, et al., 2022; Feng, et al., 2023). Por lo cual, el conocimiento del estado de expresión de los mismos podría ayudar a personalizar el tratamiento del cáncer colorrectal, por ejemplo, combinando el tratamiento estándar con agentes que dañen el ADN o inhibidores de PARP (poli ADP ribosa polimerasa) (Soyano, et al., 2018). PARP es una enzima con importancia en la reparación de roturas en el ADN de una sola hebra. Por lo tanto, los inhibidores de PARP causan la acumulación de daño en el ADN, lo que induce la muerte celular (Instituto Nacional del Cáncer, 2019).

2. MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral (MAT) es el conjunto de células (microambiente celular) y macromoléculas (microambiente no celular) que rodean a una célula tumoral. Durante el desarrollo tumoral, las células tumorales modifican el entorno en el que viven, favoreciendo su establecimiento y crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011; Lu, et al., 2012; Huang, et al., 2021). El componente principal del MAT es la matriz extracelular (MEC), una compleja red de macromoléculas (proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos) que presentan distintas propiedades físicas, bioquímicas y biomecánicas. El microambiente celular está compuesto por varios tipos celulares atraídos por la propia célula tumoral, principalmente células endoteliales, fibroblastos, eritrocitos y células del sistema inmune como macrófagos asociados a tumor, neutrófilos, células *natural killer* (NK), linfocitos B y T, entre otros. Por lo tanto, en el cáncer, la MEC se encuentra altamente desregulada y desorganizada (Walker, et al., 2018), lo que promueve la transformación celular y la metástasis. Es por esto que, para brindar un análisis integral de los mecanismos involucrados en el desarrollo tumoral, es necesario tener en cuenta las interacciones del tumor con su microambiente y no solo las características de las células tumorales individuales (Hanahan & Weinberg, 2011; Bizzarri, 2014; Resovi, et al., 2018).

2.1. Matriz extracelular tumoral

La MEC es una red compleja de proteínas fibrosas extracelulares (colágeno, fibronectina, elastina y laminina), glicosaminoglicanos (GAGs) (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de queratán y sulfato de heparán), proteoglicanos y glicoproteínas (Huang, et al., 2021). En condiciones fisiológicas, la composición y organización de la MEC están reguladas espaciotemporalmente para controlar el comportamiento celular. Sin embargo, la desregulación de la dinámica de la MEC puede conducir al desarrollo de ciertas patologías, como el cáncer (Walker, et al., 2018). La MEC tumoral

interactúa con las células tumorales y las del microambiente celular e induce señales inter e intracelulares (Fan, et al., 2012). Estas señales pueden estimular la proliferación celular desregulada, promover la migración, invasión y supervivencia de células endoteliales y otros tipos celulares (Davis & Senger, 2005; Andreuzzi, et al., 2020) y modular la respuesta inmunológica (Closset, et al., 2023) y angiogénica (Bissell, et al., 2002; Bizzarri, 2014; Mao, et al., 2021). Dado que la acción de estas respuestas puede inducir o impedir la progresión tumoral (Bruno, et al., 2014; Hänggi & Ruffell, 2023), surge la hipótesis de que ciertos factores tienen gran relevancia en la modulación del desarrollo tumoral. Entre los componentes de la MEC que están desregulados en el cáncer, se encuentra el ácido hialurónico (AH), el cual se describe a continuación.

2.1.1. Ácido hialurónico

Entre los componentes más abundantes de la MEC se encuentra la familia de los GAGs. Estos son heteropolisacáridos largos no ramificados, compuestos por disacáridos alternados de ácido urónico y aminoazúcares. El AH es un GAG no sulfatado, compuesto por unidades repetidas de disacáridos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, (Itano, 2008; Theocharis, et al., 2015; Hascall, 2019; Abatangelo, 2020). Por sus propiedades físico-químicas, contribuye a la hidratación, organización y sostén de los tejidos (Abatangelo, et al., 2020). Además, debido a su capacidad de unirse a proteínas específicas llamadas hialadherinas (Toole, 1990; Turley, et al., 2002), como los receptores de membrana CD44 (Clúster de diferenciación 44), RHAMM (Receptor de motilidad mediada por ácido hialurónico) y LYVE-1 (Receptor 1 de ácido hialurónico endotelial de vasos linfáticos). Por otro lado, puede interactuar con proteoglicanos como el agregano presente en la MEC y proteínas de unión (HABP, TSG-6). Gracias a estas interacciones, el AH puede modular sistemas de señalización intra e intercelulares implicados en la proliferación, la diferenciación, la motilidad celular y la degradación del propio AH (Sherman, et al., 1994; Dicker, et al., 2014).

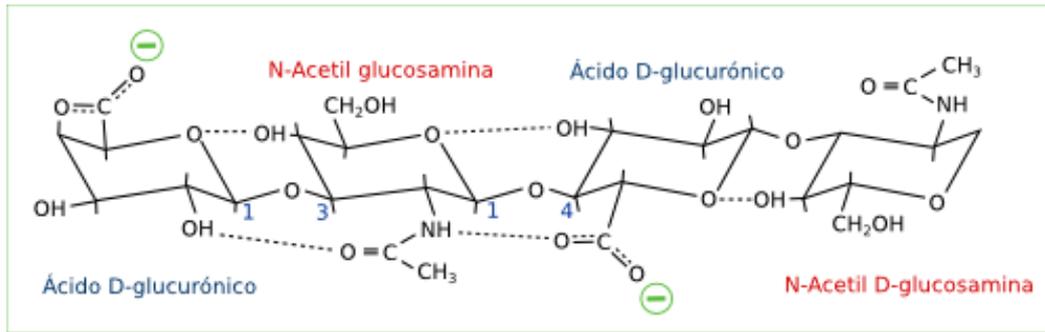


Figura 3. Estructura molecular del ácido hialurónico. El AH es un polisacárido de la familia de los glicosaminoglicanos y está compuesto por disacáridos repetitivos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Figura adaptada de *Hascall, V. et al, Hyaluronan: Structure and Physical Properties, Glycoforum, 1997.*

El AH se puede observar en distintos rangos de peso molecular (PM), de lo cual depende su función biológica. En condiciones homeostáticas, el AH forma polímeros, por lo que se encuentra predominantemente en la forma de alto PM (Spinelli, et al., 2015) (AH APM, de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 Da), cuya principal función es la inducción de señales homeostáticas que contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural del tejido al cual rodea, brindando alta viscoelasticidad. Además, el AH APM tiene funciones inmunosupresoras (Ruffell & Johnson, 2008; Bollyky, et al., 2009b) y angiomoduladoras (Spinelli, et al., 2015). Sin embargo, el AH puede clivarse a fragmentos de menor tamaño (Boregowda, et al., 2006) por la acción de enzimas de degradación o mediante hidrólisis oxidativa por radicales libres (Maishi, et al., 2016) durante procesos inflamatorios, de reparación y en patologías como el cáncer, formando especies de bajo PM (AH BPM, de 10^4 a $0,5 \times 10^6$ Da) (Jiang, et al., 2007), las cuales pueden conducir, entre otras funciones, hacia un perfil inmunológico pro-inflamatorio (Mackee, et al., 1996; Noble, 2002; Alaniz, et al., 2009) (Figura 4).

El AH de APM se asocia con la reducción de la proliferación celular, la inhibición de la fagocitosis (Forrester & Balazs, 1980) y la inducción de la inactividad celular (Chen & Abatangelo, 1999; Necas, et al., 2008). Por lo tanto, se forma una MEC favorable para la proliferación y migración de las células tumorales, principalmente debido a su efecto inmunosupresor. En contraste, el AH de BPM tiende a aumentar la expresión de metaloproteinasas de matriz, citoquinas inflamatorias y factores angiogénicos (McKee, et al, 1996; Oertli, et al., 1998; Necas, et al., 2008), promoviendo el crecimiento de células endoteliales asociadas al tumor y, en consecuencia, induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por lo tanto, la remodelación del MAT por el aumento de la síntesis y

degradación del AH en el contexto tumoral juega un papel crucial en la supervivencia y progresión de las células tumorales. Un desequilibrio en el metabolismo de AH y la interacción con sus receptores promueve procesos patológicos, tal como se evidencia en los tumores, favoreciendo mecanismos implicados en la invasión y la metástasis, la angiogénesis, la supervivencia y la resistencia a drogas (Misra, et al., 2005; Boregowda, et al., 2006) y a su vez, modulando al sistema inmune (Toole, 2004; Alaniz, et al., 2009; Spinelli, et al., 2019). Schmaus, et al. (2014) encontraron que los pacientes con cáncer colorrectal con gran acumulación de AH BPM en el líquido intersticial del tumor tendían a mostrar una mayor progresión e invasión del tumor. Sin embargo, no solo el AH se encuentra desregulado en el microambiente tumoral, sino también las moléculas asociadas a su metabolismo (Lokeshwar, 2001; Valkonen, et al., 2018). Los cambios en la expresión del AH y de las enzimas implicadas en su biosíntesis y degradación desempeñan un papel importante en diferentes etapas de la progresión tumoral, como proliferación, crecimiento, invasión y metástasis (Yip, et al., 2006).

En numerosos tipos de tumores sólidos, se ha evidenciado que un aumento en la producción de AH por parte de las células tumorales o del MAT se relaciona directamente con el crecimiento del tumor, la metástasis (Toole, 2004) y una menor supervivencia del paciente (Ropponen, et al., 1998; Setälä, et al., 1999; Anttila, et al., 2000; Auvinen, et al., 2000; Lokeshwar, 2001; Pirinen, et al., 2001; Posey, et al., 2003). De hecho, se observó que la inhibición de la síntesis de AH inhibe la metástasis de células tumorales en algunos tipos de tumores (Lokman, et al., 2019). Por este motivo, los niveles de AH se consideran potenciales indicadores del diagnóstico y malignidad en algunos tumores (Tammi, et al., 2008). Sin embargo, en otros tipos de cánceres, la progresión no se ve afectada por la acumulación del AH, sino más bien por su fragmentación (Itano, 2008). Los fragmentos de AH de BPM se asocian con tumores más agresivos ya que promueven su diseminación mediante la estimulación de la angiogénesis (Delpéch, et al., 1990).

2.1.1.1. Metabolismo del ácido hialurónico

El metabolismo del AH comprende la estricta regulación que existe entre la síntesis y degradación del AH. La síntesis es llevada a cabo por enzimas llamadas AH sintetas (HASs, del inglés: HA synthases) y es fragmentado por hialuronidasas (HYALs, del inglés: hyaluronidases) o por especies

reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS, NOS), en moléculas bioactivas de menor PM (Heldin, et al., 2013; Passi, et al., 2019) (Figura 4).

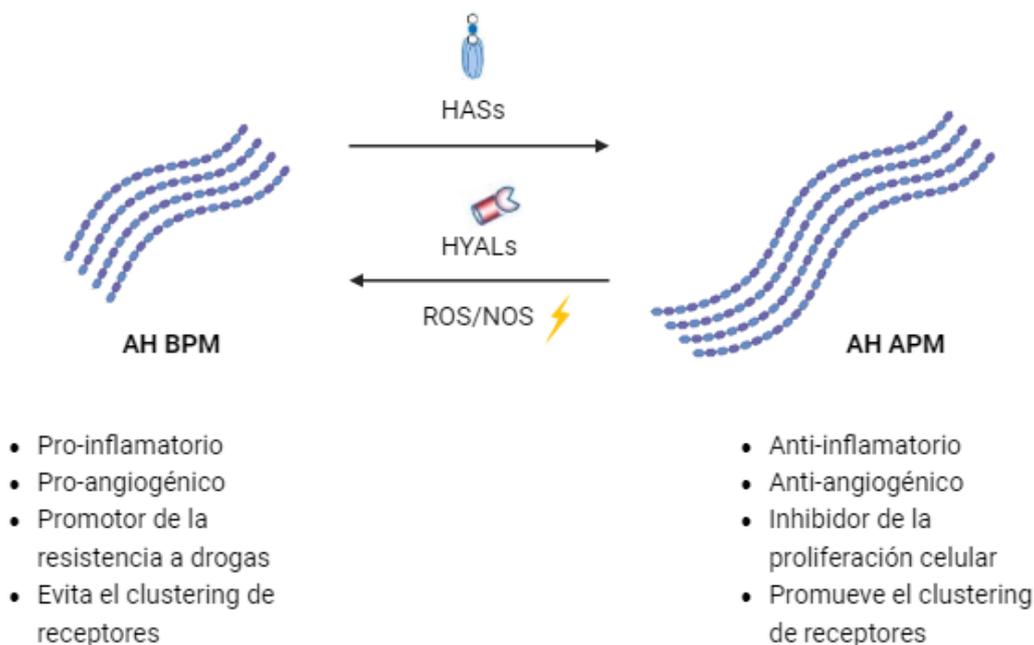


Figura 4. Metabolismo del AH. La biosíntesis del AH es catalizada por acción de las HASs y la degradación por la acción de enzimas HYALs o inespecíficamente por ROS o NOS en condiciones de estrés oxidativo. Las HASs generan AH de APM, que promueve un perfil inmunológico anti-inflamatorio, evita la formación de nuevos vasos sanguíneos, inhibe la proliferación celular y promueve el *clustering* de receptores. El AH de APM se puede clivar dando como resultado AH de BPM, que es capaz de promover un perfil inmunológico pro-inflamatorio y la formación de nuevos vasos sanguíneos, además de promover la resistencia a drogas e impedir el *clustering* de receptores de AH.

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.

2.1.1.1.1. Biosíntesis del ácido hialurónico

A diferencia de otros de los GAGs que se sintetizan dentro de la célula en el aparato de Golgi, el AH se sintetiza mediante tres enzimas transmembrana: AH sintasa 1 (HAS1), AH sintasa 2 (HAS2) y AH

sintasa 3 (HAS3) (Weigel, et al., 1997) en el lado interno de la membrana plasmática. Luego, el AH se libera al espacio extracelular o bien puede quedar anclado en la membrana plasmática (Figura 5). La expresión de estas enzimas varía según diferentes condiciones, como la morfogénesis o las condiciones patológicas, y a su vez generan AH de diferente PM (Toole, et al., 2001; Stuhlmeier & Pollaschek, 2004). Se reportó que HAS1 y HAS2 producen AH de mayor PM (más de 2×10^6 Da), mientras que HAS3 produce fragmentos más pequeños de AH (1×10^5 a 1×10^6 Da) (Itano, et al., 1999; Vigetti, et al., 2014a).

En el contexto del cáncer, una desregulación en la expresión de las HASs conduce a la producción anómala de AH, lo que impulsa el desarrollo de procesos biológicos anormales, tales como la transformación celular y la metástasis (Nguyen, et al., 2017; Kim, et al., 2019; Passi, et al., 2019). Se ha observado que la sobre-expresión de HAS2 promueve la progresión tumoral y la resistencia a la quimioterapia en cáncer de vejiga, pulmón, ovario y mama (Udabage, et al., 2005; Sá, et al., 2015; Anand, et al., 2019; Kim, et al., 2019; Lokman, et al., 2019; Weng, et al., 2019). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de la enzima HAS2 en células de cáncer de mama reduce su capacidad invasiva, un efecto que se revierte al sobre-expresar dicha enzima (Bernert, et al., 2011). Esto sugiere que la enzima HAS2 desempeña un papel central en promover la proliferación tumoral, migración e invasión en distintos tipos tumorales.

La síntesis de AH está estrictamente influenciada por la disponibilidad celular de sus precursores (N-acetil-D-glucosamina y ácido-D-glucurónico), los cuales deben estar conjugados al nucleótido uridina difosfato (UDP) para ser sustratos reconocibles por las HASs, formando UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) y ácido-UDP-glucurónico (UDP-GlcUA). Las enzimas HAS incorporan de manera alternada UDP-GlcA y UDP-GlcNAc a la cadena inicial del AH. Una vez finalizada la síntesis, la cadena neosintetizada es liberada al exterior celular o queda anclada en la membrana plasmática (Figura 5).

La síntesis de AH consume grandes cantidades de sus sustratos donantes, vinculando así la síntesis de AH con el metabolismo de la glucosa (Kobayashi, et al., 2020). Esto se evidencia mediante la inhibición de la síntesis de AH por medio del agotamiento de la disponibilidad de UDP-GlcA citoplasmática a partir del tratamiento con 4-metilumbeliferona (4-MU) (Kakizaki, et al., 2004). De

manera similar, el agotamiento de la UDP-GlcNAc celular mediante el tratamiento con manosa (en vez de glucosa) redujo la síntesis de HA en queratinocitos epidérmicos (Jokela, et al., 2011).

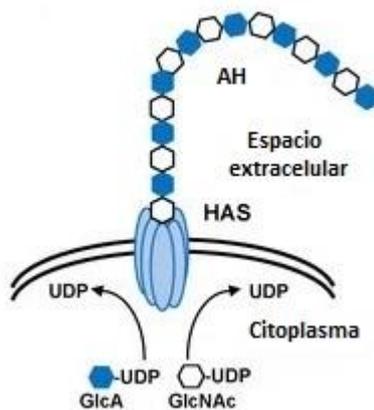


Figura 5. Ilustración esquemática de la biosíntesis del AH. La biosíntesis del AH es catalizada por las enzimas HASs, que adicionan alternadamente UDP-GlcA y UDP-GlcNAc a la cadena AH naciente y una vez finalizada la liberan al exterior celular. Figura tomada y adaptada de *Kobayashi, T et al, Hyaluronan: Metabolism and Function, Biomolecules, 2020.*

2.1.1.1.2. Degradación del ácido hialurónico

Normalmente, el AH es clivado por enzimas endoglicosidasas específicas, HYALs, o se degrada inespecíficamente por ROS en respuesta al daño oxidativo. En consecuencia, se generan fragmentos de AH de BPM o incluso fragmentos muy cortos de AH denominados oligómeros de AH (oAH), lo que puede conducir hacia un perfil proinflamatorio y pro-angiogénico (Alaniz, et al., 2006; Singleton, et al., 2010). Se han identificado seis miembros de la familia de las HYALs en humanos que comparten aproximadamente el 40% de la identidad (Stern, et al., 2006). Sin embargo, HYAL1 e HYAL2 son las que mayor actividad enzimática presentan en los mamíferos y se expresan ampliamente en tejidos somáticos (Mascaró, 2015). El AH de APM se une a receptores de AH y es clivado por las HYALs de membrana plasmática (HYAL2 e HYAL3), dando como resultado AH de BPM, el cual se puede internalizar y continuar su proceso de degradación en los lisosomas por la acción de HYAL1, generando oAH que pueden ser liberados al exterior celular por exocitosis para formar parte de la MEC (Kobayashi, et al., 2020) (Figura 6).

En varios tipos de tumores se ha reportado un aumento en la expresión de las HYALs, en particular de HYAL1 e HYAL2 generando gran cantidad de AH de BPM, cuya acumulación produce la

remodelación del MAT, lo que se asocia estrechamente con la agresividad del tumor (Novak, et al., 1999; Stern, et al., 2006; Tan, et al., 2011). Varios informes sugieren que las enzimas HYALs podrían ser consideradas como biomarcadores. Por ejemplo, se ha observado una sobre-expresión de HYAL1 e HYAL2 en melanoma (Siiskonen, et al., 2013), cáncer de vejiga (Morera, et al., 2017), cáncer de próstata (Posey, et al., 2003) y carcinoma no microcítico de pulmón (Junker, et al., 2003). En el caso del cáncer de mama, investigaciones previas indican que la hipoxia en el tumor y en su microambiente favorece la actividad de las HYALs, dando como resultado la generación de fragmentos de AH de BPM, los cuales promueven la angiogénesis (Velesiotis, et al., 2019). Esto sugiere que las HYALs podrían ser indicadores prometedores de la progresión tumoral.

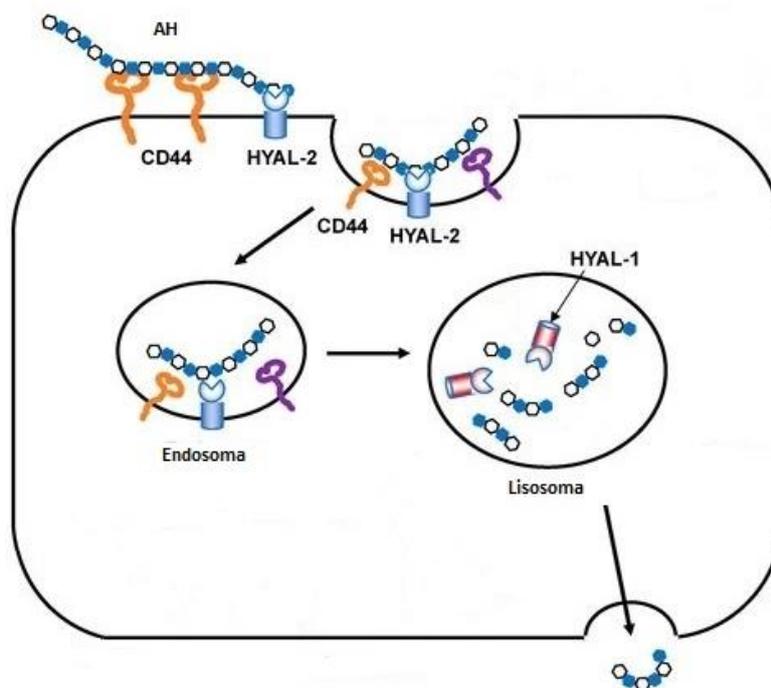


Figura 6. Ilustración esquemática de la degradación de AH. AH de APM se une al receptor de superficie celular CD44 y a HYAL2 y se escinde en fragmentos de BPM. Posteriormente, estos fragmentos ingresan al interior celular mediante endosomas y se degradan a oAH en los lisosomas por la acción de HYAL1. Finalmente, el AH fragmentado se libera a la MEC. Nota: Solo se esquematizan los mecanismos principales de degradación del AH, pero existen otros que involucran a otras HYALs y receptores menos comunes. Tomado y adaptado de *Kobayashi, T et al, Hyaluronan: Metabolism and Function, Biomolecules, 2020.*

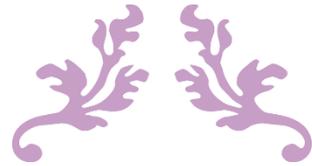
2.1.1.1.3. Receptores de ácido hialurónico

El AH es capaz de inducir señales intracelulares por medio de varios receptores. Los principales receptores de AH son CD44 y RHAMM. Estos receptores pueden desencadenar diferentes respuestas celulares (Masellis-Smith, et al., 1996). CD44 se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo leucocitos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales y macrófagos, entre otros. No solo es capaz de unirse al AH, sino también a otros componentes de la MEC, como colágeno, fibronectina, condroitin sulfato, entre otros (Borland, et al., 1998). CD44 participa en muchos procesos fisiológicos y patológicos al interactuar con AH y activar cascadas de señalización claves (Turley, et al., 2002). Estas interacciones regulan procesos como la adhesión, proliferación y migración celular, debido a que promueven la expresión de genes relacionados con el crecimiento y la supervivencia celular, induciendo un reordenamiento del citoesqueleto y de la membrana plasmática (Kobayashi, et al., 2020). La interacción de CD44 y AH está influenciada por diferentes factores, como el tipo de célula (Katoh, et al., 1995), el estado de activación de CD44 (Skelton, et al., 1998) y el PM del AH (Slevin, et al., 2002; Bollyky, et al., 2009a). Además, la interacción entre CD44 y AH puede también promover procesos asociados a condiciones patológicas, como los observados durante el desarrollo tumoral (Spinelli, et al., 2015). De hecho, varios estudios han reportado que este receptor también se encuentra desregulado en el contexto tumoral, siendo considerado un marcador de células madre tumorales, responsables de la resistencia a la terapia y la aparición de metástasis (Yan, et al., 2015; Senbanjo & Chellaiah, 2017; Sevic, et al., 2020; Hassn Mesrati, et al., 2021). Por otro lado, se ha reportado que RHAMM también se vincula con el desarrollo tumoral (Spinelli, et al., 2015). Este receptor transmembrana funciona como una proteína de unión al AH y es capaz de activar a CD44, desencadenando una vía de señalización vinculada con la proliferación celular (Spinelli, et al., 2015).

2.1.2. Implicancia de la expresión de BRCA1 y BRCA2 asociada a cambios en la matriz extracelular

Las modificaciones en la MEC en un contexto tumoral pueden llevar a cambios en la expresión de los genes de las células del MAT. Por ejemplo, modificaciones en los niveles de AH y de genes relacionados con su metabolismo pueden resultar en variaciones en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2*

en las células tumorales (Zhou, et al., 2013; Sevic, et al., 2020). En cáncer colorrectal y en cáncer de mama, la disminución de la expresión del ARNm de *BRCA1* se asocia con una menor supervivencia de los pacientes y, en cáncer colorrectal se asocia, a su vez, con estadios avanzados de la enfermedad (Leaf, et al., 2021; Lou, 2022). Además, los cambios en la expresión de los genes de reparación del ADN pueden influir sobre el MAT. Esto conduce a la generación de un círculo de retroalimentación que favorece la progresión de la enfermedad (Zhou, et al., 2013; George, & Shaw, 2014).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. HIPÓTESIS

El nivel de expresión del ácido hialurónico y de genes involucrados en su metabolismo (*CD44*, *HAS2* e *HYAL1*), en la matriz extracelular, se correlaciona con cambios en la expresión de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer de mama y colorrectal. A su vez, esto se asocia con los datos clínicos de pacientes y con la progresión de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar las modificaciones de la expresión del ácido hialurónico y los genes involucrados en su metabolismo (*HAS2*, *HYAL1* y *CD44*), en tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente al tumor de pacientes con cáncer de mama y colorrectal, y su asociación con la expresión de genes de reparación del ADN (*BRCA1* y *BRCA2*) y con datos clínicos de los pacientes. A su vez, se buscó determinar si este patrón de expresión se cumplía en dos líneas celulares de cáncer de mama y una línea celular de cáncer de colon tratadas con hialuronidasa o 4-Metilumbeliferona, es decir, aumentando la degradación del ácido hialurónico, o inhibiendo su síntesis, respectivamente. Una mejor comprensión del papel del ácido hialurónico y su interacción con otros genes en el contexto del cáncer de mama y colon podría aportar información relevante para futuros enfoques terapéuticos y diagnósticos en estas enfermedades.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Con muestras de pacientes oncológicos

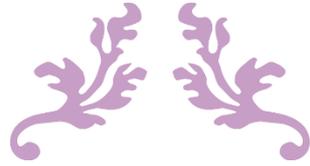
- Determinar diferencias en la matriz extracelular entre el tejido tumoral y el tejido no tumoral adyacente al tumor mediante la evaluación de la expresión del ácido hialurónico, de uno de sus principales receptores (*CD44*) y de genes

implicados en su metabolismo (*HAS2* e *HYAL1*) en pacientes con cáncer de mama y colorrectal.

- Analizar el nivel de expresión de genes de reparación de ADN (*BRCA1* y *BRCA2*) en tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente al tumor en pacientes con cáncer de mama y colorrectal.
- Establecer la correlación de las moléculas mencionadas anteriormente con datos clínicos de los pacientes con cáncer de mama y colorrectal.

2.2.2. En cultivo celular

- Analizar el cambio en el volumen y área de esferoides formados con las células de cáncer de mama y colon generados mediante cultivo 3D en gota colgante, durante el tratamiento con hialuronidasa, 4-Metilumbeliferona y en células sin tratar (control).
- Analizar la expresión de ARNm de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1* en los esferoides correspondientes durante los distintos tratamientos.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. MUESTRAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

1.1. Obtención de muestras

Se incluyeron en el estudio pacientes con cáncer de mama o colorrectal mayores de 18 años del Servicio de Cirugía del Hospital Interzonal General de Agudos “Abraham Piñeyro” (HIGA) y la Clínica Centro de la ciudad de Junín, Buenos Aires, Argentina. El primero, al ser un hospital interzonal, abarca la atención de la totalidad de la región noroeste de la provincia de Buenos Aires. Todos los pacientes que fueron incluidos en el estudio no habían recibido un tratamiento antineoplásico previo a la cirugía para la enfermedad actual y no presentaban un estadio avanzado de cáncer o metástasis.

Los pacientes habían firmado previamente un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética COENOBA (EXP-1291/2021). Una parte de las muestras, que se habían obtenido en el año 2017, fueron aprobadas por el comité de ética de la FCB de la Universidad Austral (17-006). Además, se mantuvo la confidencialidad de los datos personales de los pacientes cuyas muestras fueron analizadas, según lo establecido por el comité de ética.

Se utilizaron dos tipos de muestras: tejido tumoral (TT) descartado en el momento de la cirugía y tejido no tumoral adyacente al tumor (NAT). Todas las muestras fueron recogidas en el quirófano y evaluadas por un patólogo, quien determinó el estadio TNM y el estado de marcadores específicos.

1.2. Descripción de pacientes

Se analizaron diez pacientes con cáncer de mama y siete pacientes con cáncer colorrectal. Los diez pacientes con cáncer de mama eran mujeres con una edad media de $64,75 \pm 5,47$ años y el diagnóstico histopatológico para la mayoría de ellas fue carcinoma invasivo de ningún tipo especial (NST). De los siete pacientes con cáncer colorrectal tenidos en cuenta en el estudio, tres eran hombres y cuatro eran mujeres. La edad media fue de $69,86 \pm 16,43$ años y el diagnóstico histopatológico fue principalmente adenocarcinoma.

Características del paciente	Cáncer de mama	Cáncer colorrectal
Número de pacientes	10	7
Edad media \pm desvío estándar (años)	64,75 \pm 5,47	69,86 \pm 16,43
Género masculino	0	3
Género femenino	10	4
T- tumor		
Tis	1	0
T1	3	0
T2	4	2
T3	0	4
T4	0	1
Desconocido	2	0
N- ganglios linfáticos		
N0	6	5
N1	0	0
N2	2	2
N3	0	0
Desconocido	2	0
M- metástasis	0	0

Tabla 9. Datos de los pacientes tenidos en cuenta en el estudio.

1.3. Procesamiento de muestras

1.3.1. Preparación de muestras

Las muestras de tejido, una vez recibidas, se cortaron con un bisturí en secciones. Una sección de tejido fue destinada para realizar una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y para inmunofluorescencia contra AH, CD44, BRCA1 y BRCA2. Este corte se fijó en formaldehído al 4% cubriendo la totalidad del tejido y luego incluido en parafina. La tinción con H&E se realizó para poder observar la arquitectura y el estado general de los tejidos. Otra sección de tejido fue destinada a la extracción de ARNm para la detección de *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1*. Para ello, se colocaron 500 μ l de una solución de conservación *RNAhold* (TransGen Biotech Co) en las muestras de tejido para la inactivación de las ARNasas y el mantenimiento de la integridad del ARN, teniendo en cuenta que el ARN se degrada fácilmente. Esta sección de tejido se colocó junto con la solución de conservación durante 24 horas en heladera y luego se mantuvo a -20°C (Figura 7).

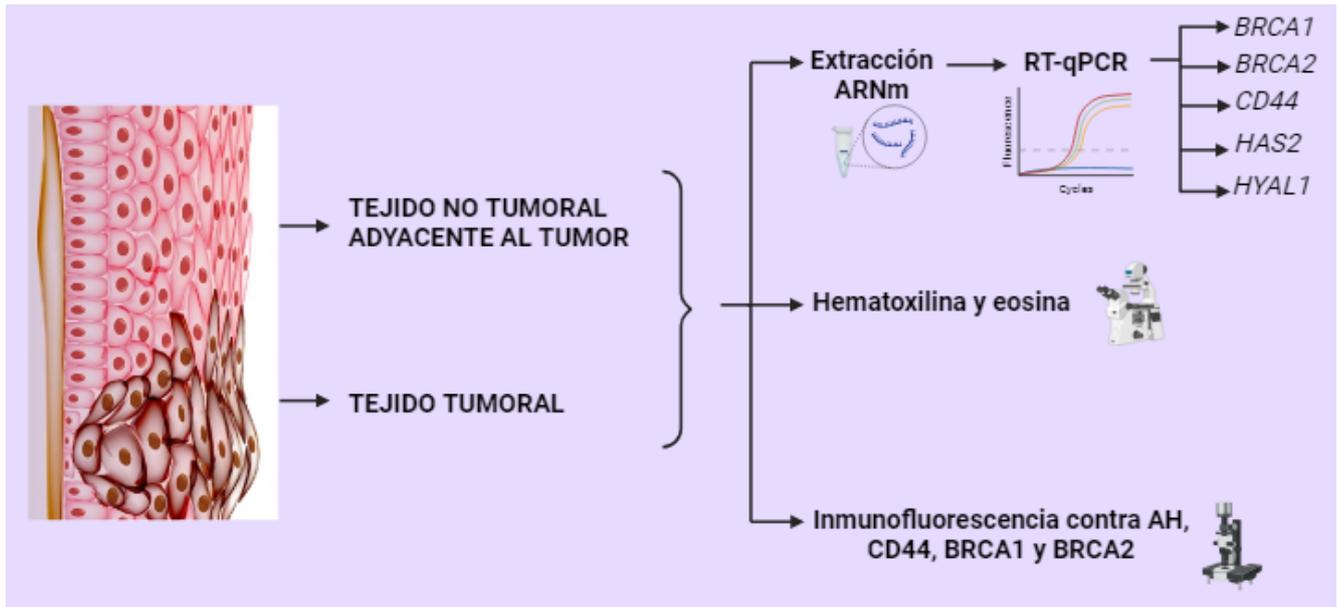


Figura 7. Metodología para el procesamiento de muestras de pacientes con cáncer de mama o cáncer colorrectal. A partir de muestras de TT y NAT de pacientes con cáncer de mama o colorrectal, se realizó la extracción de ARNm y RT-qPCR para la detección de *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1*, una tinción con H&E e inmunofluorescencia contra AH, CD44, BRCA1 y BRCA2.

1.3.2. Extracción de ARNm y retrotranscripción

Los tejidos obtenidos de pacientes con cáncer colorrectal fueron procesados utilizando 1 ml del reactivo Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc.). En cambio, los tejidos de pacientes con cáncer de mama fueron procesados con el kit de ARN Easypure (TransGen Biotech) para la extracción de ARNm. Esta diferencia en la metodología de extracción se debió principalmente a que, con la utilización del reactivo Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc.) para la extracción de ARNm de los tejidos de mama, se obtuvieron pequeñas cantidades de ARNm principalmente porque contienen pocas células y gran cantidad de tejido graso, dificultando la obtención de resultados. En los casos que se consideraron necesarios, las muestras fueron tratadas con la enzima ADNasa para eliminar la contaminación con ADN. Las enzimas ADNasa y proteinasa K estaban incluidas en el kit de extracción de ARN.

El rendimiento y calidad del ARN 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 con transcriptasa reversa (RT-PCR) utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystems) incluyendo 2 µg de ARN total, 100 pmoles/µl de oligos

(dT) (Genbiotech), *buffer* 5X (Promega), M-MLV RT (Promega), 10 mM de dNTPs (Qiagen) y 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), obteniendo un volumen final de 20 µl de ADNc. El control negativo de la retrotranscripción contenía todos los reactivos exceptuando la transcriptasa reversa, junto con el molde de ARNm. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 42°C durante 1 hora y 1 ciclo de 10 min a 90°C. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

1.3.3. Análisis de la expresión de AH, de genes implicados en su metabolismo (*CD44*, *HAS2* e *HYAL1*) y de reparación del ADN (*BRCA1* y *BRCA2*)

1.3.3.1. RT-qPCR

Para evaluar la expresión de ARNm de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2* los ADNc se sometieron a PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando la estrategia de detección con SYBR Green con Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Life Science) y 200 nM de cada cebador específico (Invitrogen) para los ARNm de interés a detectar (Tabla 10), siguiendo la recomendación de volumen final del fabricante. Las condiciones para las reacciones de amplificación fueron: 30 segundos a 95°C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. A su vez, se tuvieron en cuenta las temperaturas de Melting en cada caso para analizar la especificidad de los productos obtenidos. Los niveles relativos de ARNm se expresaron como el "cambio relativo" de expresión en relación con el control de expresión endógena GAPDH. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y durante cada ensayo se añadió respectivamente un control sin muestra.

1.3.3.2. Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de AH

Las muestras de TT y NAT previamente incluidas en parafina se cortaron con un micrótopo en secciones de 5 µm y se colocaron tres cortes por vidrio. Las secciones de tejido se desparafinaron y se hidrataron y luego se incubaron durante la noche a 4°C en cámara húmeda con 5 µg/µl de una proteína de unión específica a AH en su forma biotinilada (bHABP) (EMD Millipore Corp.; número de catálogo: 385911) en BSA 1% en PBS. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con estreptavidina-APC (Abcam; número de catálogo: ab243099) diluida 1/500 en BSA 1% en PBS. El bloqueo de estreptavidina y biotina se realizó con reactivos del kit

VECTOLAB (Vector Laboratories, Inc.) y se utilizó BSA 1% en PBS como agente bloqueante para bloquear los sitios de unión no específicos. A su vez, los tejidos se incubaron con 0,3 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS durante 7 minutos en oscuridad para identificar los núcleos celulares. Como controles de inespecificidad de señal, se midió la autofluorescencia de las muestras sin reactivos y de muestras tratadas solo con estreptavidina-APC.

La visualización se realizó mediante un microscopio óptico de fluorescencia trinocular Axio Imager.A2 (Carl Zeiss), tomando 20 fotografías con un aumento total de 100X en los cortes de tejido marcados con la proteína de unión y el anticuerpo secundario. A su vez, se tomaron fotografías representativas con aumento 400X para mostrar los sitios y el nivel de expresión de AH. Para el caso de los controles de autofluorescencia y el control de anticuerpo secundario (solo con estreptavidina-APC) se revisó toda la muestra y se tomó 1 fotografía representativa por corte con un aumento 100X.

Para cada sección evaluada, se obtuvo el valor promedio del área marcada mediante la herramienta denominada densidad integrada del *Software ImageJ* (NIH). Los valores obtenidos para AH se normalizaron con la marcación con DAPI y se expresaron como la relación TT/NAT para eliminar el sesgo causado por los diferentes tamaños, formas y número de células presentes en los dos tipos de tejido.

1.3.3.3. *Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de CD44*

Las muestras de tejido incluidas en parafina se cortaron con un micrótopo en secciones de 5 µm, se desparafinaron en xileno y se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol. Para desenmascarar los epítipes, se realizó una recuperación antigénica con citrato de sodio 10 mM (pH=6) manteniendo a 95°C durante 10 minutos. Los cortes se incubaron con anticuerpo primario de conejo para CD44 (Cell Signaling Technology, número de catálogo: 3578S) diluido 1/500 en PBS-BSA 1% durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Luego se realizaron lavados y se incubaron 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG Cyanine3 (BioLegend; número de catálogo: 406402) diluido 1/600 en PBS-BSA 1%. Como agente bloqueante se empleó BSA 1% en PBS. Para marcar los núcleos celulares, se realizó una incubación con DAPI 0,3 µg/ml en PBS durante 7 minutos. Como controles de inespecificidad de señal, se midió la

autofluorescencia de las muestras sin anticuerpos y de muestras tratadas solo con el anticuerpo secundario.

Para la visualización de las secciones de tejido se empleó un microscopio óptico de fluorescencia trinocular Axio Imager.A2 (Carl Zeiss). Se tomaron 20 fotografías con un aumento total de 100X en los cortes marcados con ambos anticuerpos, para abarcar la totalidad del tejido y, en las zonas más representativas se tomaron fotografías con un aumento de 400X. La fluorescencia fue evaluada mediante el *Software ImageJ* (NIH) como fue mencionado para la inmunofluorescencia para AH. Los valores de densidad integrada obtenidos a partir del análisis se normalizaron con DAPI y se expresaron como la relación TT/NAT para evitar sesgo causado por las diferencias entre los dos tipos de tejido.

1.3.3.4. Inmunofluorescencia para la determinación de los niveles de BRCA1 y BRCA2

Las muestras de TT y de NAT fueron procesadas de la misma manera que se describió para la inmunofluorescencia para CD44. Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpo primario de ratón para BRCA1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; número de catálogo: sc-6954) con una dilución 1/500 en BSA 1%-PBS y anticuerpo primario de ratón para BRCA2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; número de catálogo: sc-293185) con una dilución 1/300 en BSA 1%-PBS durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Los tejidos se lavaron y se incubaron 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG Alexa Fluor® 647 (Cell Signaling Technology; número de catálogo: 4410S) diluido 1/600 en BSA 1%-PBS. Como agente bloqueante se empleó BSA 1% en PBS. Las muestras se incubaron con 0,3 µg/ml de DAPI en PBS durante 7 minutos en oscuridad para identificar los núcleos celulares. Los controles de inespecificidad de señal, la visualización de las secciones de tejido y la evaluación de la fluorescencia se realizaron de la misma manera que fue indicado para CD44.

2. CULTIVO CELULAR

2.1. Líneas celulares

Durante el abordaje experimental, se utilizaron:

- Líneas celulares tumorales humanas: Las líneas celulares **MDA-MB-231** (HTB-26™) y **MCF-7** (HTB-22D™) de adenocarcinoma mamario humano provistas por la compañía ATCC® y una línea celular de adenocarcinoma colorrectal (**Caco-2**) proporcionada gentilmente por la Dra. Virginia Pasquinelli (Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Argentina).

Las células MDA-MB-231 son RE-, RP- y HER2- (triple negativo), representando el subtipo de cáncer más agresivo y difícil de tratar, por lo que resulta de suma importancia su estudio. Por otro lado, las células MCF-7 son RE+ RP+ y HER2- (luminal A) y corresponden al subtipo de cáncer más frecuente en la población. Ambas líneas celulares crecen en adherencia a superficie. Las mismas fueron cultivadas en medio DMEM con alta concentración de glucosa, suplementado con 2 µmol/L de glutamina (Lab. Serendipia), 100 U/mL de penicilina (Lab. Serendipia), 100 mg/mL de estreptomycin (Lab. Serendipia) y 10% de suero fetal bovino (SFB- Serendipia) inactivado por calor.

Las células Caco-2 también crecen en adherencia a superficie. Se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido de glucosa, suplementado con 2 µmol/L de glutamina (Lab. Serendipia), 100 U/mL de penicilina (Lab. Serendipia), 100 mg/mL de estreptomycin (Lab. Serendipia) y 15% de SFB.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufa a 37 °C con una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Durante los ciclos de cultivo celular, se realizaron periódicamente controles de la morfología celular y la tasa de crecimiento de las células. Previo a cada experimento, cuando las líneas celulares alcanzaron un 80% de confluencia, las células fueron removidas con Tripsina (Lab. Serendipia) y plaqueadas a la densidad óptima.

2.2. Ensayo de formación de tumorosferas *in vitro*

Se realizaron ensayos de formación de tumorosferas *in vitro* mediante la técnica de gota colgante. Esta técnica consiste en colocar células en suspensión en medio de crecimiento en la tapa de una

placa de Petri, formando gotas. Al invertir la tapa de la placa, las células forman agregados celulares y, posteriormente, forman tumorosferas. Las tumorosferas permiten evaluar las interacciones célula-célula y célula-matriz en un contexto de crecimiento tridimensional y son ampliamente utilizadas como modelo *in vitro* para el estudio de fenómenos biológicos de tumores humanos *in vivo* (Nederman, et al., 1984).

2.2.1. Puesta a punto del ensayo de formación de tumorosferas

Se puso a punto el ensayo determinando la cantidad de células por gota, de manera que las tumorosferas generadas entren en el campo de visión del microscopio, para obtener fotografías completas. Todas las tumorosferas fueron tratadas con HYAL o 4-MU al ser plaqueadas y luego se evaluó el momento de aplicación del segundo tratamiento del ensayo, teniendo en cuenta que las tumorosferas deben estar formadas para evitar la ruptura de las mismas.

2.2.1.1. MDA-MB-231

Para la puesta a punto de la técnica de gota colgante con las células MDA-MB-231, se cultivaron 10.000 y 8.000 células por gota. Una vez determinado el número de células, se determinó el tiempo requerido para la formación de tumorosferas, para evaluar el momento de cambio de medio de crecimiento de modo que no se rompan los agregados celulares generados. Para ello, se cultivaron 8.000 células por gota y se tomaron fotografías hasta observar la formación de agregados celulares medianamente compactos (Figura 8).

Esta línea celular se cultivó durante 11 días debido a que demora 5 días en formar agregados celulares, por lo que se debe esperar hasta este momento para realizar el primer cambio de medio junto con el tratamiento. Para realizar el ensayo, se trataron las tumorosferas con 4-MU (Sigma) o HYAL de testículo bovino (Sigma) con el objetivo de representar un microambiente con baja cantidad de AH. La composición de AH de la MEC se alteró a través de dos mecanismos: aumentando la degradación de AH (HYAL) o inhibiendo su síntesis (4-MU) (Nagy, et al., 2015).

Se aplicó 0,5 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL al plaquear las células, se cambió el medio de crecimiento con la misma concentración de tratamiento a los días 5 y 8 y, finalmente, a los 11 días

de cultivo, se realizó un ensayo de viabilidad celular. Además, se observaron las tumorosferas de modo que mantuvieran una morfología normal durante el experimento. Se aplicaron estas concentraciones ya que se probaron previamente en el laboratorio con esta línea celular.

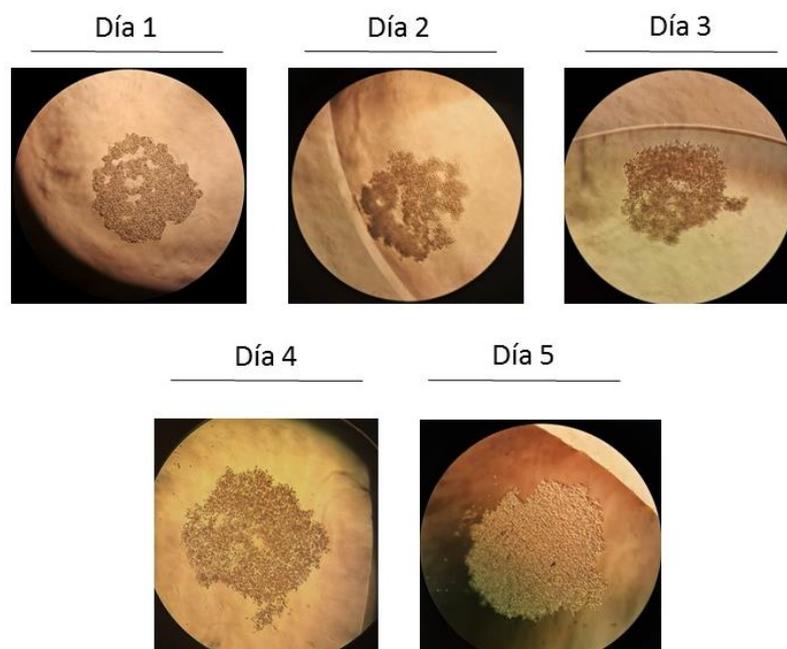


Figura 8. Formación de tumorosferas de MDA-MB-231. Se cultivaron 8.000 células MDA-MB-231 por gota y se tomaron fotografías con un microscopio invertido de campo claro, con un aumento total de 100x, durante 5 días para evaluar la formación de tumorosferas.

2.2.1.2. MCF-7

Para la puesta a punto de la técnica de gota colgante con las células MCF-7, se cultivaron 8.000 células por gota con medio de crecimiento sin tratamiento. Además, se tomaron fotografías hasta observar la formación de tumorosferas (Figura 9). Esta línea celular se cultivó durante 8 días debido a que a los 3 días se visualiza la formación de tumorosferas, en este momento se puede realizar el primer cambio de medio con el correspondiente tratamiento. Para realizar el ensayo, se aplicó 0,25 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL al plaquear las células, y se reaplicó tratamiento con medio de crecimiento a los días 3 y 5 de cultivo. A los 8 días de cultivo, se cosecharon las células y se realizó un ensayo de viabilidad celular. Se aplicaron estas concentraciones ya que se probaron previamente en el laboratorio con esta línea celular.

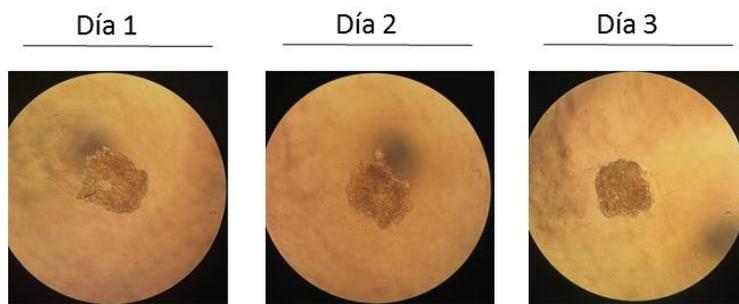


Figura 9. Formación de tumorosferas de MCF-7. Se cultivaron 8.000 células MCF-7 por gota y se tomaron fotografías con un microscopio invertido de campo claro, con un aumento total de 100x, durante 3 días para evaluar la formación de tumorosferas.

2.2.1.3. *Caco-2*

Para la puesta a punto del ensayo con las células *Caco-2*, se cultivaron 8.000 células por gota con medio de crecimiento sin tratamiento. Al observar que las tumorosferas se extendían más allá de los límites del campo de visión del microscopio, se cultivaron 5.000 células por gota. Se tomaron fotografías hasta observar la formación de tumorosferas (Figura 10). Estas células, al igual que las MCF-7, se cultivaron durante 8 días debido a que demoran 3 días en formar tumorosferas.

Para realizar el ensayo, se aplicó 0,2 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL al plaquear las células, y se reapió tratamiento con medio de crecimiento a los días 3 y 5 de cultivo. A los 8 días de cultivo, se cosecharon las células y se realizó un ensayo de viabilidad celular. Se optó por tratar las células con esta concentración de 4-MU debido a que fue utilizada por Bock-Hennig *et al* (2002) para la misma línea celular. A su vez, Iwuchukwu *et al.* (2011) utilizaron un rango de concentración de 4-MU entre 0 y 1 mM para tratar estas células.



Figura 10. Formación de tumorosferas de Caco-2. Se cultivaron 5.000 células Caco-2 por gota y se tomaron fotografías con un microscopio invertido de campo claro, con un aumento total de 100x, durante 3 días para evaluar la formación de tumorosferas.

2.2.1.4. *Ensayo de viabilidad celular*

Para determinar la dosis de HYAL y 4-MU que mantengan la viabilidad de las tres líneas celulares, se realizaron ensayos de viabilidad celular luego de 11 días en el caso de MDA-MB-231 y luego de 8 días en el caso de MCF-7 y Caco-2 mediante la técnica MTS. Los ensayos se realizaron para las condiciones experimentales propuestas, con las concentraciones de tratamientos previamente determinadas en el laboratorio para las líneas celulares bajo estudio.

La técnica MTS es un ensayo colorimétrico que se utiliza para la cuantificación de células viables. Se basa en la reducción del colorante tetrazolio de MTS a formazán dada por las enzimas oxidoreductasas dependientes de NADPH presentes en las células metabólicamente activas, el mismo presenta color púrpura y es soluble en medios de cultivo celular. El formazán es cuantificado mediante la medición de su absorbancia a 490 nm, brindando una medida de la viabilidad celular. Para abordar el ensayo de MTS, las células de las tres líneas celulares utilizadas se sembraron en una placa de 96 pocillos, y se adicionaron 100 μ l del medio de cultivo utilizado para su crecimiento y 7 μ L de MTS Reagent (Abcam). Las células se incubaron en oscuridad durante 4 horas, a 37 °C y 5% de CO₂ en estufa de cultivo celular. Cada 30 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm mediante el lector de placas iMark™ (Bio-Rad) en cada uno de los pocillos. Como control negativo, se colocaron 100 μ l de medio de cultivo y 7 μ l del reactivo MTS.

2.2.1.5. Condiciones establecidas para el ensayo de formación de tumorosferas

Las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 fueron colocadas con el medio de crecimiento en la tapa de una placa de Petri p100 en forma de gota colgante para permitir el crecimiento tridimensional y la formación de tumorosferas. En la superficie inferior de la placa, se colocaron 3 ml de PBS 1X para mantener la humedad y evitar que las gotas se sequen.

Las células MDA-MB-231 y MCF-7 se cultivaron en una densidad de 8.000 células por gota, en un volumen final de 20 µl de medio de crecimiento. Por su parte, las células Caco-2 se cultivaron en una densidad de 5000 células por gota.

2.2.2. Ensayo de formación de tumorosferas *in vitro*

2.2.2.1. Determinación de volumen y área

Previo a cada día de tratamiento y según el esquema de cultivo determinado previamente para cada línea celular, se capturaron imágenes de las tumorosferas obtenidas en los días 5, 8 y 11 en el caso de MDA-MB-231 y en los días 3, 5 y 8 en el caso de MCF-7 y Caco-2, mediante una cámara digital (Infinity3-Lumenera) acoplada a un microscopio óptico invertido de campo claro (Carl Zeiss, Alemania) y se determinó el volumen y el área de cada una de ellas mediante las herramientas length y area, respectivamente, del software ImageJ (Figura 11). Para calcular el volumen, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen } (\mu\text{m}^3) = \frac{4}{3} \pi abc$$

Donde:

- *a* representa el radio de la tumorosfera tomado de manera horizontal,
- *b* el radio tomado de manera vertical y,
- *c* el radio diagonal

Se realizó la conversión de los valores de volumen obtenidos en μm^3 a nl. El volumen se calculó para cada tratamiento con, como mínimo, 3 tumorosferas en cada caso, tomando las más representativas. Las imágenes fueron tomadas antes de realizar el cambio de medio de crecimiento junto con el tratamiento correspondiente.

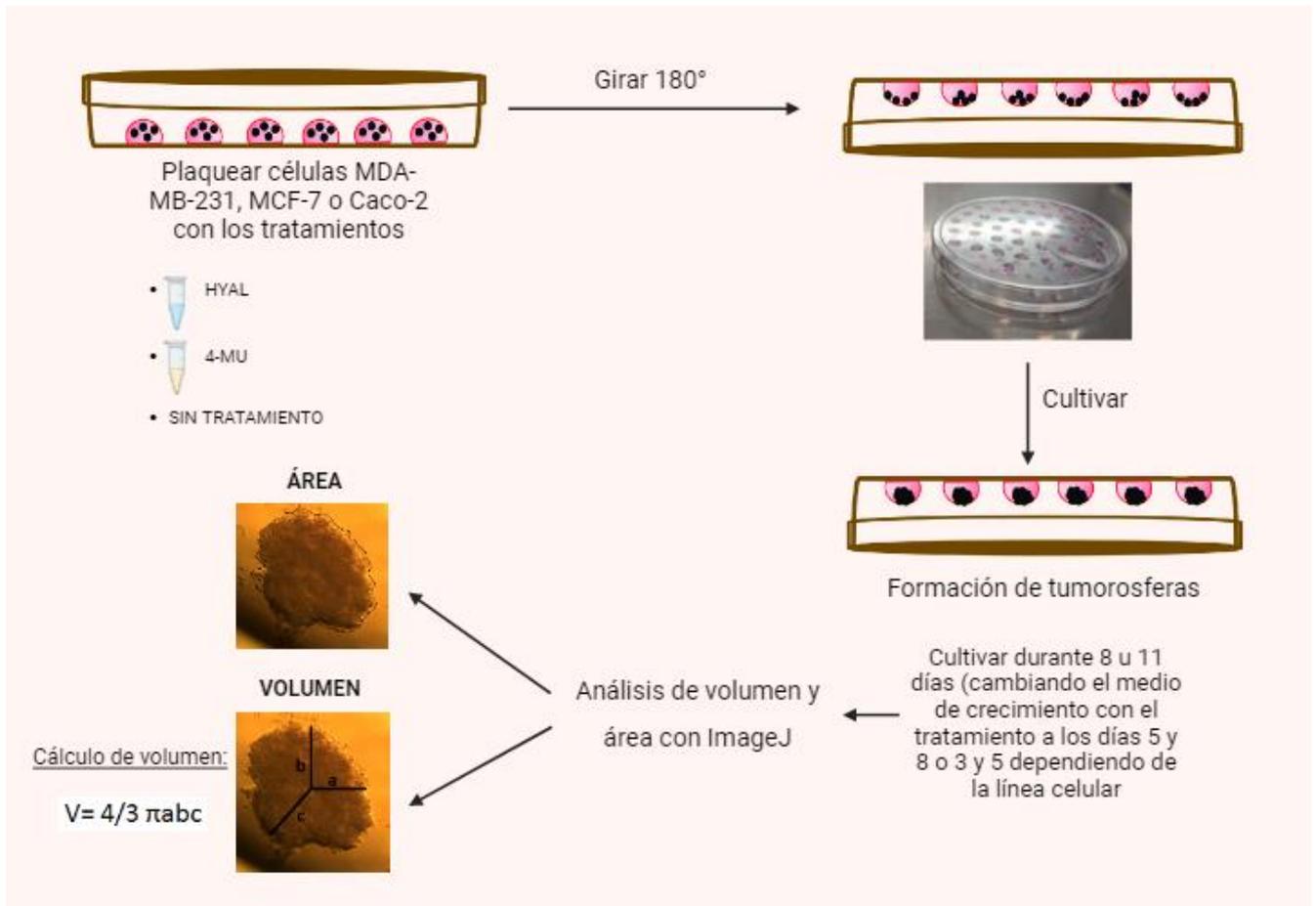


Figura 11. Determinación de volumen y área de tumorosferas *in vitro*. Las células MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 se plaquearon en la tapa de una p100 en forma de gota con el tratamiento de HYAL o 4-MU o con medio de crecimiento como control. Se dio vuelta la placa para permitir el crecimiento tridimensional y se cultivaron hasta obtener tumorosferas (11 u 8 días, según la línea celular). Una vez finalizado el experimento, se tomaron fotografías y se analizó el volumen y área con el *software* ImageJ (NIH).

2.2.2.2. Extracción de ARNm y retrotranscripción

A su vez, se realizaron cultivos en gota colgante de MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 en placas de Petri p150 con las dosis de tratamientos aplicadas en los días mencionados previamente para evaluar la expresión de distintos genes de interés. Una vez finalizado cada cultivo, las células fueron

cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en 500 µl de reactivo Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc.) para extraer los ARNm. Posteriormente, se realizó la síntesis de la cadena complementaria de ADNc mediante RT-PCR en termociclador Veriti (Applied Biosystems). Para la reacción de amplificación se incluyeron 2 µg de ARN total, 100 pmoles/µl de oligos (dT) (Genbiotech), *buffer* 5X M-MLV RT (Promega), 10 mM de DNTPs y 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), obteniendo un volumen final de 20 µl de ADNc. A su vez, se realizó un control negativo de la retrotranscripción colocando todos los reactivos excepto la enzima, junto con el molde de ARNm. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: una incubación a 42°C durante 1 hora y otra incubación de 10 min a 90°C. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización. Este ensayo se realizó por triplicado.

2.2.2.3. *Análisis de genes involucrados en el metabolismo de AH (CD44, HAS2 e HYAL1) y de reparación del ADN (BRCA1 y BRCA2) en tumorosferas*

2.2.2.3.1. RT-qPCR

Para evaluar la expresión de ARNm de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2* el ADNc obtenido en la retrotranscripción se sometió a RT-qPCR. Se utilizó Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Life Science) y 200 nM de cada cebador específico (Invitrogen) para los ARNm de interés a detectar (Tabla 10). Las condiciones para las reacciones de amplificación fueron: 30 segundos a 95°C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Los niveles relativos de ARNm se expresaron como el "cambio relativo" de la expresión en relación con el control de expresión endógena: en el caso de MDA-MB-231 se utilizó GAPDH y en el caso de MCF-7 y Caco-2 se utilizó Beta-2 microglobulina. Durante cada ensayo, se añadió un control sin muestra.

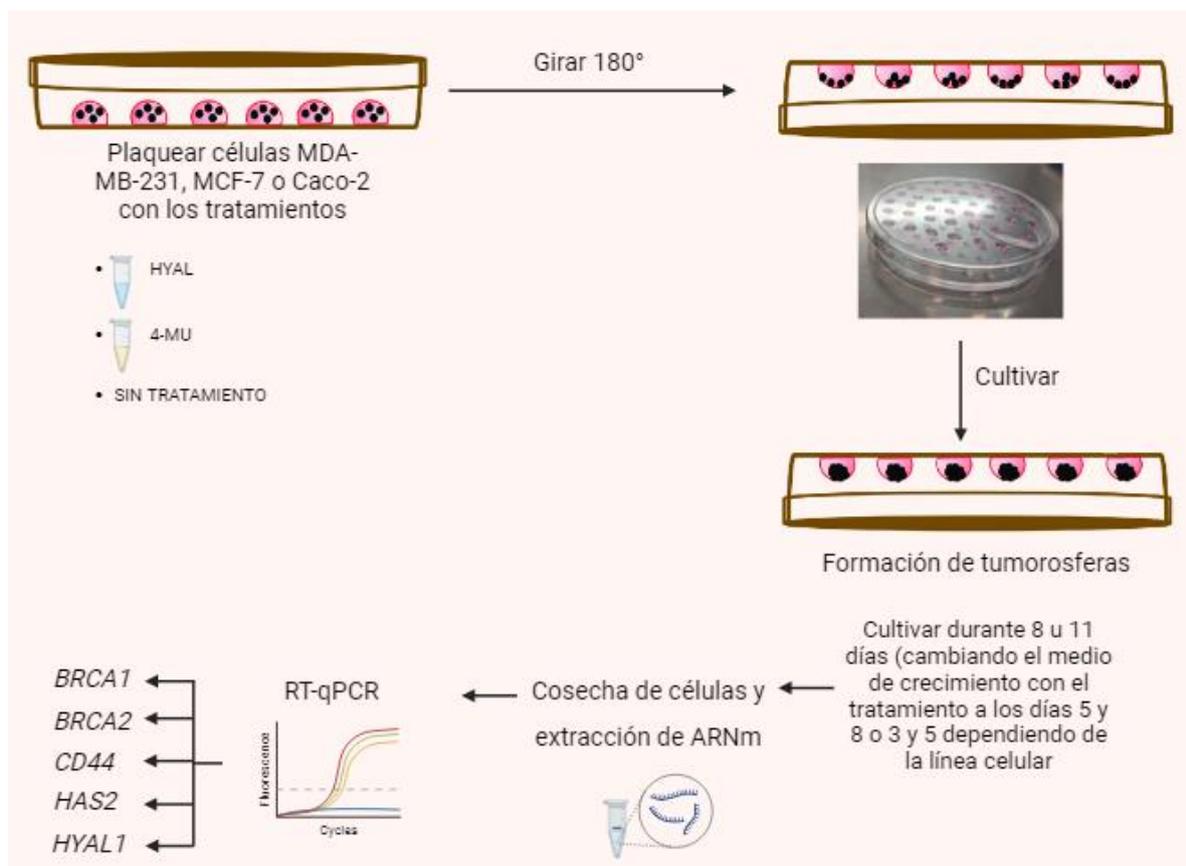


Figura 12. Análisis de genes involucrados en el metabolismo de AH y de reparación del ADN en tumorosferas. Las células MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 se plaquearon en la tapa de una p150 en forma de gota con el tratamiento de HYAL o 4-MU. Se dio vuelta la placa para permitir el crecimiento tridimensional y se cultivaron hasta obtener tumorosferas (11 u 8 días, según la línea celular). Una vez finalizado el experimento, se cosecharon las células, se realizó la extracción del ARNm y se detectaron los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1* mediante RT-qPCR.

Gen a detectar	Dirección	Secuencia
GAPDH	Forward	5' GGGGCTGCCAGAACATCAT 3'
	Reverse	5' GCCTGCTTACCACCTTCTTG 3'
B2M	Forward	5' CACCCCACTGAAAAAGATG'3'
	Reverse	5' CTTACCTCCATGATGCTGCTTAC 3'
BRCA1	Forward	5' GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTT 3'
	Reverse	5' GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGG 3'
BRCA2	Forward	5' CCAAGTGGTCCACCCCAAC 3'
	Reverse	5' CACAATTAGGAGAAGACATCAGAAGC 3'
CD44	Forward	5' GTGATGGCACCCGCTATG 3'
	Reverse	5' ACTGTCTTCGTCTGGGATGG 3'
HAS2	Forward	5' TACACAGCCTTCAGAGCACTG 3'
	Reverse	5' ATGAGGCTGGGTCAAGCATAG 3'
HYAL1	Forward	5' GGCTATGAGGAAACTGAGTCAC 3'
	Reverse	5' TAGGAGTGCAAGGGCTGTAC 3'

Tabla 10. Lista de cebadores utilizados en el estudio.

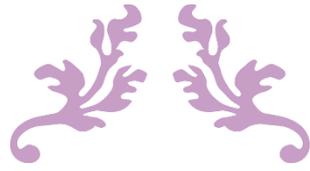
3. ANÁLISIS *IN SILICO* DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó la herramienta STRING v11 (<http://string-db.org/>) para generar redes de interacción de proteínas *in silico* para la reparación de ADN (BRCA1 y BRCA2) y el metabolismo de AH (CD44, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1 e HYAL2). Todas las interacciones se predijeron con un umbral de confianza medio-alto (0,7) y se permitieron todos los métodos predictivos activos. Se estableció un límite de 5 interacciones para el primer y segundo nivel. Este límite se ha seleccionado con el objetivo de enfocarnos en las interacciones más relevantes y significativas, proporcionando así una visión más clara y manejable de las relaciones entre las proteínas. Para el análisis de enriquecimiento, STRING implementa sistemas de clasificación como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), el cual ayuda a identificar las principales vías y procesos en los que se encuentran involucrados los efectores analizados.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el *software* GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software, CA, USA, www.graphpad.com). En todos los casos se probó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de la varianza. Para determinar la significancia de las diferencias entre los valores obtenidos se utilizó la prueba T de student o el análisis de la varianza (ANOVA) para las comparaciones entre dos o más de dos grupos experimentales, respectivamente. Se consideró un valor p como estadísticamente significativo: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$.

Para evaluar la correlación entre los marcadores analizados, se realizó un análisis de correlación de Pearson o Spearman, dependiendo de si se cumplía o no la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro Wilk. Aquellos coeficientes de correlación entre 0,5 y 0,7 (o entre -0,7 y -0,5) fueron considerados como una correlación moderada y valores superiores a 0,7 (o inferiores a -0,7) se consideraron una correlación fuerte (Paritala, et al., 2022; Ahmad, et al., 2023; Amer, et al., 2023). La misma se consideró significativa si presentaba un valor de p asociado menor a 0,05.



RESULTADOS



1. MUESTRAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Los pacientes con cáncer colorrectal tenidos en cuenta en este estudio presentaban un diagnóstico histopatológico de tipo adenocarcinoma excepto el paciente 5, cuyo diagnóstico indicaba cáncer pobremente diferenciado de colon derecho. El paciente 2 era el único en estadio T4. Ninguno de los pacientes presentaba metástasis en el momento de la cirugía (Tabla 11).

Paciente	Sexo	Edad de adquisición de la muestra	Diagnóstico histopatológico	Estadio TNM
1	F	90	Adenocarcinoma invasor de colon	T3N0M0
2	F	74	Adenocarcinoma de sigmoides	T4N0M0
3	F	74	Adenocarcinoma de colon	T3N2M0
4	M	62	Adenocarcinoma de colon	T2N0M0
5	F	80	Cáncer pobremente diferenciado de colon derecho	T3N0M0
6	M	71	Adenocarcinoma invasor tipo colónico derecho	T3N2M0
7	M	38	Adenocarcinoma invasor tipo colónico derecho ángulo hepático	T2N0M0

Tabla 11. Datos clínicos de los pacientes con cáncer colorrectal tenidos en cuenta en el estudio.

El diagnóstico histopatológico para todos los pacientes con cáncer de mama tenidos en cuenta en el estudio, excepto el paciente 10, fue carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST). Este paciente presentaba cáncer ductal *in situ*. Tres de los pacientes analizados presentaban subtipo molecular luminal A (pacientes 1, 9 y 10), dos luminal B (pacientes 3 y 5), siendo el paciente 3 luminal B HER2+. Por otro lado, un solo paciente (paciente 2) era ER- PR- HER2+. Todos los pacientes excepto dos (pacientes 3 y 10) presentaban grado 3 de Nottingham. Los pacientes 3 y 10 presentaban grado 2 (Tabla 12).

Paciente	Sexo	Edad de adquisición de la muestra	Diagnóstico histopatológico	Estadio TNM	ER	PR	HER2	KI67	Grado de Nottingham	Subtipo molecular
1	F	63	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T2N0M0	90%	70%	Neg	11%	3	Luminal A
2	F	68	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T1cN2aM0	Neg	Neg	Pos 3+	75%	3	HER2
3	F	64	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T2N0M0	90% intenso	30% moderado	Pos 3+	16,8 %	2	Luminal B HER2+
4	F	54	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T1cN0M0	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	3	S.D.
5	F	66	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T2N0M0	90% intenso	15% moderado	Neg	24,8 %	3	Luminal B
6	F	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.
7	F	69	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T2N2aM0	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	3	S.D.
8	F	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.	S.D.
9	F	72	Carcinoma mamario invasor de tipo no especial (NST)	T1cN0M0	90% intenso	70% moderado	Neg	13,33 %	3	Luminal A
10	F	62	Cáncer ductal in situ	TisN0M0	90%	90%	Neg	<14%	2	Luminal A

Tabla 12. Datos clínicos de los pacientes con cáncer de mama tenidos en cuenta en el estudio.

Nota: S.D. (Sin Datos) indica que esos datos no se pudieron obtener.

1.1. Análisis de la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN y en el metabolismo de AH en pacientes con cáncer colorrectal

Para evaluar si los genes de reparación del ADN y los genes implicados en el metabolismo de AH variaban entre el TT y NAT en pacientes con cáncer de mama o colorrectal, se analizó el nivel de expresión de los ARNm de *BRCA1* y *BRCA2* debido a sus implicancias en cáncer, *CD44* como el principal receptor de AH descrito en cambios en la MEC en tumores, la sintasa de AH *HAS2* y la hialuronidasa *HYAL1*.

Al observar en conjunto los resultados obtenidos a partir de la RT-qPCR, pudimos determinar que, al considerar los valores de p menores a 0,05 como estadísticamente significativos, en las muestras de cáncer colorrectal, ninguno de los genes analizados fue consistentemente mayor o menor expresado en TT en comparación con el NAT (Figura 13). Dos de los pacientes analizados (pacientes 2 y 7) presentaron una disminución en los niveles de expresión de todos los ARNm analizados en el TT con respecto al NAT. Por otro lado, el paciente 5 mostró un aumento en el ARNm de todos los genes analizados en el TT con respecto al NAT. Finalmente, los niveles de *HYAL1* disminuyeron en todos los pacientes excepto dos (pacientes 5 y 6) (Tabla 13).

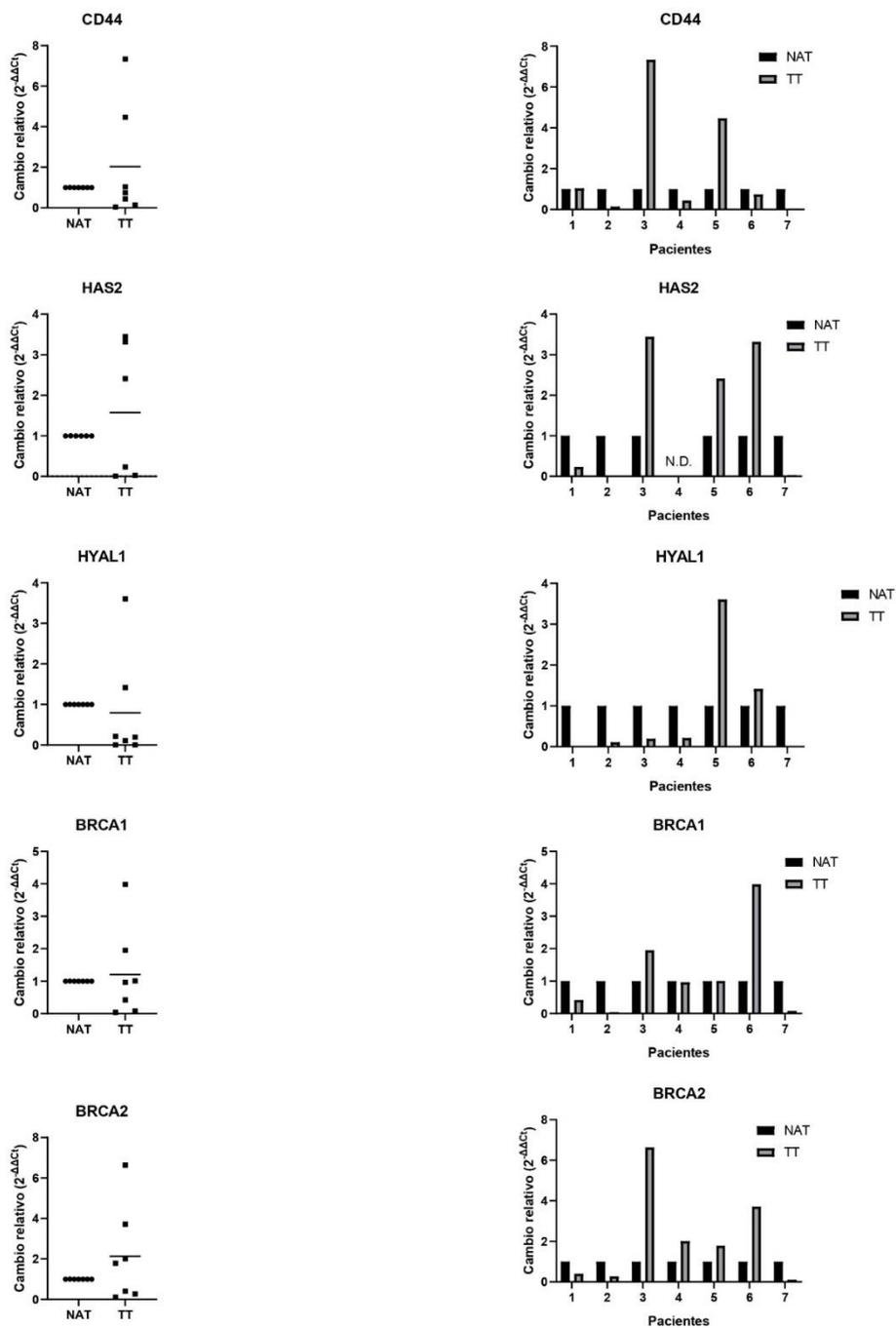


Figura 13. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en pacientes con cáncer colorrectal. Se realizó RT-qPCR y los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena GAPDH. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (■) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo. Aquellos casos en los que no se pudieron obtener valores se indicaron como N.D. (no detectado). Los números del 1 al 7 indican el número de paciente analizado.

Paciente	ARNm					Proteínas			AH
	CD44	HAS2	HYAL1	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2	CD44	
1	↑ =	↓	↓↓↓	↓	↓	↓ =	↓	↑	↓
2	↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	↓	↓ =	↓	↑
3	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↓
4	↓	N.D.	↓	↓	↑	↓	↑ =	↑	↑
5	↑	↑	↑	↑ =	↑	↑	↑	↓	↑
6	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓↓↓
7	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓	↓	↓	↑

Tabla 13. Resumen de los resultados para pacientes con cáncer colorrectal. Nota: Las flechas indican un aumento ↑ o una disminución ↓ del valor medido en TT en comparación con NAT. Los valores de cambio relativo de expresión inferiores o superiores a 10 veces se indican con una flecha, entre 10 y 100 veces con dos flechas y los valores inferiores o superiores a 100 veces con tres flechas. Los valores con 0,03 o menos de diferencia con respecto a 1 se indicaron con = al lado de la flecha correspondiente. N.D. indica valores que no se pudieron detectar.

En los casos en los que se contaba con un número suficiente de pacientes que permitiera clasificar según algún aspecto relevante de los datos clínicos, se llevó a cabo la correspondiente evaluación estadística. Los pacientes con cáncer colorrectal se clasificaron en: femenino, masculino, T3 y N0. Sin embargo, ninguno de los genes varió significativamente entre NAT y TT en las clasificaciones analizadas (Figura 14).

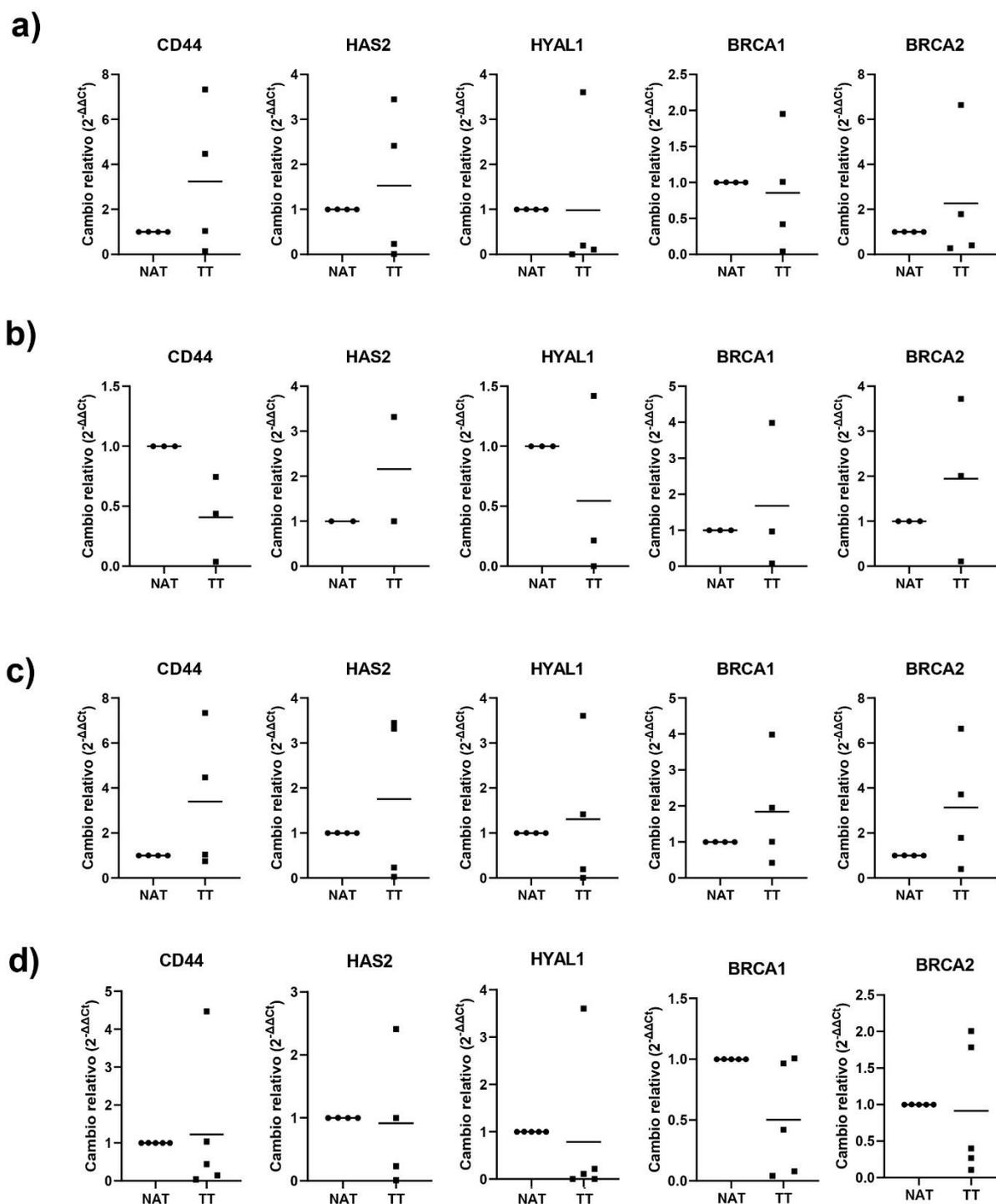


Figura 14. Niveles de ARNm en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninas, (b) masculinos, (c) en estadio T3 y (d) en estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (▪) y el NAT (●). Un valor de *p* inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo.

1.2. Análisis de la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN y en el metabolismo de AH en pacientes con cáncer de mama

En las muestras de cáncer de mama, el único gen que mostró una expresión de ARNm significativamente más baja en TT con respecto al NAT fue *HAS2* ($p=0,0042$), el resto de los genes no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 15). Dos de los pacientes analizados (pacientes 1 y 10) presentaron una disminución en los niveles de ARNm para todos los genes analizados en el TT con respecto al NAT (Tabla 14). El resto de los ARNm analizados no mostraron diferencias significativas entre los niveles de expresión en el TT con respecto al NAT (Figura 15).

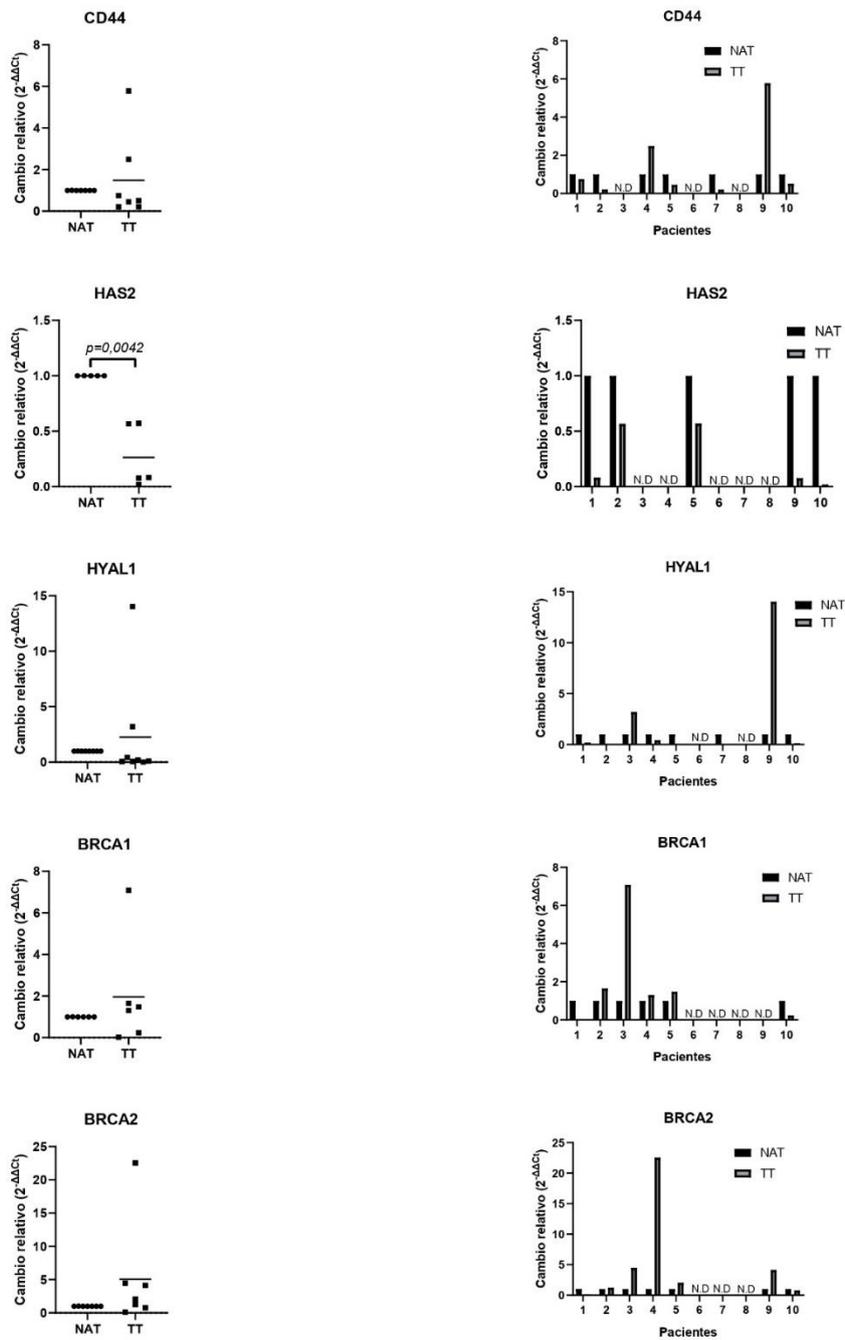


Figura 15. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en pacientes con cáncer de mama. Se realizó RT-qPCR y los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena GAPDH. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (▪) y el NAT (●). Un valor de *p* inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo. Aquellos casos en los que no se pudieron obtener valores se indicaron como N.D. Los números del 1 al 10 indican el número de paciente analizado.

Paciente	ARNm					Proteínas			AH
	CD44	HAS2	HYAL1	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2	CD44	
1	↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓	↓	↓	↓	↑
2	↓	↓	↓↓↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
3	↑↑↑	N.D.	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓
4	↑	N.D.	↓	↑	↑↑	↓	↓	↑	↓
5	↓	↓	↓↓↓	↑	↑	↓	↓	↓	↑
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	↓	↓	↓	↓
7	↓	N.D.	↓↓↓	N.D.	N.D.	↓	↓	↑	↓
8	N.D.	N.D.	↑↑	N.D.	N.D.	↓	↓	↓	↓
9	↑	↓	↑↑	N.D.	↑	↓	↓	↓	↓
10	↓	↓↓↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑

Tabla 14. Resumen de los resultados para pacientes con cáncer de mama. Nota: Las flechas indican un aumento ↑ o una disminución ↓ del valor medido en TT en comparación con el NAT. Los valores de cambio relativo de expresión inferiores o superiores a 10 veces se indican con una flecha, entre 10 y 100 veces con dos flechas y los valores inferiores o superiores a 100 veces con tres flechas. N.D. indica valores que no se pudieron detectar.

En los casos en los que se contaba con un número suficiente de pacientes que permitiera clasificar según algún aspecto relevante de los datos clínicos, se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico. Los pacientes con cáncer de mama se clasificaron en: estadio T1, estadio T2, subtipo luminal A, grado de Nottingham 3 y estadio N0 (Figura 16). Si se consideran solo a los pacientes con grado de Nottingham 3, se observa una disminución estadísticamente significativa de *HYAL1* ($p=0,0476$) en el TT en comparación con el NAT (Figura 16d). Además, se observó una expresión del ARNm de *BRCA1* ($p=0,0153$) considerablemente más baja en el TT con respecto al NAT en los pacientes que presentaban un subtipo molecular luminal A, aunque en este caso solo se tenían datos de dos pacientes, representando un número de muestras muy bajo para obtener resultados robustos (Figura 16c). Además, se observó una disminución estadísticamente significativa de *HAS2*

en aquellos pacientes en estadio T2 ($p < 0,0001$), subtipo luminal A ($p = 0,0005$) y grado de Nottingham 3 ($p = 0,0173$) (Figura 16b, 16c y 16d).

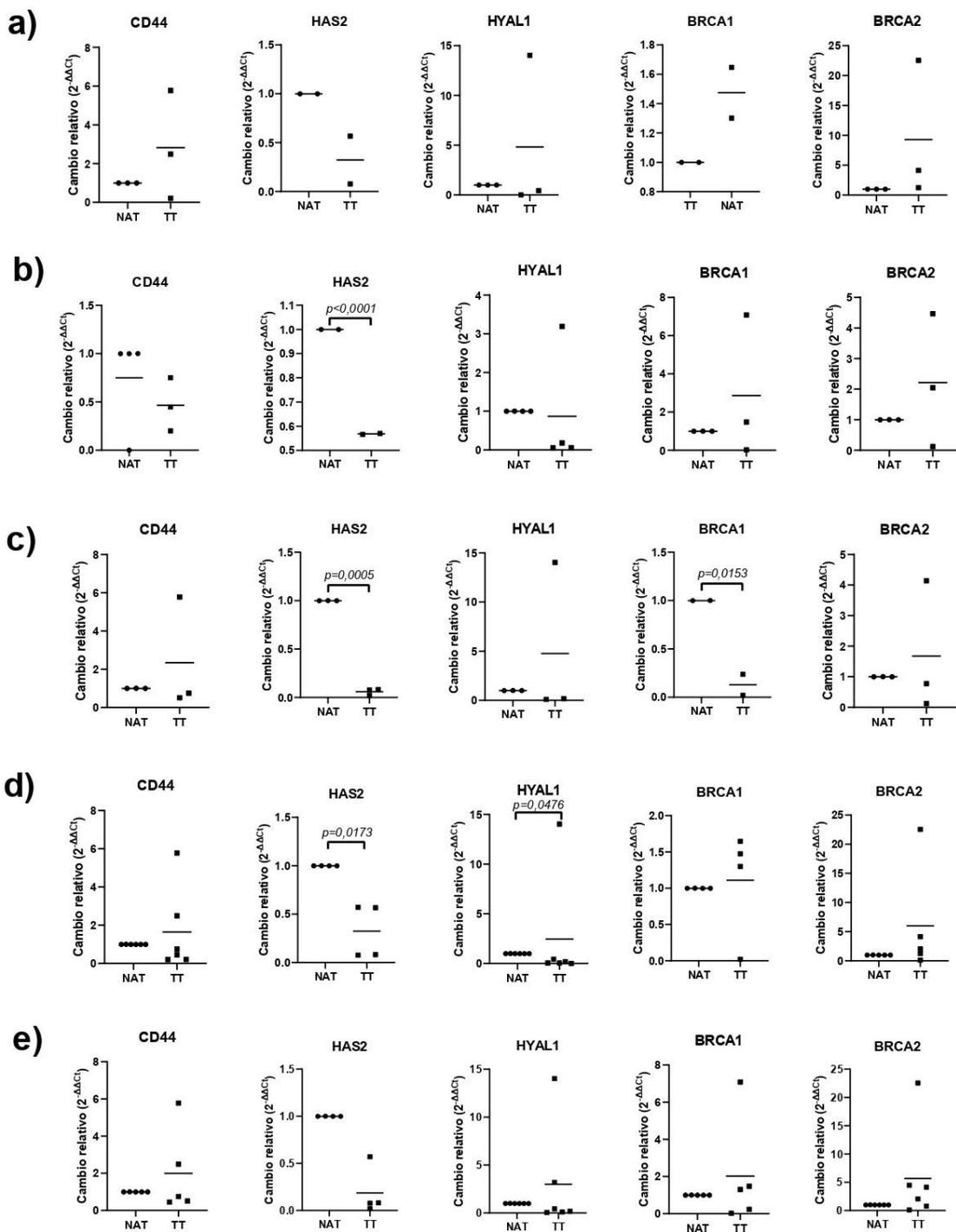


Figura 16. Niveles de ARNm en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 y (e) estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (■) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo.

1.3. Análisis de los niveles de AH en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama

Para evaluar el nivel de expresión del AH de la matriz extracelular del NAT y el TT se realizó una inmunofluorescencia tal como fue descrita previamente. Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra AH en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama se muestran en la Figura 17 y Figura 18.

Tanto en cáncer colorrectal como en cáncer de mama, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de AH entre el NAT y el TT (Figura 17 y Figura 18). Sin embargo, en cáncer colorrectal, todos los pacientes excepto dos (pacientes 3 y 6) presentaron un aumento en los niveles de AH en TT con respecto a NAT (Tabla 13).

En cáncer de mama, en cuatro pacientes se observó un aumento en los niveles de AH en el TT con respecto al NAT (pacientes 1, 2, 5 y 10). El resto de los pacientes mostró una disminución en estos valores (Tabla 14).

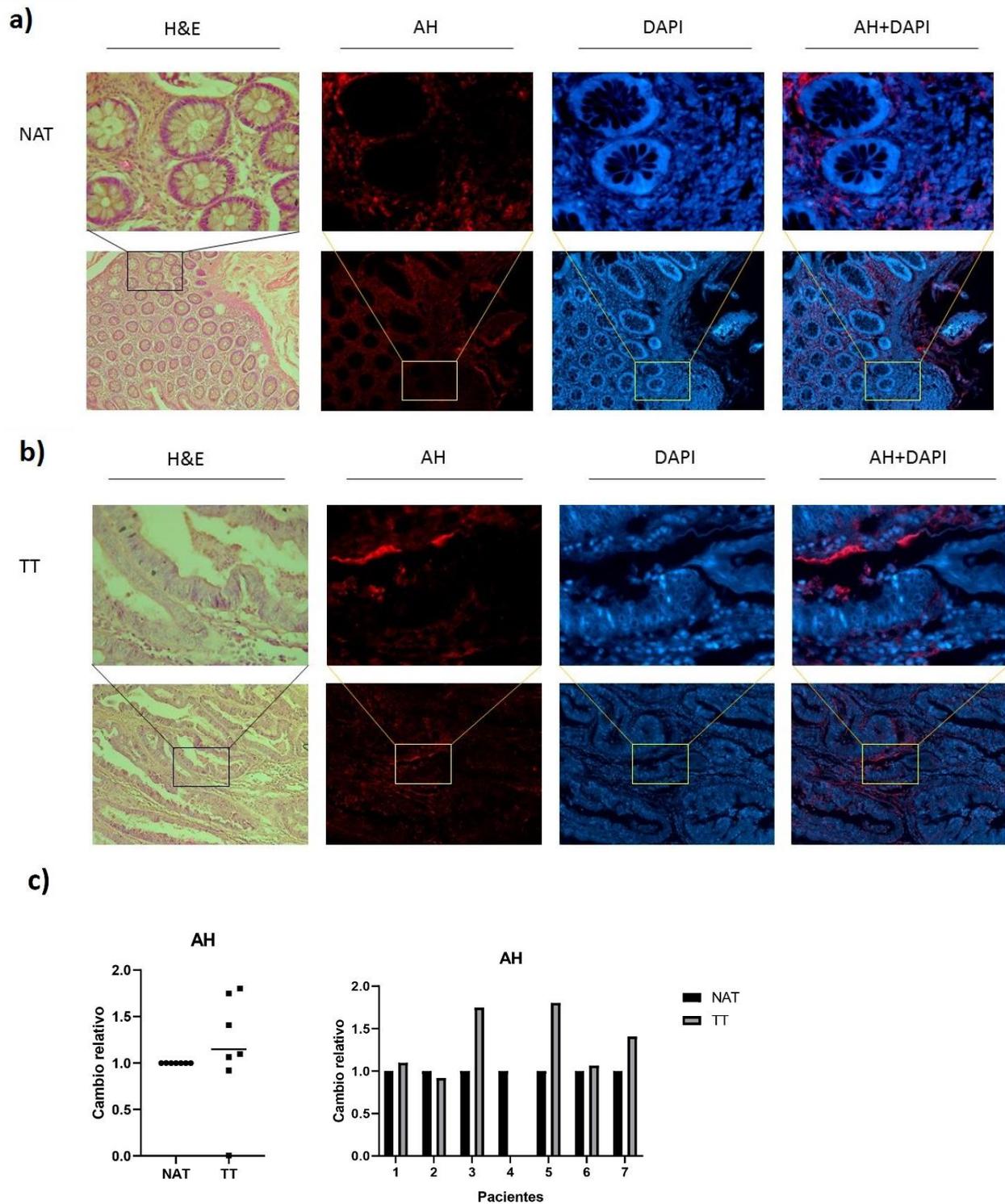


Figura 17. Inmunofluorescencia contra AH en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de AH en el NAT de pacientes con cáncer colorrectal (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de AH en el TT de pacientes con cáncer colorrectal. Ampliación 100× y 400×. (c) Análisis de AH en el TT y el NAT de pacientes con cáncer colorrectal mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 7 indican el número de paciente analizado.

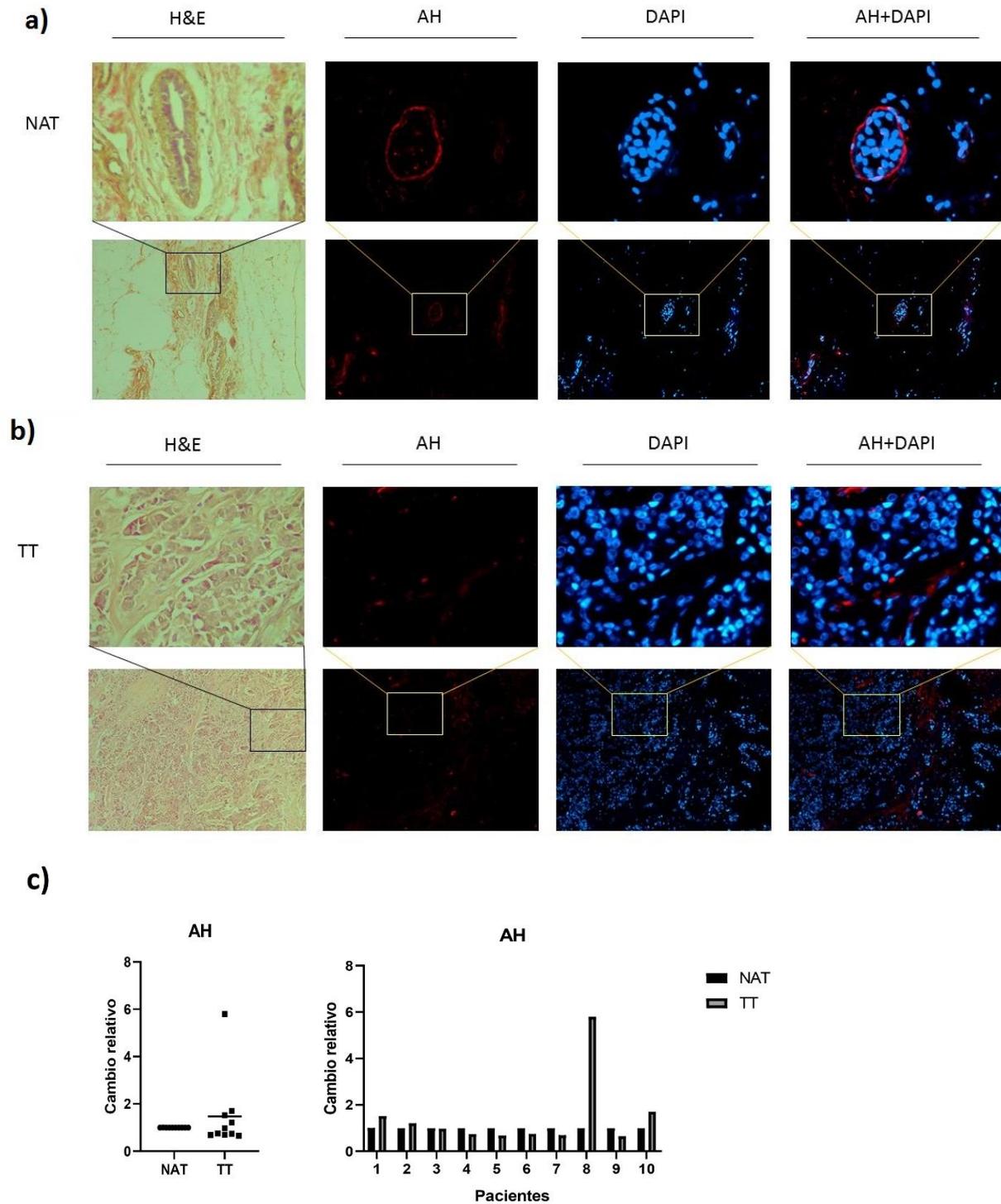


Figura 18. Inmunofluorescencia contra AH en tejidos de pacientes con cáncer de mama. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de AH en el NAT de pacientes con cáncer de mama (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de AH en el TT de pacientes con cáncer de mama. Ampliación 100x y 400x. (c) Análisis de AH en el TT y el NAT de pacientes con cáncer de mama mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 10 indican el número de paciente analizado.

Además de realizar un análisis teniendo en cuenta todos los datos clínicos de los pacientes, en aquellos casos en los que el número de pacientes era suficiente para realizar una subdivisión según algún dato clínico, se realizó la correspondiente clasificación. Los pacientes con cáncer colorrectal se clasificaron, como se mencionó anteriormente, en: femenino, masculino, estadio T3 y N0. Por otro lado, los pacientes con cáncer de mama se clasificaron en: estadio T1, estadio T2, subtipo luminal A, grado de Nottingham 3 y estadio N0. Sin embargo, en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el NAT y el TT (Figura 19 y Figura 20).

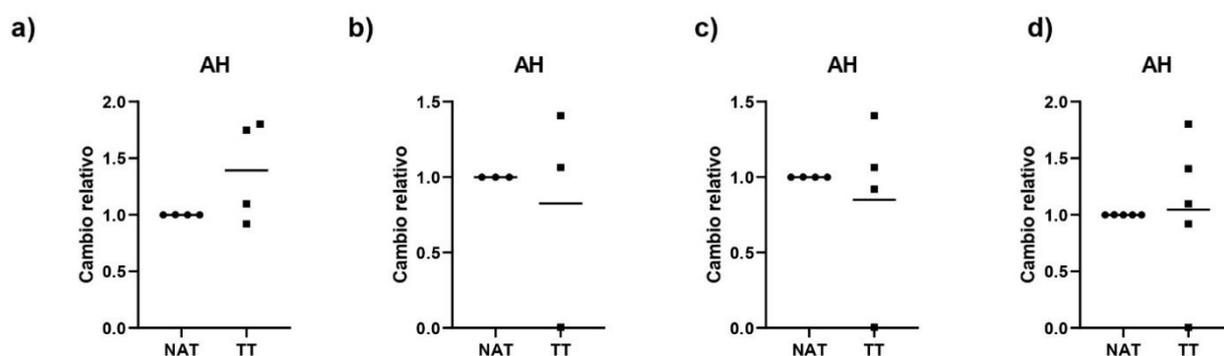


Figura 19. Niveles de AH en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninos, (b) masculinos, (c) en estadio T3 y (d) en estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (■) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo.

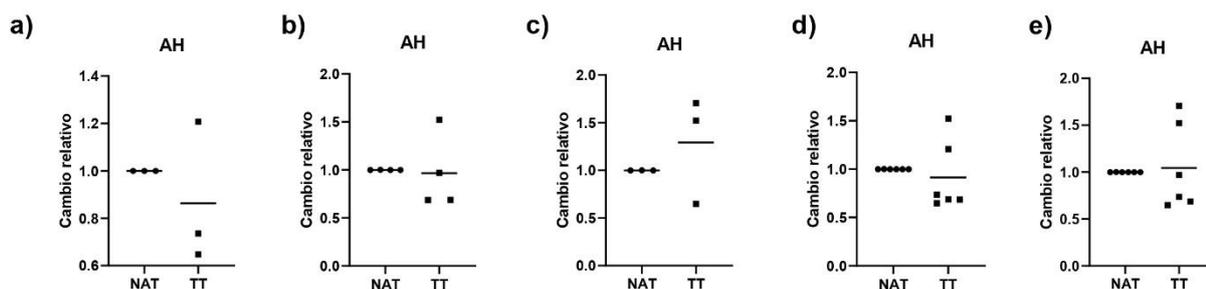


Figura 20. Niveles de AH en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 Y (e) en estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (■) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo.

1.4. Análisis de los niveles proteicos de CD44 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama

Además de los niveles de AH, se evaluaron los niveles proteicos de CD44, el principal receptor de AH, mediante inmunofluorescencia. Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra CD44 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama se muestran en la Figura 21 y Figura 22.

En cáncer colorrectal, los niveles de CD44 fueron significativamente más bajos en el TT en comparación con el NAT ($p=0,0169$) (Figura 21c). Solo un paciente presentó niveles de CD44 más altos en el TT que en el NAT (paciente 4) (Tabla 13). En cáncer de mama, no se encontró variación en los niveles de CD44 en el TT con respecto al NAT (Figura 22c). Sin embargo, tres pacientes mostraron un aumento de CD44 en el TT en comparación con el NAT (pacientes 2, 4 y 7) (Tabla 14).

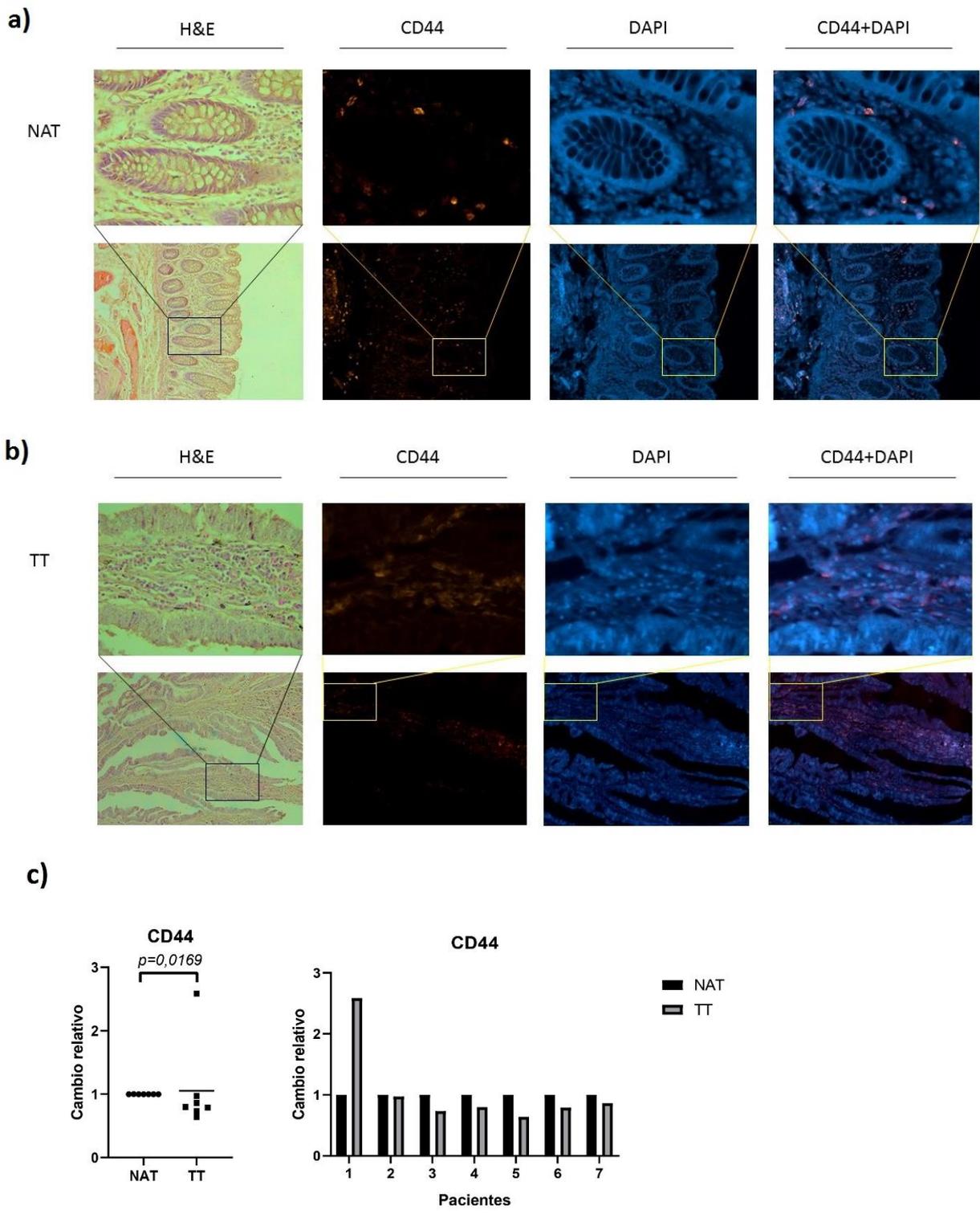


Figura 21. Inmunofluorescencia contra CD44 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de CD44 en el NAT de pacientes con cáncer colorrectal (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de CD44 en el TT de pacientes con cáncer colorrectal. Ampliación 100× y 400×. (c) Análisis de CD44 en TT y NAT de pacientes con cáncer colorrectal mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 7 indican el número de paciente analizado.

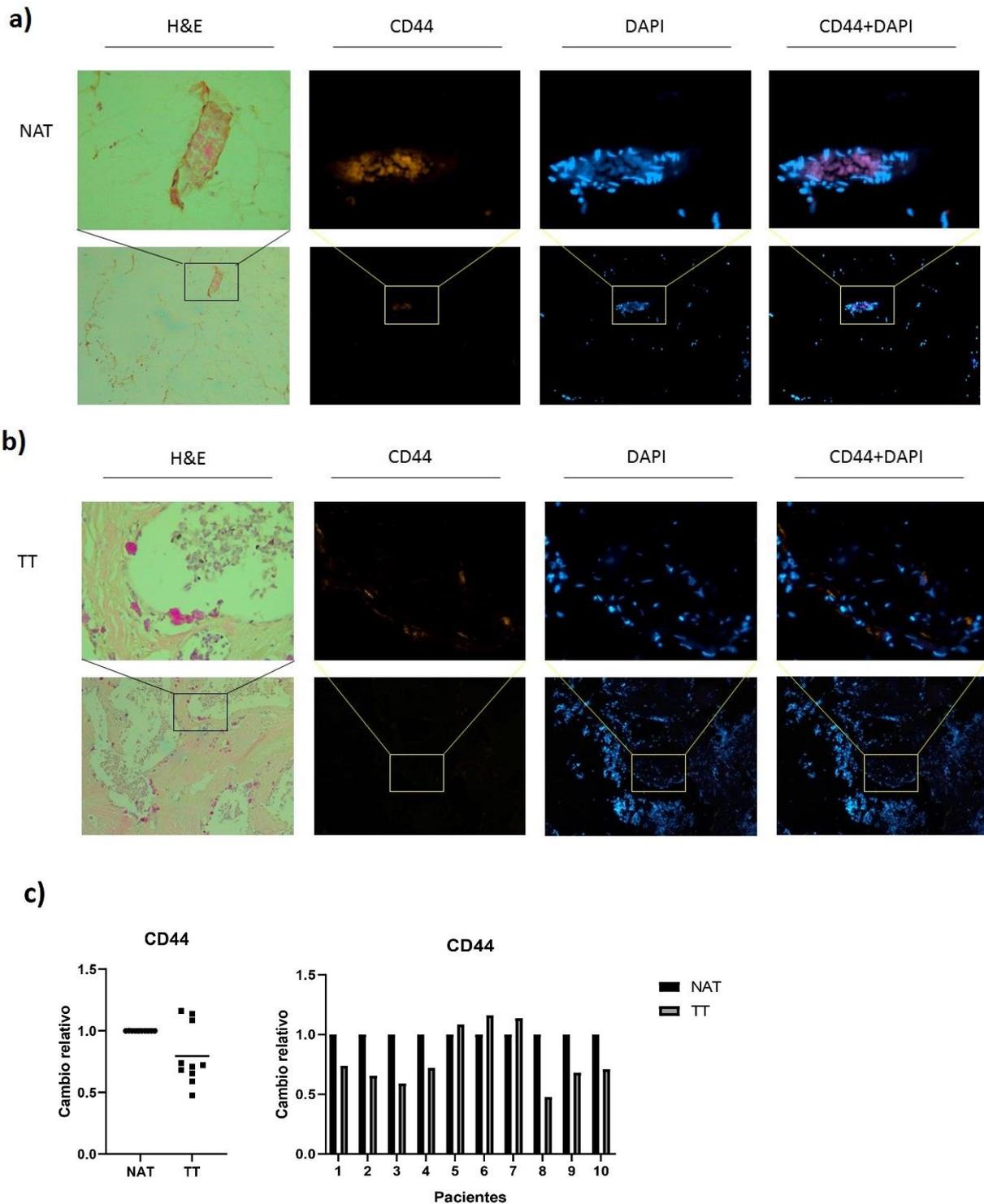


Figura 22. Inmunofluorescencia contra CD44 en tejidos de pacientes con cáncer de mama. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de CD44 en el NAT de pacientes con cáncer de mama (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de CD44 en el TT de pacientes con cáncer de mama. Ampliación 100× y 400×. (c) Análisis de CD44 en TT y NAT de pacientes con cáncer de mama mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 10 indican el número de paciente analizado.

Además de realizar un análisis teniendo en cuenta todos los datos clínicos de los pacientes, en aquellos casos en los que el número de pacientes era suficiente para realizar una subdivisión según algún dato clínico, se realizó la correspondiente clasificación. Los pacientes con cáncer de mama se clasificaron en: estadio T1, estadio T2, subtipo luminal A, grado de Nottingham 3 y estadio N0. Los pacientes en estadio T1, subtipo molecular luminal A y estadio N0 mostraron niveles de CD44 significativamente menores en el TT con respecto al NAT ($p=0,0037$, $p= 0,0032$ y $p=0,0476$, respectivamente) (Figura 23a, 23c y 23e, respectivamente).

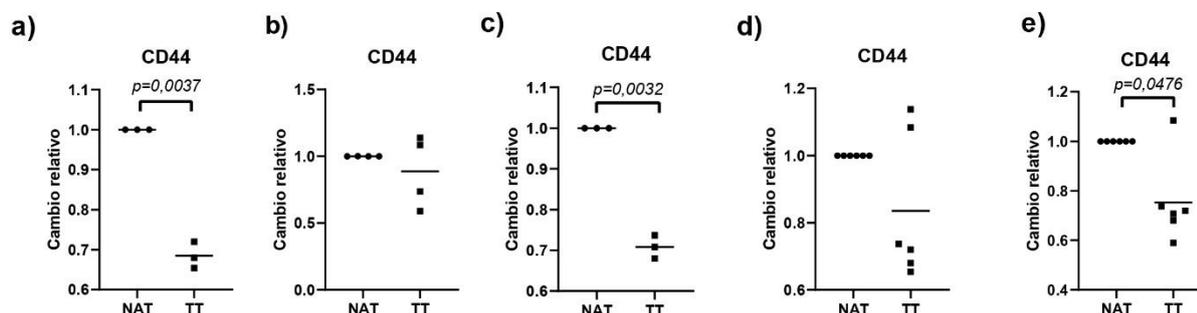


Figura 23. Niveles de CD44 en pacientes con cáncer de mama teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) en estadio T1, (b) en estadio T2, (c) subtipo luminal A, (d) grado de Nottingham 3 y (e) estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (▪) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

1.5. Análisis de los niveles proteicos de BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama

Para corroborar si el ARNm de *BRCA1* y *BRCA2* detectado efectivamente se refleja a nivel de proteínas, se midieron los niveles de proteínas BRCA1 y BRCA2 mediante inmunofluorescencia.

1.5.1. Análisis de los niveles proteicos de BRCA1 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama

Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra BRCA1 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama se muestran en la Figura 24 y Figura 25. Curiosamente, la expresión de BRCA1 en NAT de cáncer colorrectal se localiza mayoritariamente en las células encargadas de producir moco presentes en las glándulas de la mucosa intestinal (Figura 24).

Además, en ambos tipos de cáncer, la expresión de esta proteína se da principalmente en el citoplasma de las células que conforman los tejidos correspondientes (Figura 24 y Figura 25).

Tanto en cáncer colorrectal como en cáncer de mama se observó una disminución de los niveles de BRCA1 en TT con respecto a NAT (cáncer colorrectal: $p=0,0169$; cáncer de mama: $p<0,0001$) (Figura 24 y Figura 25).

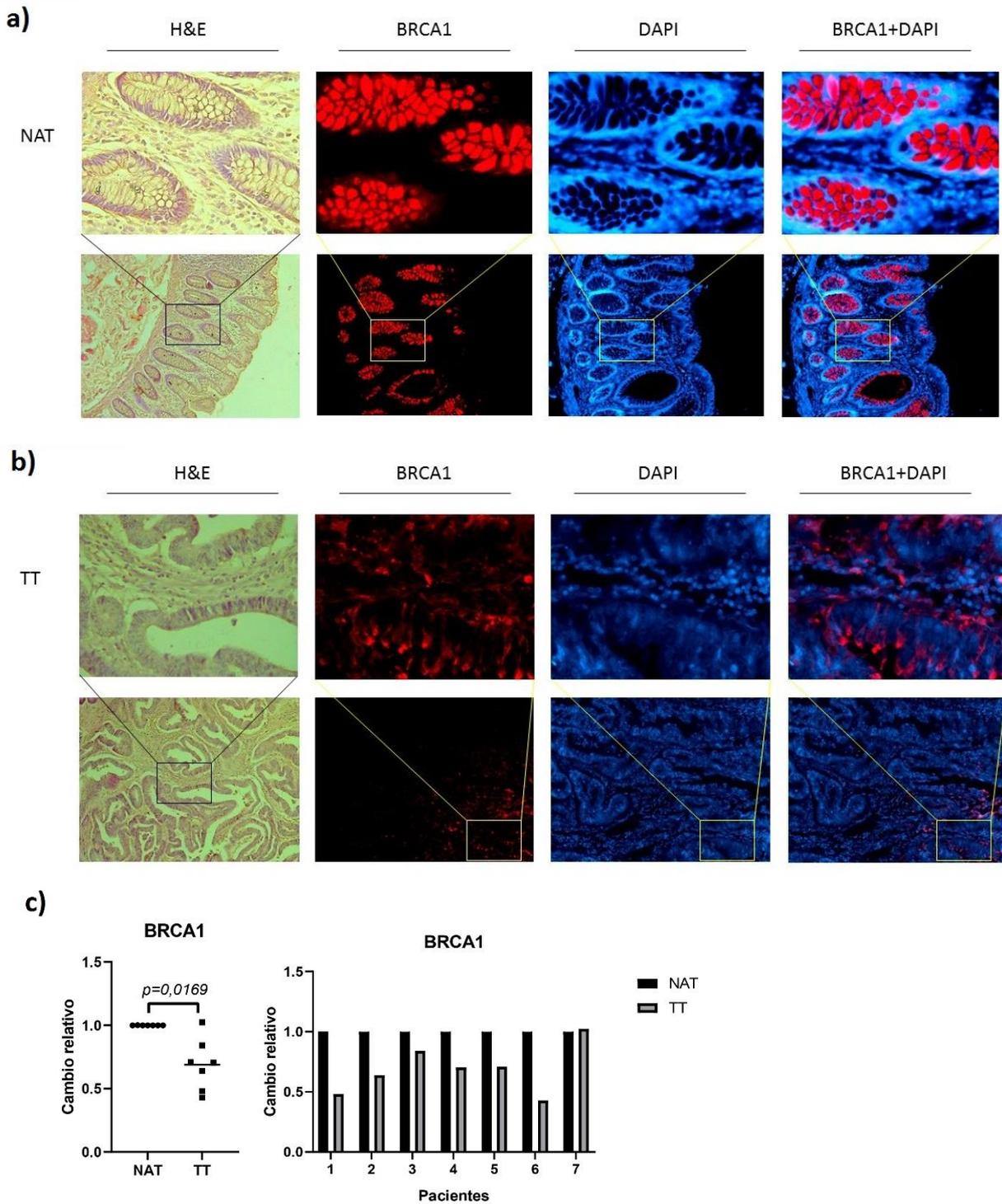


Figura 24. Inmunofluorescencia contra BRCA1 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA1 en el NAT de pacientes con cáncer colorrectal. (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA1 en el TT de pacientes con cáncer colorrectal. Ampliación 100× y 400×. (c) Análisis de BRCA1 en el TT y el NAT de pacientes con cáncer colorrectal mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 7 indican el número de paciente analizado.

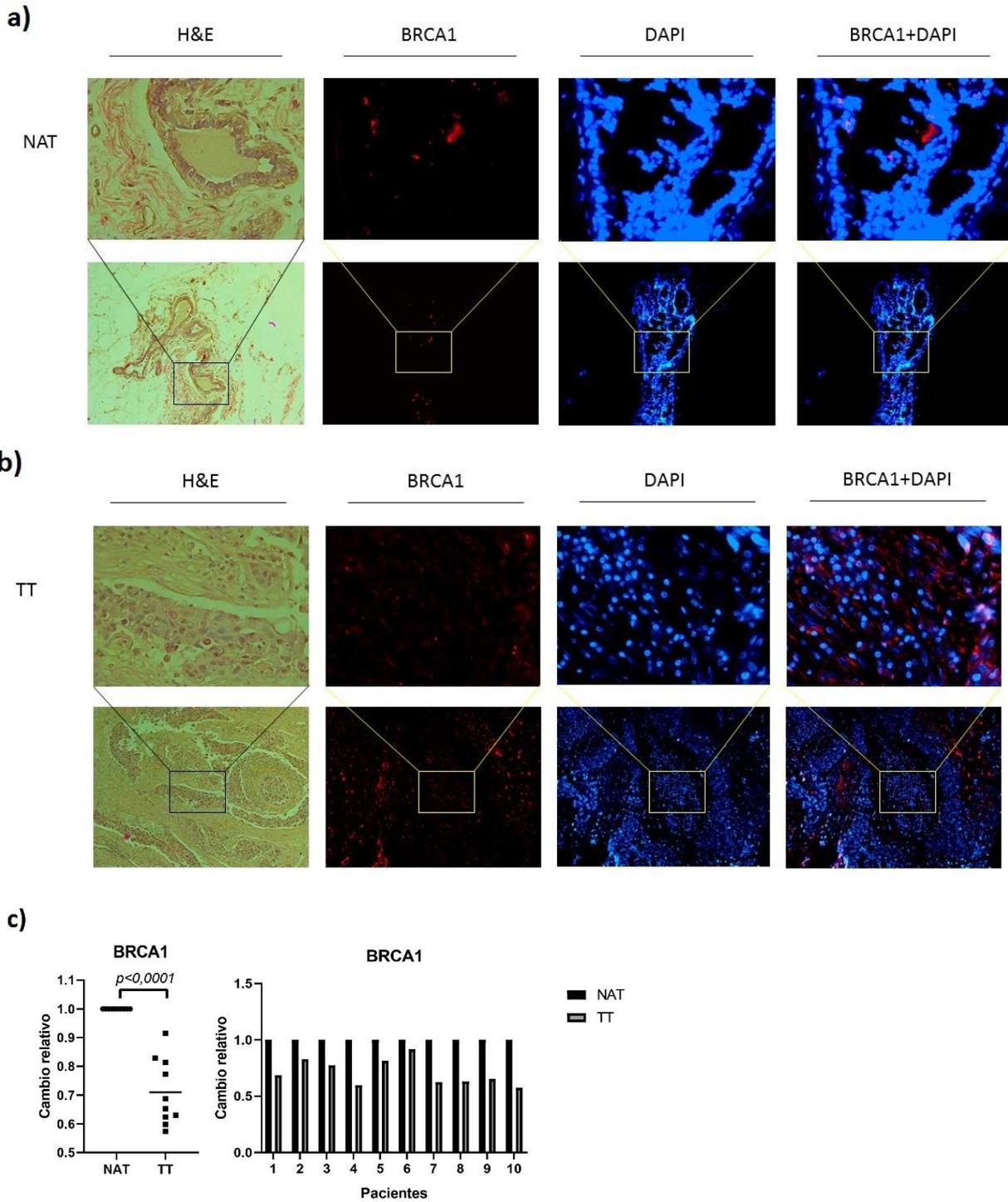


Figura 25. Inmunofluorescencia contra BRCA1 en tejidos de pacientes con cáncer de mama. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA1 en el NAT de pacientes con cáncer de mama. (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA1 en el TT de pacientes con cáncer de mama. Ampliación 100x y 400x. (c) Análisis de BRCA1 en el TT y el NAT en pacientes con cáncer de mama mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (■) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 10 indican el número de paciente analizado.

1.5.2. Análisis de los niveles proteicos de BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama

Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra BRCA2 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama se muestran en la Figura 26 y Figura 27.

BRCA2 solo disminuye significativamente en cáncer de mama ($p < 0,0001$) pero no en cáncer colorrectal (Figura 26 y Figura 27). En cáncer colorrectal, cuatro pacientes mostraron niveles de BRCA2 mayores en el TT en comparación con el NAT (Tabla 13).

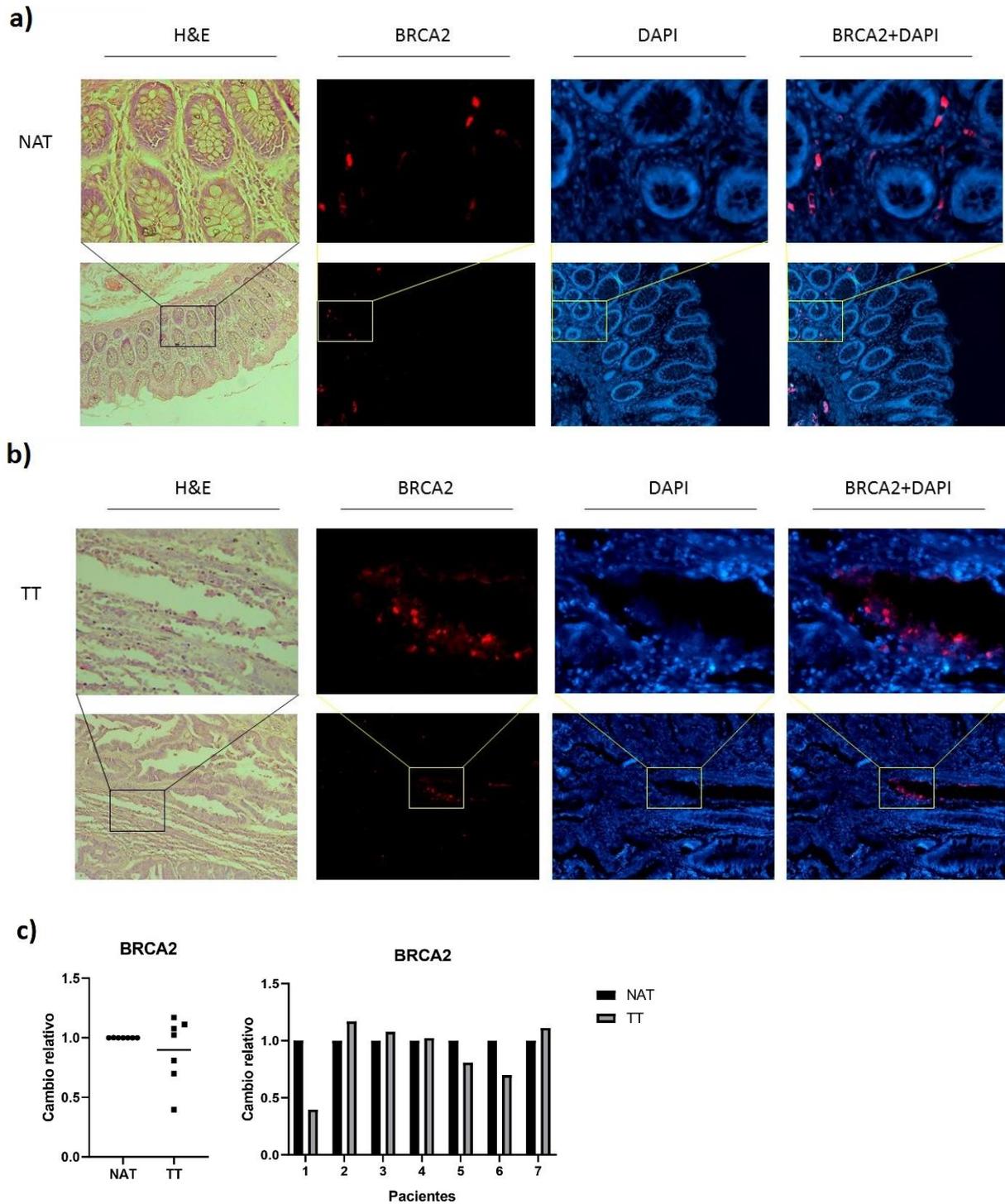


Figura 26. Inmunofluorescencia contra BRCA2 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA2 en el NAT de pacientes con cáncer colorrectal. (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA2 en el TT de pacientes con cáncer colorrectal. Ampliación 100× y 400×. (c) Análisis de BRCA2 en el TT y el NAT de pacientes con cáncer colorrectal mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (▪) en relación con NAT (●). Los valores de *p* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 7 indican el número de paciente analizado.

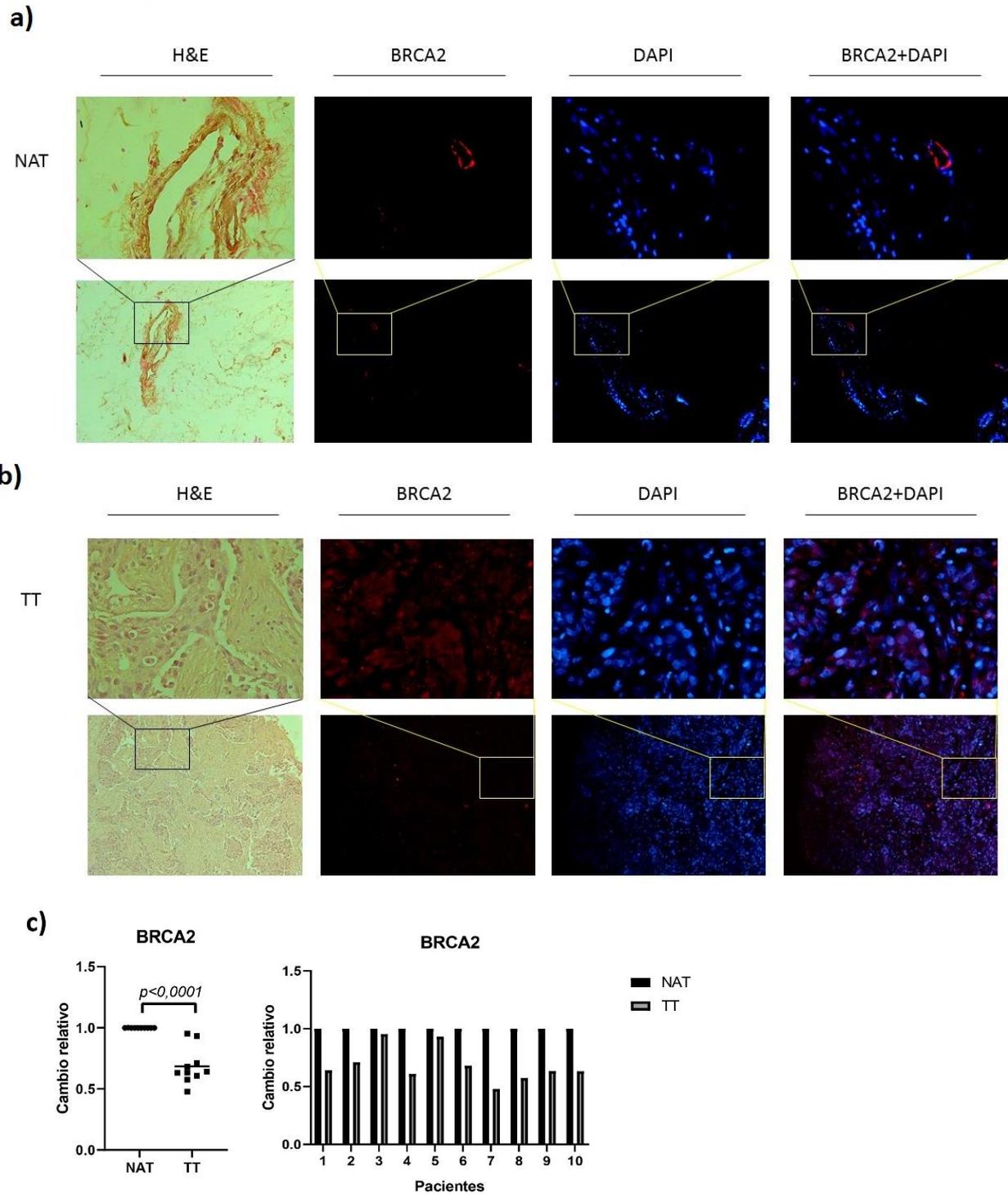


Figura 27. Inmunofluorescencia contra BRCA2 en tejidos de pacientes con cáncer de mama. (a) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA2 en el NAT de pacientes con cáncer de mama. (b) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica de BRCA2 en el TT de pacientes con cáncer de mama. Ampliación 100x y 400x. (c) Análisis de BRCA2 en el TT y el NAT de pacientes con cáncer de mama mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como TT (▪) en relación con NAT (●). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los números del 1 al 10 indican el número de paciente analizado.

Además de realizar un análisis teniendo en cuenta todos los datos clínicos de los pacientes, en aquellos casos en los que el número de pacientes era suficiente para realizar una subdivisión según algún dato clínico y realizar el correspondiente análisis estadístico, se realizó la correspondiente clasificación. Los pacientes con cáncer colorrectal se clasificaron en: femenino, masculino, estadio T3 y estadio N0. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el NAT y el TT (Figura 28).

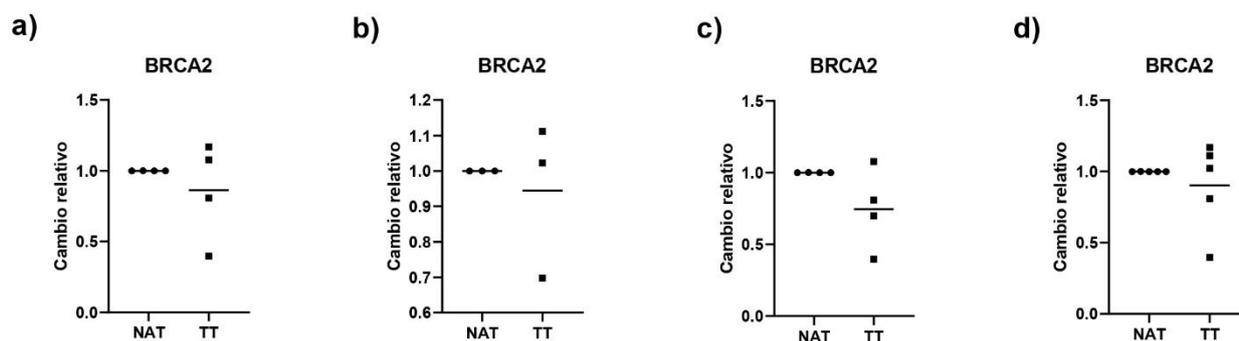


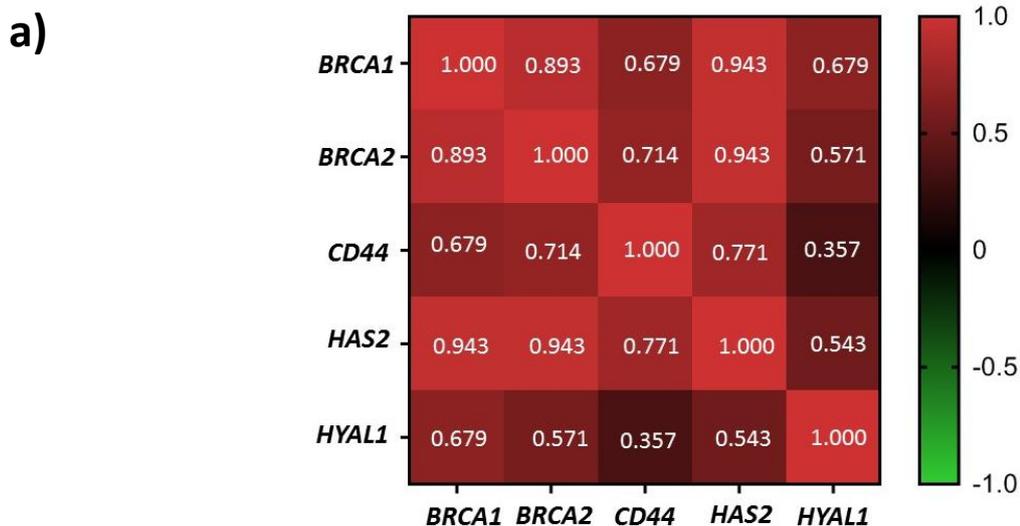
Figura 28. Niveles de BRCA2 en pacientes con cáncer colorrectal teniendo en cuenta solo a los pacientes: (a) femeninos, (b) masculinos, (c) estadio T3 y (d) estadio N0. Los datos se presentaron como la relación entre la expresión en el TT (■) y el NAT (●). Un valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo.

Pudimos observar que, en cáncer de mama, tanto los niveles de ARNm como de proteínas de BRCA1 y BRCA2 aumentan o disminuyen conjuntamente en el TT con respecto al NAT (Tabla 14). Sin embargo, esta tendencia no se observa en cáncer colorrectal (Tabla 13).

1.6. Análisis de correlación de los marcadores evaluados

Se realizó un análisis para evaluar las variaciones de los marcadores individuales en el TT en comparación con el NAT. Sin embargo, esta relación no siempre es directa. En algunos casos, ciertos valores pueden aumentar o disminuir simultáneamente, formando grupos. Para analizar esta posibilidad, se realizó un análisis de correlación teniendo en cuenta los niveles de ARNm de *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1*.

En cáncer colorrectal, se observó una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión del ARNm de *BRCA1* y *BRCA2* ($r= 0,893$; $p=0,012$), *BRCA1* y *HAS2* ($r= 0,943$; $p=0,033$) y *BRCA2* y *HAS2* ($r= 0,943$; $p=0,017$) (Figura 29). Esto podría indicar que, en cáncer colorrectal, los genes de reparación del ADN *BRCA1* y *BRCA2* están correlacionados con el metabolismo de AH, ya que su expresión varía cuando varía la de la sintasa de AH *HAS2*.



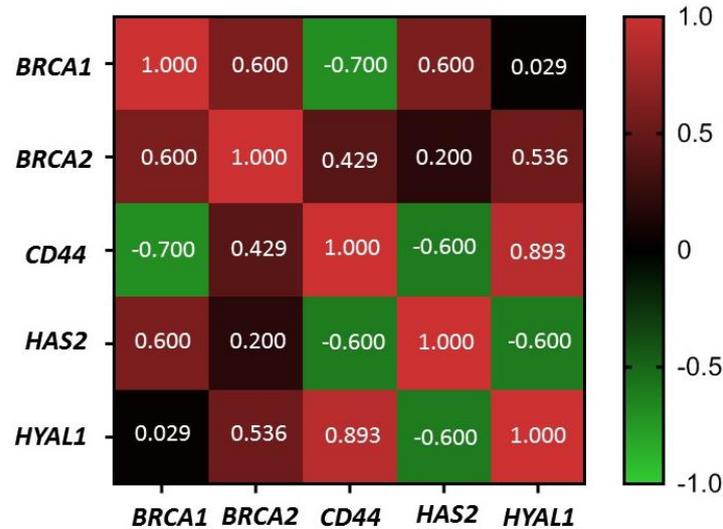
b)

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CD44</i>	<i>HAS2</i>	<i>HYAL1</i>
<i>BRCA1</i>	-	0,012	0,110	0,017	0,110
<i>BRCA2</i>	0,012	-	0,088	0,017	0,2
<i>CD44</i>	0,110	0,088	-	0,103	0,444
<i>HAS2</i>	0,033	0,017	0,103	-	0,297
<i>HYAL1</i>	0,110	0,2	0,444	0,297	-

Figura 29. Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y valores p asociados. (a) Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. Los resultados del análisis de correlación para se muestran como un mapa de calor con los valores de los coeficientes de correlación (r) obtenidos. Todos los valores de r entre 0,5 y 0,7 (o entre -0,7 y -0,5) se consideraron una correlación moderada y valores superiores a 0,7 (o inferiores a -0,7), una correlación fuerte. (b) Valores p asociados a los coeficientes de correlación. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y están representados en negrita; Los valores de p superiores a 0,05 se representan en cursiva.

En cáncer de mama, se observó una fuerte correlación positiva entre el ARNm de *CD44* e *HYAL1* ($r= 0,893$; $p=0,012$) (Figura 30), indicando que cuando aumenta la expresión del ARNm del receptor de AH *CD44*, aumenta la expresión del ARNm de la hialuronidasa de AH *HYAL1*, y viceversa.

a)



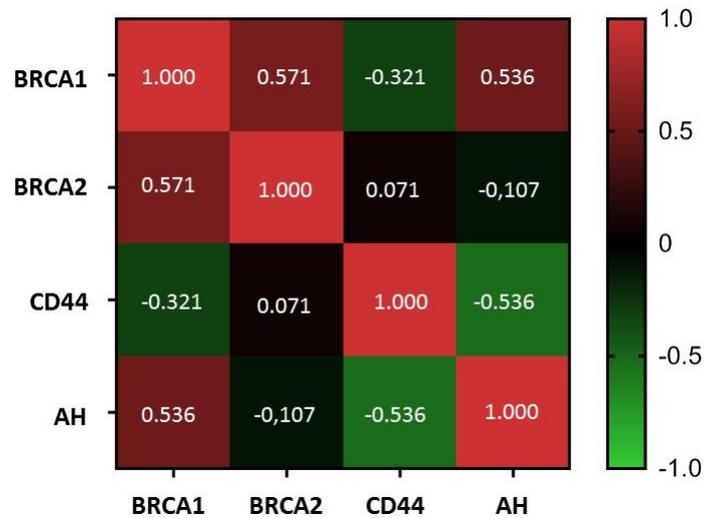
b)

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CD44</i>	<i>HAS2</i>	<i>HYAL1</i>
<i>BRCA1</i>	-	<i>0,242</i>	0,233	<i>0,417</i>	<i>1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>0,242</i>	-	0,419	<i>0,783</i>	<i>0,236</i>
<i>CD44</i>	0,233	<i>0,419</i>	-	<i>0,350</i>	0,012
<i>HAS2</i>	<i>0,417</i>	<i>0,783</i>	0,35	-	<i>0,350</i>
<i>HYAL1</i>	<i>1</i>	<i>0,236</i>	0,012	<i>0,350</i>	-

Figura 30. Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama y valores p asociados. (a) Análisis de correlación entre los niveles de ARNm evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama. Los resultados del análisis de correlación se muestran como un mapa de calor con los valores de los coeficientes de correlación (r) obtenidos. Todos los valores de r entre 0,5 y 0,7 (o entre -0,7 y -0,5) se consideraron una correlación moderada y valores superiores a 0,7 (o inferiores a -0,7), una correlación fuerte. (b) Valores p asociados a los coeficientes de correlación. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y están representados en negrita; Los valores de p superiores a 0,05 se representan en cursiva.

Por otro lado, se realizó un análisis de correlación teniendo en cuenta los resultados de inmunofluorescencia, es decir, de los niveles AH y de las proteínas de BRCA1, BRCA2 y CD44. Se observó que, en cáncer colorrectal, ningún marcador evaluado presentó una correlación fuerte (Figura 31). Sin embargo, en cáncer de mama las proteínas BRCA1 y BRCA2 mostraron una correlación fuerte ($r= 0,77$; $p=0,013$) (Figura 32).

a)

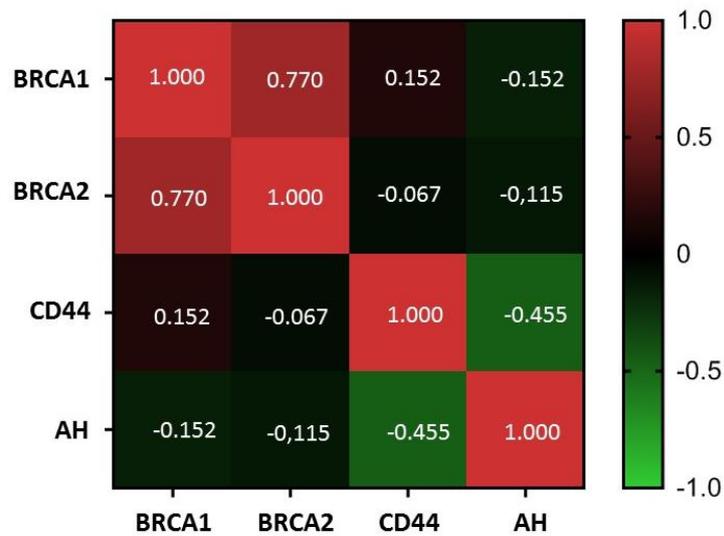


b)

	BRCA1	BRCA2	CD44	AH
BRCA1	-	<i>0,2</i>	<i>0,498</i>	<i>0,236</i>
BRCA2	<i>0,2</i>	-	<i>0,906</i>	<i>0,84</i>
CD44	<i>0,498</i>	<i>0,906</i>	-	<i>0,236</i>
AH	<i>0,236</i>	<i>0,84</i>	<i>0,236</i>	-

Figura 31. Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y valores p asociados. (a) Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal. Los resultados del análisis de correlación se muestran como un mapa de calor con los valores de los coeficientes de correlación (r) obtenidos. Todos los valores de r entre 0,5 y 0,7 (o entre -0,7 y -0,5) se consideraron una correlación moderada y valores superiores a 0,7 (o inferiores a -0,7), una correlación fuerte. (b) Valores p asociados a los coeficientes de correlación. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y están representados en negrita; Los valores de p superiores a 0,05 se representan en cursiva.

a)



b)

	BRCA1	BRCA2	CD44	AH
BRCA1	-	0,013	<i>0,682</i>	<i>0,682</i>
BRCA2	0,013	-	<i>0,865</i>	<i>0,759</i>
CD44	<i>0,682</i>	<i>0,865</i>	-	<i>0,191</i>
AH	<i>0,682</i>	<i>0,759</i>	<i>0,191</i>	-

Figura 32. Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama y valores p asociados. (a) Análisis de correlación entre los niveles de AH y proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 evaluados en tejidos de pacientes con cáncer de mama. Los resultados del análisis de correlación se muestran como un mapa de calor con los valores de los coeficientes de correlación (r) obtenidos. Todos los valores de r entre 0,5 y 0,7 (o entre -0,7 y -0,5) se consideraron una correlación moderada y valores superiores a 0,7 (o inferiores a -0,7), una correlación fuerte. (b) Valores p asociados a los coeficientes de correlación. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y están representados en negrita; Los valores de p superiores a 0,05 se representan en cursiva.

En conjunto, estos resultados indican que existe una asociación entre los genes de reparación del ADN y los genes del metabolismo de AH en cáncer colorrectal y cáncer de mama.

2. CULTIVO CELULAR

Para evaluar el efecto de la degradación del AH y de la inhibición de su síntesis, se realizaron ensayos de formación de tumoresferas *in vitro* mediante la técnica de gota colgante utilizando células MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 tratadas con HYAL o 4-MU.

2.1. Ensayo de viabilidad celular

Para corroborar que las células que forman las tumoresferas son viables al final del experimento, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante la técnica de MTS.

Al tratar las células MDA-MB-231 con 0,5mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 5 y 8 manteniéndolas durante 11 días en cultivo, no hubo diferencias significativas en la absorbancia (490nm) registrada con respecto al control sin tratamiento. Esto quiere decir que, con estas dosis de tratamiento, es posible mantener la viabilidad de las células durante el ensayo (Figura 33).

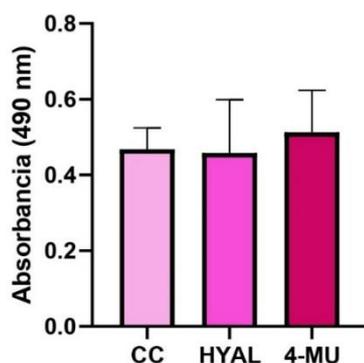


Figura 33. Ensayo de viabilidad celular de MDA-MB-231. Se trataron las células MDA-MB-231 con 0,5 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 5 y 8 y se mantuvieron en cultivo durante 11 días. En el día 11, se cosecharon las células y se midió la absorbancia a 490 nm. CC indica control células, estas células solo recibieron medio de crecimiento en los días indicados para los tratamientos. HYAL hace referencia a las células tratadas con HYAL y 4-MU a las células tratadas con 4-MU. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Las células MCF-7 se trataron con 0,5 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 3 y 5 y se mantuvieron en cultivo durante 8 días. Sin embargo, al medir la absorbancia (490 nm) se obtuvo

una disminución de la misma al tratar las células con 4-MU con respecto al tratamiento con HYAL ($p=0,0155$), lo que significaría una disminución en la viabilidad celular en dichas condiciones (Figura 34a). Por lo tanto, se realizó otro experimento tratando las células con 0,25 mM de 4-MU, manteniendo la misma concentración de HYAL (10 U/ml). En este caso, no se observaron diferencias en la viabilidad celular entre los tratamientos y el control, por lo que se seleccionaron estas dosis de tratamientos (0,25 mM de 4-MU y 10 U/ml de HYAL) para realizar el ensayo (Figura 34b).

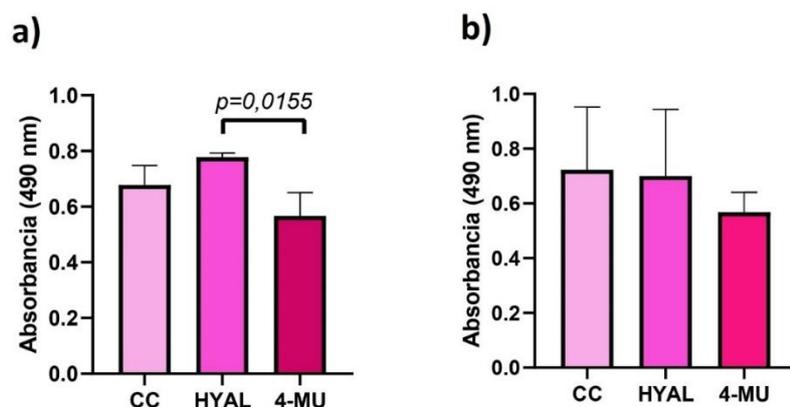


Figura 34. Ensayo de viabilidad celular de MCF-7. a) Se trataron las células MCF-7 con 0,5 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 3 y 5 y se mantuvieron en cultivo durante 8 días. En el día 8, se cosecharon las células y se midió la absorbancia a 490 nm. b) Las células se trataron con 0,25 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL. CC indica control células, estas células solo recibieron medio de crecimiento en los días indicados para los tratamientos. HYAL hace referencia a las células tratadas con HYAL y 4-MU a las células tratadas con 4-MU. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

La línea celular Caco-2 se trató con 0,25 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 3 y 5 y se mantuvieron en cultivo durante 8 días. Al finalizar el ensayo, se midió la absorbancia emitida a 490 nm. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control sin tratar (Figura 35a), se trataron las células con una concentración menor de 4-MU debido a que la viabilidad resultó ser menor con este tratamiento. Dado que otros estudios llevados a cabo con esta línea celular han utilizado una concentración de 4-MU de 0,2 mM, se optó por tratar las células con esta dosis. En este caso, no se observaron diferencias con respecto al control (Figura 35b).

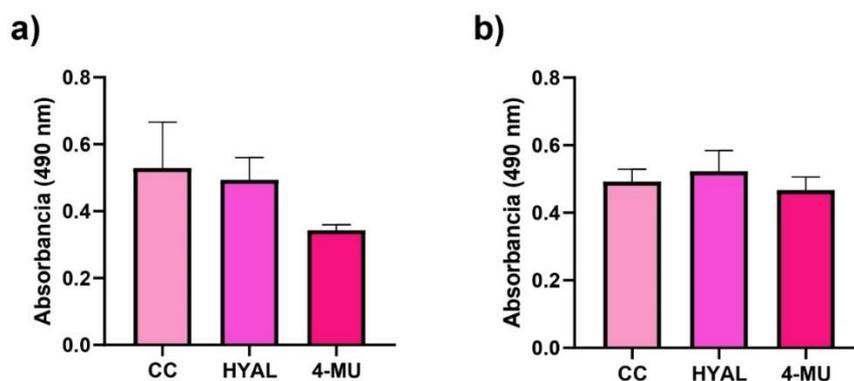


Figura 35. Ensayo de viabilidad celular de Caco-2. a) Se trataron las células Caco-2 con 0,25 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL en los días 0, 3 y 5 y se mantuvieron en cultivo durante 8 días. En el día 8, se cosecharon las células y se midió la absorbancia a 490 nm. b) Las células se trataron con 0,2 mM de 4-MU o 10 U/ml de HYAL. CC indica control células, estas células solo recibieron medio de crecimiento en los días indicados para los tratamientos. HYAL hace referencia a las células tratadas con HYAL y 4-MU a las células tratadas con 4-MU. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Estos resultados han permitido seleccionar la dosis adecuada de tratamiento para las tres líneas celulares más allá de los datos bibliográficos hallados, donde se han utilizado dosis similares en estas líneas celulares. De esta forma, dado que no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular, este ensayo nos permitió asegurar que las diferencias en el volumen, área y niveles ARNm de las tumorosferas analizados posteriormente se debieran a cambios en el comportamiento de las células y no a la muerte de las mismas y a una reducción consecuente en el número total de células.

2.2. Volumen y área de tumorosferas

Para evaluar el efecto de la degradación del AH y de la inhibición de su síntesis, se analizó el volumen y área de tumorosferas generadas con dos líneas celulares de cáncer de mama y una línea celular de cáncer de colon.

Las fotografías tomadas a partir de las tumorosferas generadas con la línea celular MDA-MB-231 se muestran en la Figura 36. Esta línea celular mostró una disminución en el volumen de las tumorosferas generadas en el día 3 del ensayo al tratarlas con 4-MU con respecto al tratamiento con HYAL ($p=0,0261$). En el día 5 no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos. En el día 8 se observó la disminución de volumen al tratar las tumorosferas con 4-MU con respecto a las

tumorosferas sin tratar (CC) ($p=0,0046$). En el día 11 del experimento, se observó una disminución del volumen al realizar el tratamiento con 4-MU en comparación con las tumorosferas sin tratar ($p=0,0237$) y las tratadas con HYAL ($p=0,0403$) (Figura 37a).

Al analizar el área de las tumorosferas, en el día 3 del ensayo aumentó el área de las tumorosferas tratadas con HYAL, con respecto al tratamiento con 4-MU ($p=0,0263$) y a las no tratadas ($p=0,0323$) (Figura 37b). Esta controversia entre el volumen y el área podría deberse a que estas tumorosferas eran menos compactas a la vista, observándose las células más dispersas entre sí (Figura 36). En el día 5, no se observaron variaciones estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en el día 8 del experimento, hubo una disminución significativa del área de las tumorosferas al tratarlas con 4-MU respecto a las tumorosferas sin tratar ($p=0,0036$) y a las tratadas con HYAL ($p=0,0196$). En el día 11 se mantuvo esta diferencia, con disminución significativa del área de las tumorosferas con el tratamiento con 4-MU con respecto a las tratadas con HYAL ($p=0,0188$) y a las no tratadas ($p=0,0082$) (Figura 37b), similar a lo observado en el análisis del volumen. Esto indica que la inhibición de la síntesis del AH influye negativamente en el volumen y área de las tumorosferas que se forman con la línea celular MDA-MB-231 y que la degradación del AH ya sintetizado tiene un efecto positivo en estas variables.

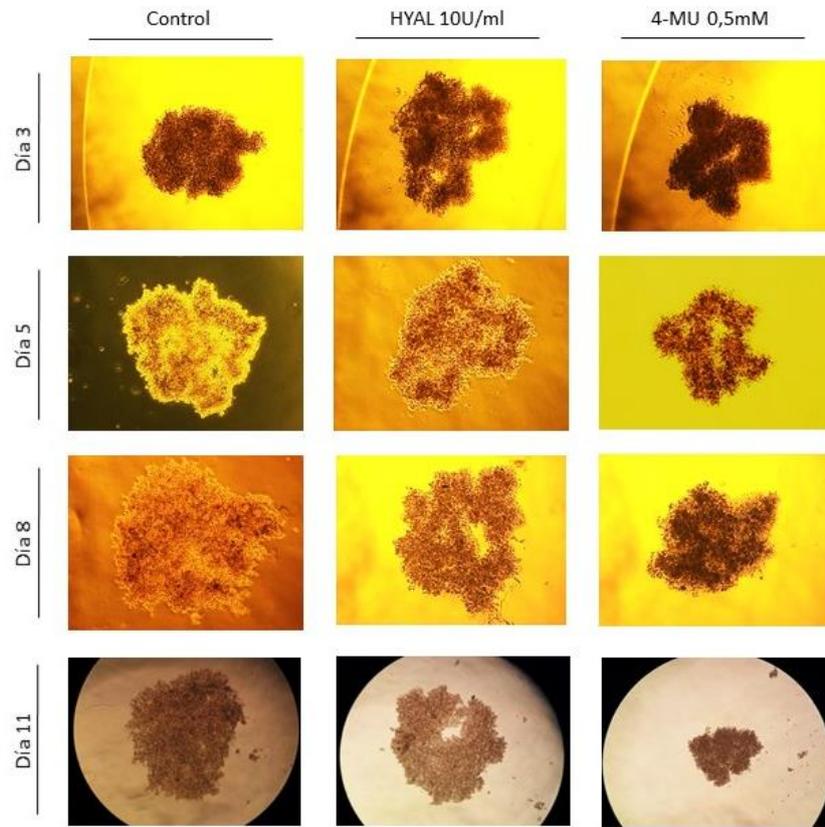


Figura 36. Crecimiento tridimensional de tumosferas de MDA-MB-231 por método de gota colgante. Al día 0 se realizaron cultivos tridimensionales mediante el método de gota colgante de células MDA-MB-231 con 8.000 células/gota/20 μ l. En ese momento se aplicaron los tratamientos con HYAL (10 U/ml) y 4-MU (0,5 mM), dejando células sin tratar como control. Al día 5 y 8 de cultivo, se reaplicó tratamiento a cada condición removiendo previamente el sobrenadante de cada esferoide. Los días 3, 5, 8 y 11 se tomaron micrografías con microscopio invertido de campo claro.

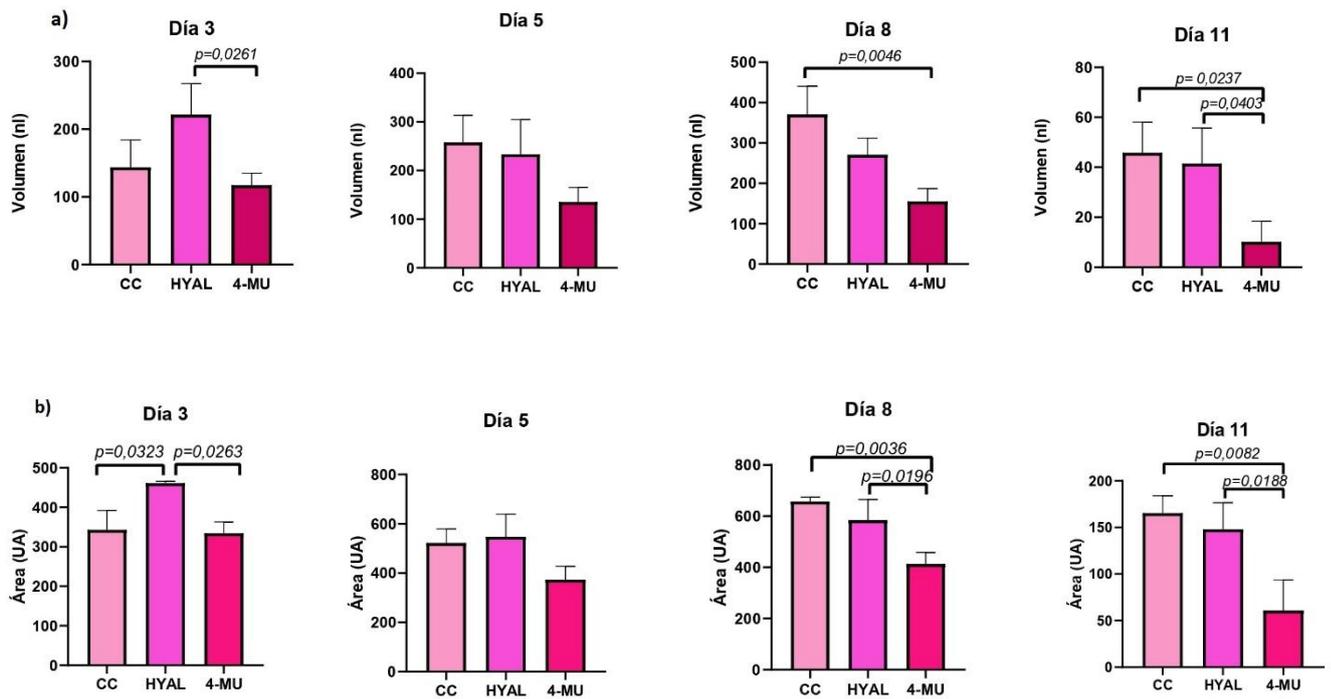


Figura 37. Volumen y área de tumorosferas de MDA-MB-231. a) Al día 11 de cultivo de MDA-MB-231 se calculó el volumen de las tumorosferas generadas. a) Al día 11 de cultivo de MDA-MB-231 se midió el área de las tumorosferas generadas. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

La línea celular MCF-7 formó tumorosferas más compactas que MDA-MB-231 (Figura 38). Al analizar el volumen, no se observó variación en los días 3 y 8 del ensayo. Sin embargo, en el día 5 se observó la disminución del volumen de las tumorosferas al tratarlas con 4-MU en comparación con el tratamiento con HYAL ($p=0,0186$) (Figura 39a). Por otro lado, al analizar el área de las tumorosferas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (Figura 39b).

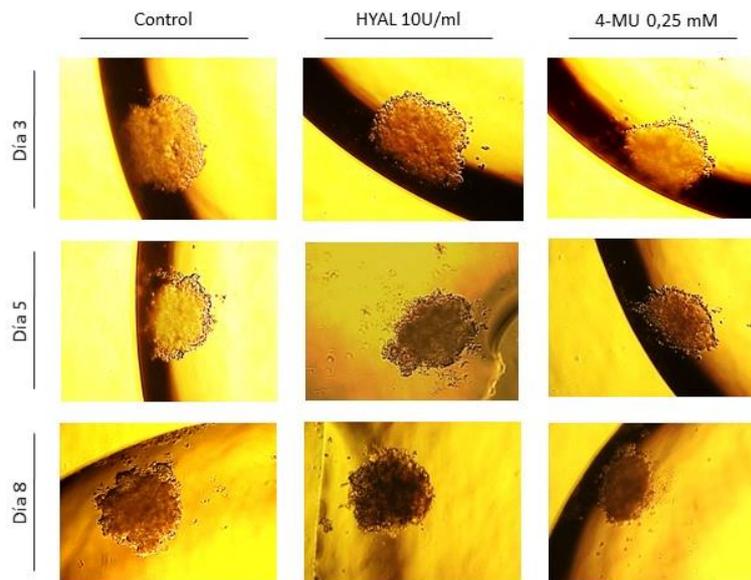
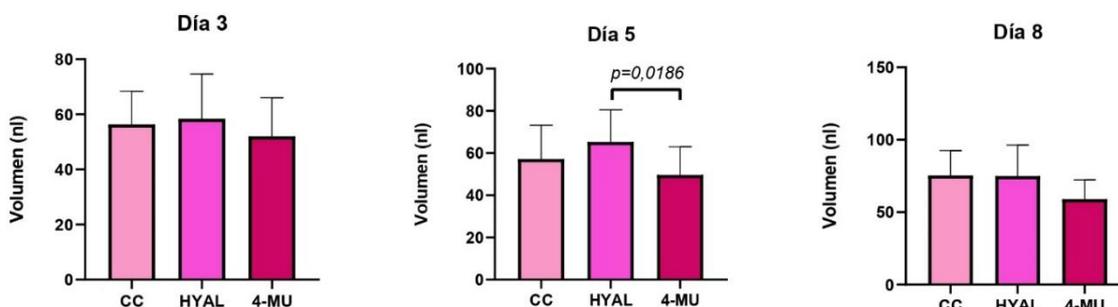


Figura 38. Crecimiento tridimensional de tumorosferas de MCF-7 por método de gota colgante.

Al día 0 se realizaron cultivos tridimensionales mediante el método de gota colgante de células MCF-7 con 8.000 células/gota/20 ul. En ese momento se aplicaron los tratamientos con HYAL (10 U/ml) y 4-MU (0,25 mM), dejando células sin tratar como control. Al día 3 y 5 de cultivo, se reaplicó tratamiento a cada condición removiendo previamente el sobrenadante de cada esferoide. Los días 3, 5 y 8 se tomaron micrografías con microscopio invertido de campo claro.

a)



b)

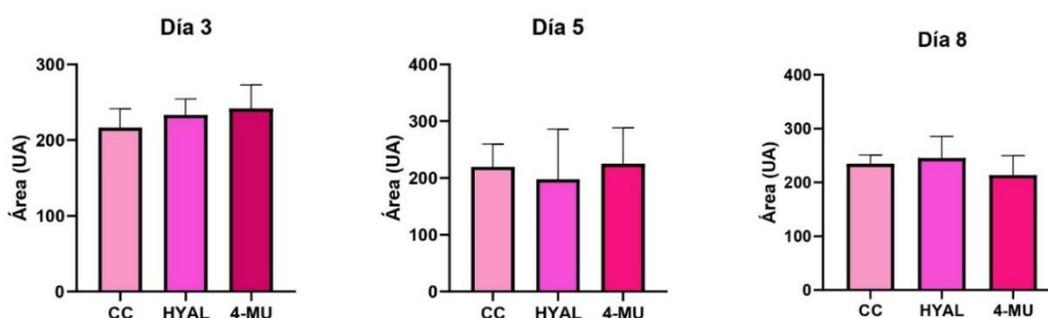


Figura 39. Volumen y área de tumosferas de MCF-7. a) Al día 8 de cultivo de MCF-7 se calculó el volumen de las tumosferas generadas. a) Al día 8 de cultivo de MCF-7 se midió el área de las tumosferas generadas. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Por otro lado, las tumosferas generadas con la línea celular de cáncer de colon Caco-2 se compactaron más que las generadas con MDA-MB-231, aunque menos que MCF-7 (Figura 40). Esta línea celular no mostró diferencias estadísticamente significativas en el volumen de las tumosferas generadas con los diferentes tratamientos (Figura 41a). Sin embargo, en el día 8 disminuyó el área con el tratamiento con 4-MU en comparación con el tratamiento con HYAL ($p=0,0002$) y sin tratamiento ($p=0,0061$) (Figura 41b), al igual que fue observado con la línea celular MDA-MB-231.

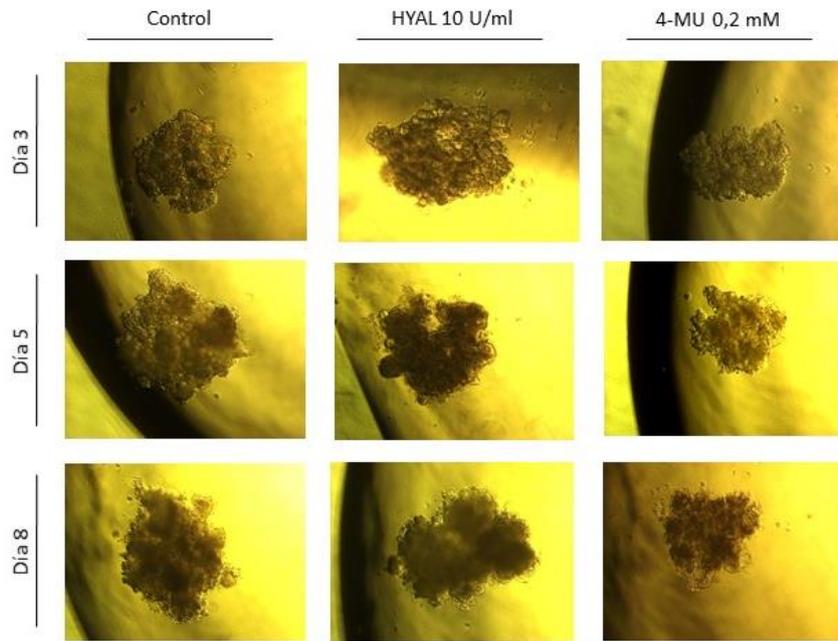
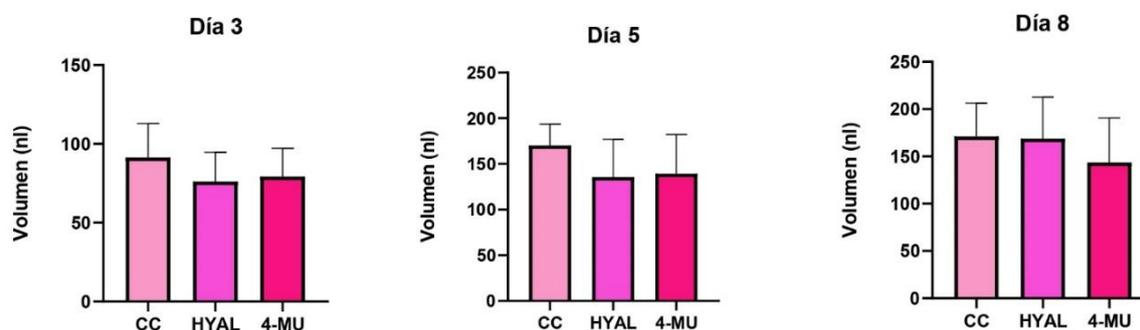


Figura 40. Crecimiento tridimensional de tumorosferas de Caco-2 por método de gota colgante. Al día 0 se realizaron cultivos tridimensionales mediante el método de gota colgante de células Caco-2 con 8.000 células/gota/20 ul. En ese momento se aplicaron los tratamientos con HYAL (10 U/ml) y 4-MU (0,2 mM), dejando células sin tratar como control. Al día 3 y 5 de cultivo, se reaplicó tratamiento a cada condición removiendo previamente el sobrenadante de cada esferoide. Los días 3, 5 y 8 se tomaron micrografías con microscopio invertido de campo claro.

a)



b)

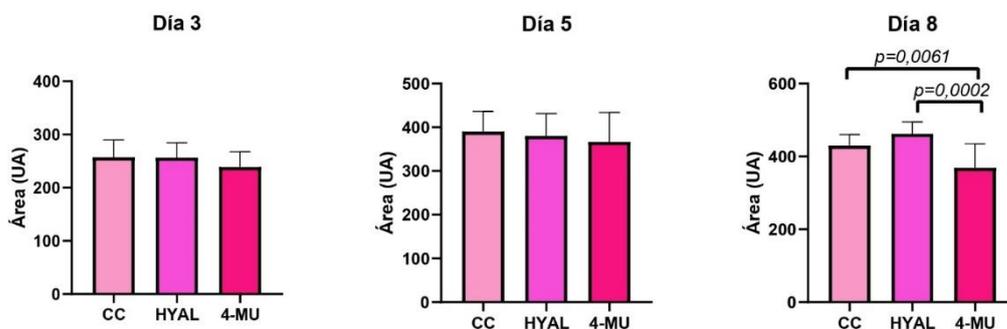


Figura 41. Volumen y área de tumosferas de Caco-2. a) Al día 8 de cultivo de Caco-2 se calculó el volumen de las tumosferas generadas. a) Al día 8 de cultivo de Caco-2 se midió el área de las tumosferas generadas. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

2.3. Análisis del ARNm

Para evaluar si la degradación del AH o la inhibición de su síntesis tiene algún efecto sobre la expresión de los genes de reparación del ADN y de los genes involucrados en el metabolismo del AH en las tumosferas generadas con las dos líneas celulares de cáncer de mama y la línea celular de cáncer de colon, se analizaron los niveles de ARNm de los genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS2* e *HYAL1*. Todos los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena *GAPDH* (MDA-MB-231) o *B2M* (MCF-7 y Caco-2) y se mostraron como HYAL o 4-MU en relación con CC (tumosferas sin tratar). La Tabla 15 muestra un resumen de los resultados obtenidos para las tres líneas celulares tenidas en cuenta en el estudio.

Línea celular	Procedencia	Perfil de marcadores			CD44	HAS2	HYAL1	BRCA1	BRCA2
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamario humano	RE- RP- HER2-	Exp1	HYAL	↑	↓	↓	↓	↑
				4-MU	↓	↓↓	↓↓	N.D.	↑
			Exp2	HYAL	↓	↓	↓	↓	↓
				4-MU	↓	↓↓	↓	↑	↑
			Exp3	HYAL	↓	↓	↑↑	↑	↑
				4-MU	↓	↓	↓	↑	↑
MCF-7	Adenocarcinoma mamario humano	RE+ RP+ HER2-	Exp1	HYAL	↑	↑	↓	↑	↑
				4-MU	↓	N.D.	↓	↓	↓
			Exp2	HYAL	↓	↓	↑	↓	↓
				4-MU	↓	↓	↓	↓	↓
			Exp3	HYAL	↑	↑	↓	↓	↑
				4-MU	↓	↓	↓	↓	↓
Caco-2	Adenocarcinoma colorrectal	-	Exp1	HYAL	↑	↓	↑	↓	↓
				4-MU	↑	↓	↓	↑	↑
			Exp2	HYAL	↓	↓	↓	↓	↓
				4-MU	↓	↑	↓	↓	↓
			Exp3	HYAL	↓	↑	↑	↓	↓
				4-MU	↓↓	↑	↓	↑	↑

Tabla 15. Resumen de los resultados para las tres líneas celulares. Nota: Las flechas indican un aumento ↑ o una disminución ↓ del valor medido en el tratamiento con HYAL o 4-MU en comparación con el control sin tratamiento. Los valores inferiores o superiores a 10 veces se indican con una flecha, entre 10 y 100 veces con dos flechas y los valores inferiores o superiores a 100 veces con tres flechas. N.D. indica valores que no se pudieron detectar.

En la línea celular MDA-MB-231, aumentó la expresión del ARNm de *BRCA1* Y *BRCA2* al tratar las tumosferas con 4-MU. Sin embargo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa.

Los niveles de ARNm de *HAS2* fueron consistentemente más bajos al tratar las tumorosferas con 4-MU con respecto a las tumorosferas sin tratar ($p=0,0124$). Por otro lado, *CD44* e *HYAL1* disminuyeron con el tratamiento con 4-MU en los 3 experimentos, pero no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control y el tratamiento con HYAL (Figura 42). Esto indicaría que el tratamiento con 4-MU en las tumorosferas de MDA-MB-231 restablece la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* y provoca la inhibición de la síntesis de AH mediante la disminución de la expresión de *HAS2*. En cuanto al tratamiento con HYAL, en dos de los tres experimentos realizados disminuyó el ARNm de *CD44*, *HYAL1* y *BRCA1* en comparación con las tumorosferas sin tratar. Además, en dos de los tres ensayos aumentó el ARNm de *BRCA2*, y en los tres disminuyó el ARNm de *HAS2* (Tabla 15).

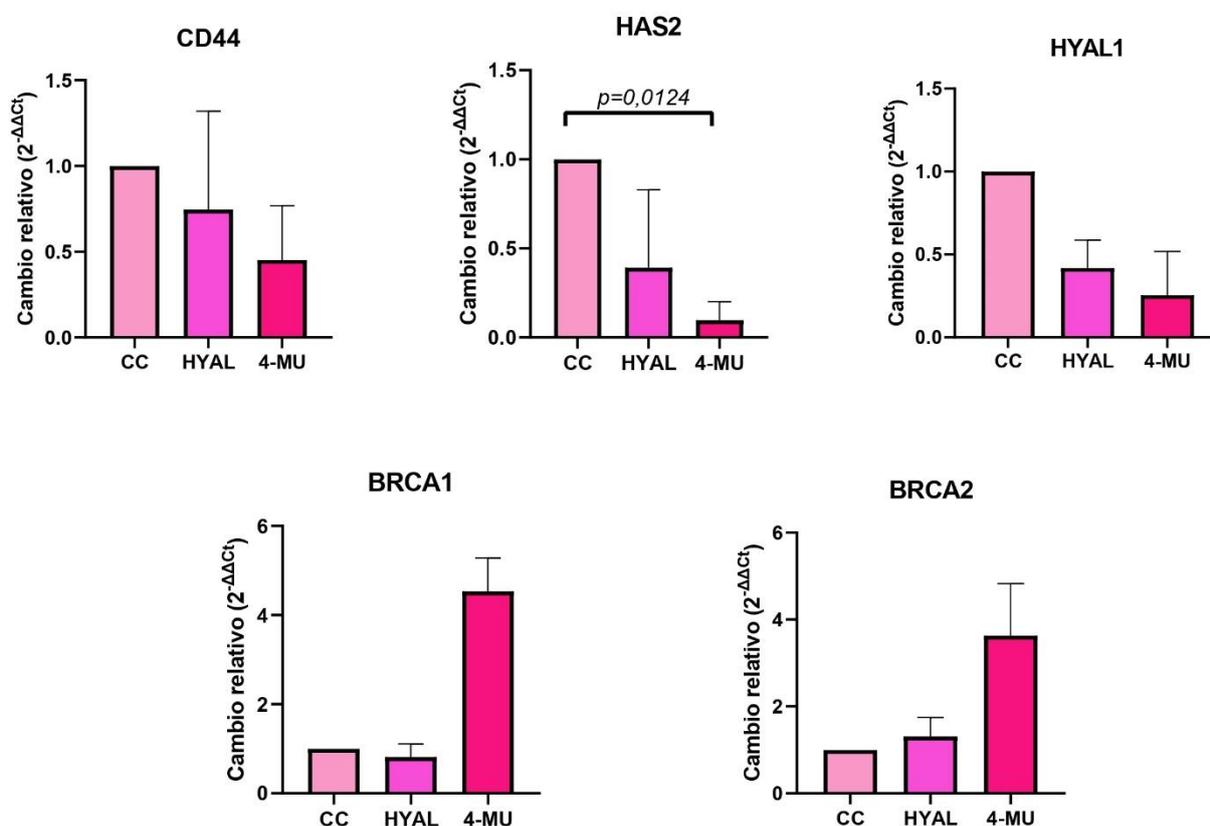


Figura 42. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células MDA-MB-231. Se cultivaron las células MDA-MB-231 durante 11 días y luego se realizó extracción de ARNm y RT-qPCR para la detección de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2*. Los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena *GAPDH* y se expresan como HYAL o 4-MU en relación con CC (control células, sin tratamiento). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Al evaluar los niveles de ARNm en la línea celular MCF-7, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (Figura 43). Sin embargo, al tratar las tumorosferas con 4-MU disminuyó la expresión de todos los genes analizados en comparación con el control en los tres experimentos realizados. Por otro lado, al tratar las tumorosferas con HYAL *BRCA2*, *CD44* y *HAS2* aumentaron en dos experimentos, mientras que en uno disminuyeron. Sin embargo, *BRCA1* disminuyó en dos experimentos y aumentó en sólo uno de ellos (Tabla 15).

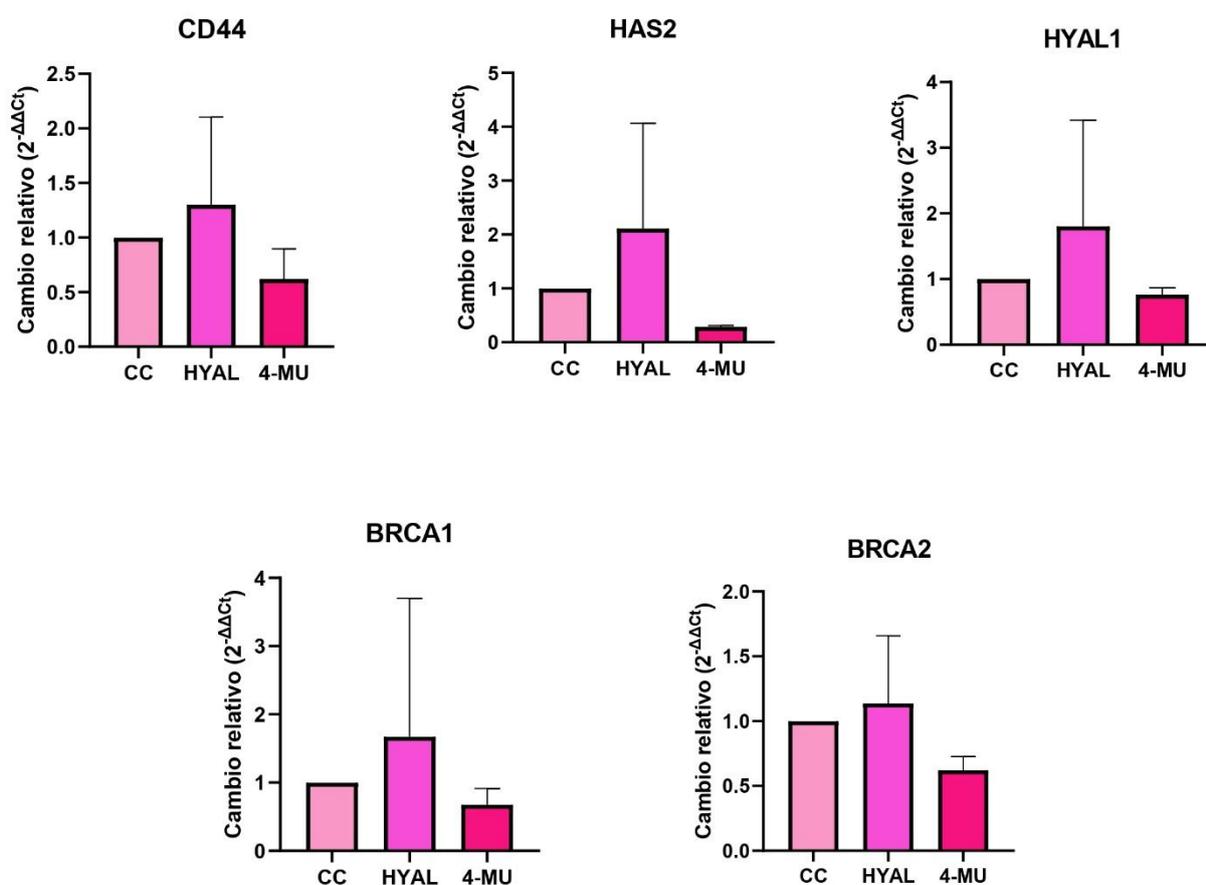


Figura 43. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células MCF-7. Se cultivaron las células MCF-7 durante 8 días y luego se realizó extracción de ARNm y RT-qPCR para la detección de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2*. Los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena *Beta-2 microglobulina* y se expresan como HYAL o 4-MU en relación con CC (control células, sin tratamiento). Los valores de *p* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Los niveles de ARNm de los genes analizados en la línea celular Caco-2 no variaron significativamente con los tratamientos (Figura 44). Sin embargo, en los tres experimentos

realizados, al tratar las tumorosferas con 4-MU, disminuyó *HYAL1* con respecto al control sin tratamiento. Además, en este tratamiento aumentaron los niveles de ARNm de *HAS2*, *BRCA1* y *BRCA2* con respecto al control en dos de los tres experimentos realizados. *CD44* disminuyó en dos de los tres ensayos. Por otro lado, al tratar las tumorosferas con HYAL, disminuyó la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* en comparación con las tumorosferas sin tratar en los tres ensayos. *CD44* y *HAS2* disminuyeron su expresión en dos de los tres experimentos, mientras que en dos de ellos *HYAL1* aumentó (Tabla 15).

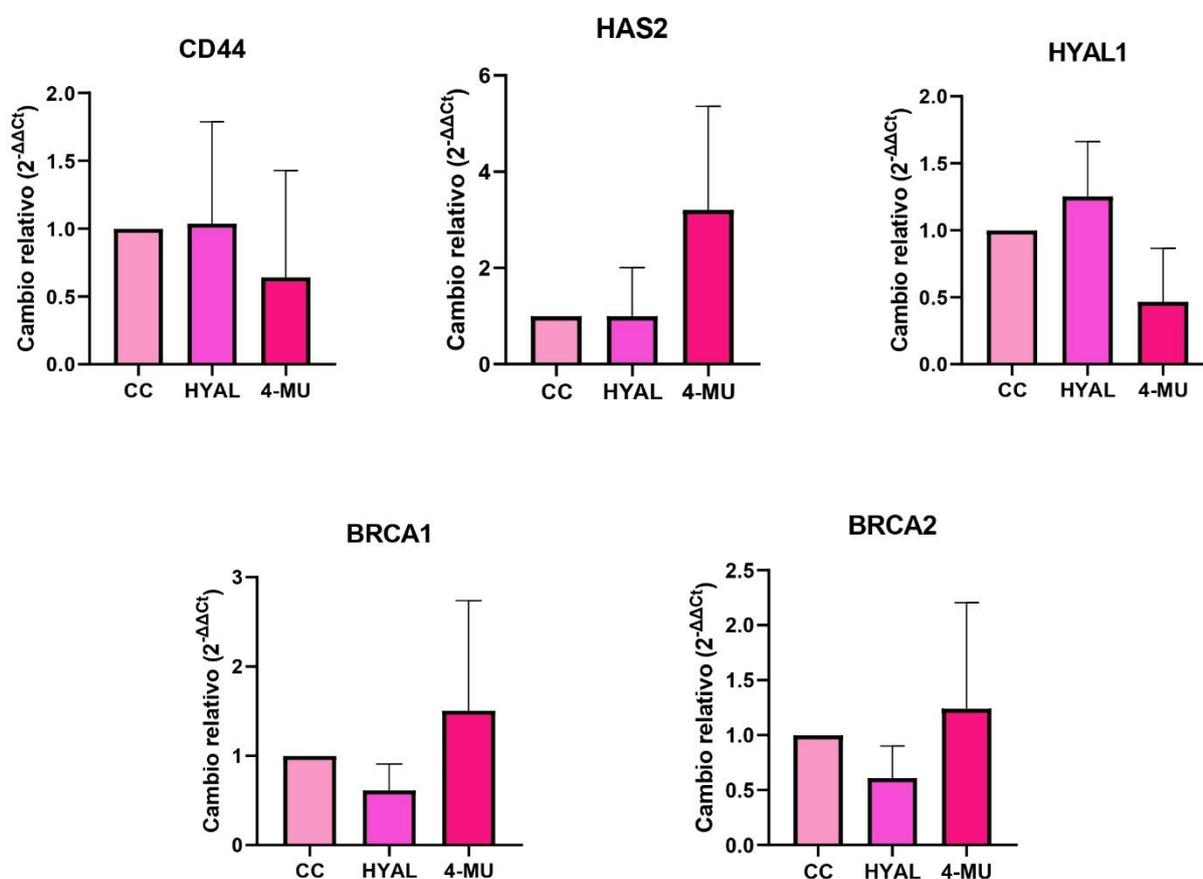
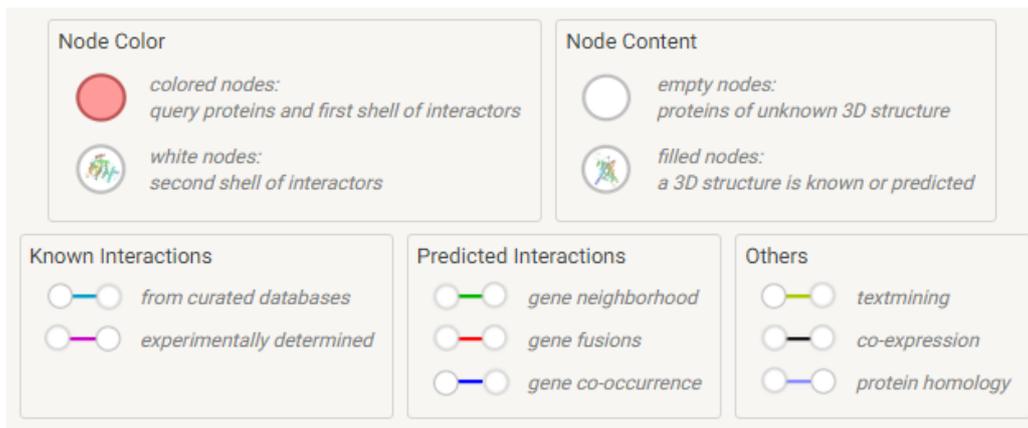
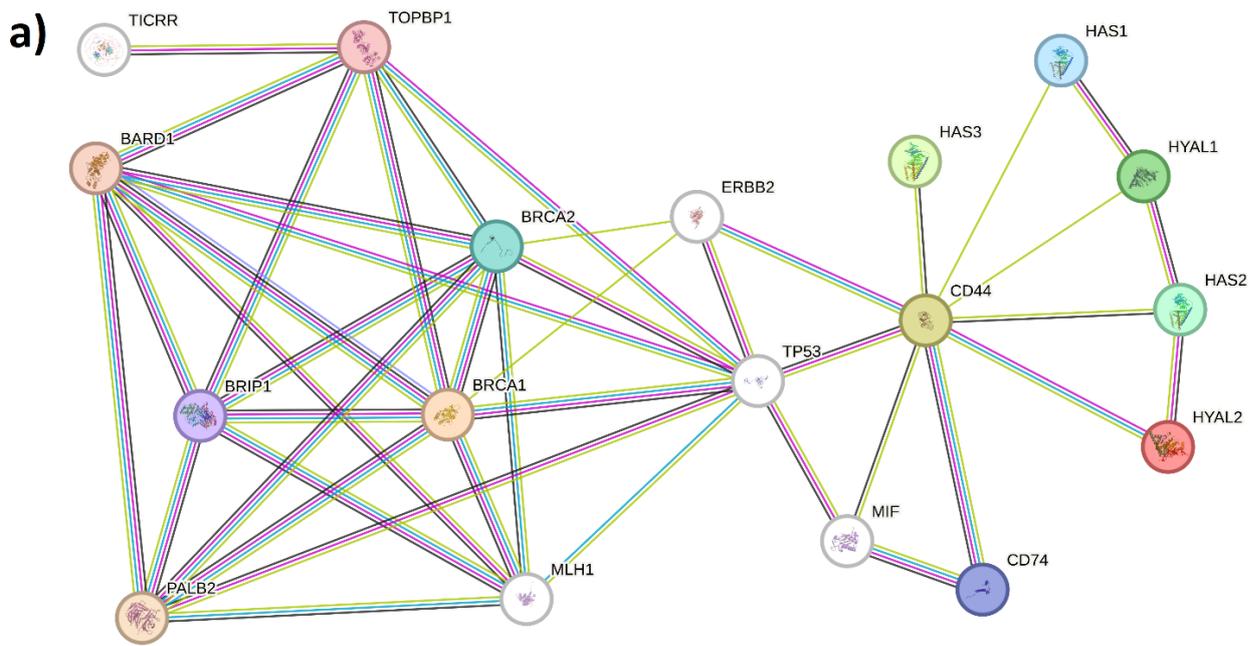


Figura 44. Análisis de los genes implicados en el metabolismo de AH y la reparación del ADN en células Caco-2. Se cultivaron las células Caco-2 durante 8 días y luego se realizó extracción de ARNm y RT-qPCR para la detección de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2*. Los resultados se normalizaron con respecto al control de expresión endógena *B-2M* y se expresan como HYAL o 4-MU en relación con CC (control células, sin tratamiento). Los valores de *p* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

3. ANÁLISIS IN SILICO DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para analizar las posibles interacciones entre proteínas de reparación del ADN y proteínas involucradas en el metabolismo de AH, se utilizó la herramienta bioinformática en línea STRING versión 12.0. Esta herramienta generó redes de interacción *in silico* para las proteínas: BRCA1, BRCA2, CD44, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2, TP53, CD74, MIF, ERBB2, MLH1, PALB2, BRIP1, BARD1, TICRR y TOPBP1. En el análisis realizado, se identificó que la posible conexión entre estos dos grupos de proteínas es a través de TP53 (Figura 45).

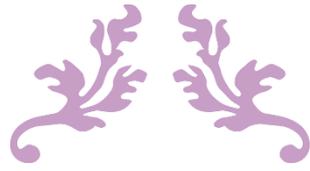


b)

KEGG Pathways	description	count in network	strength	false discovery rate
	Homologous recombination	6 of 38	2.24	5.29e-10
	Glycosaminoglycan degradation	2 of 19	2.06	0.0069
	Fanconi anemia pathway	5 of 51	2.03	2.15e-07
	Platinum drug resistance	4 of 70	1.8	6.02e-05
	Endometrial cancer	3 of 58	1.75	0.0012
	Bladder cancer	2 of 40	1.74	0.0223
	Pancreatic cancer	3 of 71	1.67	0.0019
	Central carbon metabolism in cancer	2 of 68	1.51	0.0474
	Non-small cell lung cancer	2 of 68	1.51	0.0474
	Breast cancer	4 of 146	1.48	0.00076
	MicroRNAs in cancer	4 of 159	1.44	0.00085
	Gastric cancer	3 of 146	1.35	0.0119
	Proteoglycans in cancer	3 of 194	1.23	0.0223
	Pathways in cancer	4 of 515	0.93	0.0303

Figura 45. La compleja red de proteínas involucradas en el metabolismo de AH y la reparación del ADN. a) Salida de la base de datos STRING® que muestra interacciones entre las proteínas BRCA1, BRCA2, CD44, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2, TP53, CD74, MIF, ERBB2, MLH1, PALB2, BRIP1, BARD1, TICRR y TOPBP1. b) Análisis de la vía KEGG.

Como era de esperar, las enzimas encargadas de la síntesis y la degradación del AH (HASs e HYALs) se interrelacionaron entre sí y con CD44, el principal receptor de AH. A su vez, CD44 interacciona con TP53, una importante proteína que repara los daños en el ADN y desempeña un papel importante en la apoptosis y el control del ciclo celular, el cual está interconectado con las proteínas de reparación del ADN BRCA1 y BRCA2. CD44 y TP53 se conectan entre sí mediante MIF y ERBB2, dos proteínas con importancia en el cáncer debido a que la primera se sobreexpresa en los macrófagos del MAT y la segunda es un protooncogén clave para el crecimiento y división normal de las células. Además, existen interacciones con otras proteínas como TOPBP1, BARD1, BRIP1 y PALB2 cuyas funciones son esenciales en la reparación del ADN (Figura 45a). Los sistemas de clasificación KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de la herramienta STRING nos permitió analizar las diferentes vías en las que están implicadas las proteínas analizadas. El análisis KEGG nos permitió identificar vías de recombinación homóloga, degradación de glucosaminoglicanos y cáncer de mama (Figura 45b). Podría explicar que estas proteínas estén directamente vinculadas con la reparación del ADN y con el metabolismo del AH, incluyendo su degradación.



DISCUSIÓN



El cáncer representa una de las enfermedades más complejas y desafiantes a las que nos enfrentamos en la actualidad. Esta complejidad no solo involucra a las células tumorales, sino también al conjunto de células reclutadas hacia el sitio de desarrollo tumoral, que contribuyen a la formación del microambiente tumoral y que expresan de manera desregulada componentes de la MEC, entre los cuales se encuentra el AH. Sin embargo, se ha reportado que no solo el AH, sino también las moléculas asociadas a su metabolismo se encuentran desreguladas en el contexto tumoral (Lokeshwar, 2001; Valkonen, et al., 2018).

En el presente estudio, primero nos propusimos dilucidar si los niveles de expresión de distintos genes involucrados en el metabolismo de AH se encontraban desregulados en el TT con respecto al NAT en pacientes con cáncer de mama o en pacientes con cáncer colorrectal. Para este fin, se analizó el ARNm de *HAS2*, debido a que esta enzima es la principal sintasa de AH identificada en humanos y desempeña un papel central en la promoción de la proliferación, migración e invasión tumoral en diversos tipos de cáncer (Nguyen, et al., 2017; Kim, et al., 2019; Passi, et al., 2019). También evaluamos el ARNm de *HYAL1*, dado que esta hialuronidasa presenta alta actividad enzimática en mamíferos y su sobreexpresión ha sido asociada con varios tipos de tumores (Novak, et al., 1999; Stern, et al., 2006; Tan, et al., 2011). Asimismo, consideramos el ARNm de *CD44*, un importante receptor de AH y un marcador de células madre tumorales (Hassn Mesrati, et al., 2021). A su vez, se analizó el ARNm de dos genes de reparación del ADN, *BRCA1* y *BRCA2*, que se asocian frecuentemente con el cáncer de mama, pero no con el cáncer colorrectal (Phelan, et al., 2014). Sin embargo, actualmente existen reportes que los asocian a otros tipos de cáncer como el cáncer colorrectal (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Phelan, et al., 2014; Fujita M, et al., 2022; Feng, et al., 2023). Por este motivo, se decidió incluir estos marcadores en el presente estudio.

Se ha reportado que modificaciones en los niveles de AH y de genes vinculados a su metabolismo pueden resultar en variaciones en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* y que a su vez modificaciones en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* pueden llevar a cambios en la expresión de AH (Zhou, et al., 2013; Sevic, et al., 2020). Por este motivo, también se tuvieron en cuenta estos genes en el presente estudio. Estos marcadores seleccionados fueron previamente evaluados por Sevic *et al.* (2020), quienes los consideraron los más prometedores para continuar su investigación debido a que observaron una expresión diferencial del ARNm de *HYAL1* en cáncer de mama y, además, en ambos tipos de cáncer obtuvieron una fuerte correlación entre estos marcadores. A su vez, evaluamos los

niveles de AH y de las proteínas BRCA1, BRCA2 y CD44 mediante inmunofluorescencia para corroborar si los niveles de ARNm detectados efectivamente se reflejaban a niveles de proteínas.

En cáncer de mama, observamos una disminución consistente en los niveles de ARNm de *HAS2* en el TT con respecto al NAT. En investigaciones previas se ha informado que una mayor degradación de AH, así como la sobreexpresión de *HAS2* por las células tumorales, pueden disminuir la expresión del RE, lo que favorecería el crecimiento tumoral (Chao & Spicer, 2005; Michael, et al., 2011). Los pacientes tenidos en cuenta en el presente estudio son, en su mayoría, RE+. Por lo tanto, resultaría lógico hipotetizar que los niveles de ARNm de *HAS2* serían menores en el TT con respecto al NAT. Sin embargo, los niveles de ARNm de los otros genes analizados mostraron una variabilidad considerable. Esta variación podría atribuirse a la heterogeneidad presente en el grupo de pacientes analizado, por lo que decidimos clasificarlos según los datos clínicos. Al realizar esta clasificación, observamos una disminución de *HYAL1* en TT con respecto a NAT en pacientes con grado de Nottingham 3 y una disminución de *BRCA1* en pacientes con subtipo luminal A. Los pacientes con cáncer de mama que presentan grado de Nottingham 3 presentan células tumorales que crecen rápidamente en patrones desorganizados e irregulares, por lo que está vinculado con una mayor progresión tumoral. La disminución del ARNm de *HYAL1* en el TT de este grupo de pacientes podría indicar, en conjunto con la disminución de *HAS2* mencionada previamente, una desregulación en el metabolismo de AH en estos pacientes. Sin embargo, algunos autores consideran que podrían existir regulaciones en el nivel de la traducción o inactivación de la proteína (Stern, 2003), por lo que los niveles de ARNm podrían no reflejarse en la actividad que presenta la enzima. Por otro lado, la disminución de *BRCA1* observada en pacientes con subtipo luminal A podríamos atribuir al hecho de que estos pacientes, al igual que los que presentan subtipo triple negativo, suelen expresar menores niveles del ARNm de *BRCA1* (Darbeheshti, et al., 2018). Por otro lado, se reportó que los niveles de ARNm y proteínas de CD44 no aumentaron ni disminuyeron consistentemente en el TT con respecto al NAT en el grupo de pacientes analizados. Sin embargo, al analizar a los pacientes en subgrupos según ciertos datos clínicos, observamos la disminución de los niveles de proteínas de CD44 en TT en comparación con NAT en pacientes con cáncer de mama en estadio T1 y en pacientes con subtipo luminal A. Curiosamente, estos pacientes presentan un estadio temprano de la enfermedad, o una forma poco agresiva. Investigaciones previas reportaron que un aumento de CD44 en el TT con respecto al NAT se asocia con una mayor invasión y metástasis del tumor en

cáncer de mama (Liu, et al., 2019) y que la sobre-expresión de CD44 está vinculada con un mayor grado histológico del tumor (Xu, et al., 2016a; Xu, et al., 2016b; McFarlane, et al., 2015; Louhichi, et al., 2018). Además, como era de esperar debido a su función en la reparación del ADN y por ende como supresores tumorales, observamos una disminución de los niveles de proteínas BRCA1 y BRCA2 en el TT con respecto al NAT en pacientes con cáncer de mama. Esto no es consistente con lo observado en los niveles de ARNm, por lo que se podría pensar que existe una regulación post transcripcional que regula la síntesis de las proteínas correspondientes. Por ejemplo, existen miARNs, como miR-146a y miR-146-5p, que son capaces de unirse al ARNm *BRCA1* y *BRCA2* y provocar su represión traduccional o degradación (Tommasi, et al., 2021). La disminución en los niveles de estas proteínas podría indicar fallas en el sistema de reparación de daños del ADN, lo que estaría asociado al TT más que al NAT.

Teniendo en cuenta que muchas veces la variación de marcadores no se da de manera individual, sino en correlación con la expresión de otros, se decidió realizar un análisis de correlación. En cáncer de mama, observamos una fuerte correlación positiva entre los niveles de ARNm de *CD44* e *HYAL1*. Esto indicaría que, a mayor expresión de *CD44*, mayor expresión de *HYAL1*, y viceversa, haciendo referencia a una regulación del metabolismo del AH en su conjunto más que de manera individual. A su vez, las proteínas BRCA1 y BRCA2 mostraron una correlación fuerte en este tipo de cáncer.

Los niveles de AH mostraron gran variación entre los pacientes analizados tanto en cáncer de mama como en cáncer colorrectal. Esto no es consistente con lo que observaron Sevic *et al.* (2020), quienes encontraron una menor expresión de AH en TT con respecto a NAT en ambos tipos de cáncer, exceptuando a un paciente con cáncer de mama en estadio T1 de la enfermedad. No obstante, solo se analizaron diez pacientes con cáncer de mama y siete pacientes con cáncer colorrectal, lo que destaca la necesidad de ampliar el número de pacientes tenidos en cuenta en el estudio para obtener resultados confirmatorios.

Por su parte, en cáncer colorrectal, los niveles de ARNm de los genes analizados no aumentaron ni disminuyeron consistentemente entre el TT y el NAT en el grupo de pacientes analizado. No obstante, *BRCA1* y *BRCA2*, *BRCA1* y *HAS2* y *BRCA2* y *HAS2* mostraron una fuerte correlación positiva, indicando la vinculación entre los genes de reparación del ADN y la sintasa de AH en cáncer colorrectal. Nuestros resultados concuerdan con los de Sevic *et al.* (2020), quienes además

identificaron una fuerte correlación entre el ARNm de *BRCA1* e *HYAL1*. Al analizar los niveles de proteínas, observamos la disminución en los niveles del receptor CD44 en el TT con respecto al NAT. Se ha reportado que la expresión de CD44 se asocia con la progresión del tumor y que aumenta en el TT (Iida, et al., 2014). Sin embargo, esto no se condice con lo reportado en el presente trabajo, lo que podemos atribuir al bajo número de pacientes incluidos en el análisis. Por otro lado, *BRCA1*, pero no *BRCA2* disminuyó significativamente su expresión en el TT en comparación con el NAT en cáncer colorrectal. Sabemos que estas proteínas se asocian comúnmente con el cáncer de mama y no con cáncer colorrectal. Por lo tanto, esta disminución apoya la hipótesis de que *BRCA1* está implicado también en cáncer colorrectal. Se ha observado que los pacientes con cáncer colorrectal que expresan niveles bajos de proteína *BRCA1* en sus tumores presentan una menor probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a 5 años (Du, et al., 2011). A su vez, mediante inmunofluorescencia, pudimos visualizar que, curiosamente, *BRCA1* se expresaba mayoritariamente en las células caliciformes presentes en las glándulas de la mucosa intestinal en NAT. El rol de *BRCA1* podría resultar importante en estas células posiblemente debido a su baja tasa de división celular con respecto al TT, por lo que se requiere estabilidad genómica y un estricto control del ciclo celular. Además, al estar expuestas continuamente a factores ambientales, estas células podrían necesitar un sistema eficiente de respuesta a daños en el ADN. Sin embargo, *BRCA2* no exhibió el mismo patrón de expresión, lo que sugiere que podría no desempeñar una función semejante en este tipo celular.

Para comprender mejor el papel del AH y su interacción con otros genes en el contexto del cáncer de mama y colon, y para evaluar si el patrón de expresión de los genes de reparación del ADN y los genes vinculados al metabolismo de AH en pacientes se mantiene en líneas celulares de cáncer de mama o colorrectal, se cultivaron células MDA-MB-231, MCF-7 y Caco-2 utilizando la técnica gota colgante. Este ensayo permite, a través del crecimiento de esferas 3D, investigar el rol de las interacciones entre las células tumorales y la MEC (Foty, 2011). 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* (Costa, et al., 2016). Para analizar la influencia del AH, decidimos producir su degradación mediante el tratamiento con HYAL o inhibir su síntesis mediante 4-MU.

Al analizar los niveles de ARNm en la línea celular MDA-MB-231 observamos un incremento en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* al tratar las tumorosferas con 4-MU con respecto a las células sin

tratamiento. Sin embargo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que la inhibición de la síntesis de AH podría restaurar la reparación del ADN mediante *BRCA1* y *BRCA2* en esta línea celular, aunque deberíamos realizar una mayor cantidad de experimentos con estas mismas condiciones para obtener resultados confirmatorios. Las células MDA-MB-231 son RE- RP- y HER2- (triple negativo) y, aunque no es tan frecuente en la población, representa el subtipo de cáncer más agresivo, con altas tasas de recurrencia, mal pronóstico, resistencia a los medicamentos y pocos métodos de tratamiento (Turk & Wisinski, 2018). Debido a la falta de RE y RP la terapia endocrina es ineficaz. Además, la carencia de expresión de HER2 hace que este tipo de cáncer no sea sensible a la terapia dirigida (Yuan, et al., 2017). Por lo tanto, resulta de suma importancia su estudio. Se ha reportado que, en esta línea celular, *HAS2* está regulado positivamente, lo que conduce a una acumulación anormal de AH que favorece la diseminación de los tumores (Vigetti, et al., 2014b; Kolliopoulos, et al., 2019; Tong, et al., 2019; Caon, et al., 2020). En el presente estudio, observamos una disminución en los niveles de ARNm de *HAS2* al tratar estas células con 4-MU con respecto a las células sin tratamiento, lo que resulta lógico debido a que 4-MU inhibe la síntesis del AH mediante la reducción de la disponibilidad de UDP-GlcUA para formar glucurónido de 4-MU (Manou, et al., 2019), y *HAS2* es una enzima cuya actividad depende principalmente de la disponibilidad de azúcares UDP (Ni, et al., 2014). Por otro lado, observamos una disminución de los niveles de ARNm de *CD44* e *HYAL1* con el tratamiento con 4-MU, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control y el tratamiento con HYAL. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Udabage *et al.* (2005), quienes observaron que, al silenciar la expresión del gen *HAS2* en las células MDA-MB-231, disminuye la expresión de *HYAL2* y *CD44*, además de inhibir la tumorigénesis y la progresión del cáncer de mama (Hanoux, et al., 2018). Esto podría indicar que 4-MU revierte la acumulación anormal de AH por parte de las células MDA-MB-231, lo que a su vez influye en la expresión de los genes vinculados al metabolismo de AH y en los genes de reparación del ADN. Estos resultados respaldan la hipótesis de que variaciones en los niveles de AH y de genes vinculados a su metabolismo pueden resultar en variaciones en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2*. Al tratar las tumorosferas con HYAL, es decir, al producir la degradación del AH ya sintetizado, se producen fragmentos de distinto PM, generando una MEC compleja que no modifica la expresión de los genes evaluados con respecto a las células sin tratar en las condiciones experimentales utilizadas.

Al evaluar el volumen y área de las tumorosferas generadas con la línea celular MDA-MB-231, observamos una disminución significativa de ambos parámetros al tratar las células con 4-MU con respecto al tratamiento con HYAL, y a las células sin tratar tras 11 días de cultivo. Estas tumorosferas exhibieron una morfología más compacta, sugiriendo que la disminución de los niveles de AH en la MEC contribuye a una menor retención de agua, volviéndolas menos laxas. Se ha documentado que 4-MU reduce la propagación y el crecimiento de las células tumorales (Smith & Dowsett, 2003; Karamanos, et al., 2018; Dillekas, et al., 2019; Kolliopoulos, et al., 2019), lo que podría explicar la reducción en el volumen y área observados. En contraste, las tumorosferas tratadas con HYAL exhibieron un mayor volumen y área en el tercer día en comparación con aquellas tratadas con 4-MU y las no tratadas. Además, estas tumorosferas mostraron una estructura menos compacta con espacios más evidentes en su interior. Se ha reportado que los fragmentos de AH resultantes del catabolismo de AH de APM promueven fuertemente la metástasis, migración celular e invasión en distintos tipos de cánceres (Stern, et al., 2006; Iijima, et al., 2011), por lo que se sugiere que la falta de compactación en las tumorosferas se podría atribuir al hecho de que están inmersas en una MEC desregulada, la cual puede influir en la adhesión intercelular. Sin embargo, sería necesario investigar más a fondo estos mecanismos para comprender estos eventos a nivel molecular.

La línea celular MCF-7 es RE+ RP+ HER2- (luminal A) y representa el subtipo de cáncer más común en la población, lo que resalta la importancia de tenerla en cuenta en el presente estudio. Al analizar los niveles de ARNm de *CD44*, *HAS2*, *HYAL1*, *BRCA1* y *BRCA2* en células MCF-7, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con 4-MU o HYAL y las células sin tratar. Sin embargo, observamos una tendencial disminución de todos los genes analizados con el tratamiento con 4-MU con respecto a las células sin tratamiento. En células tumorales ER+ como MCF-7, la expresión de HAS y la producción de AH es baja (Vigetti, et al., 2014b). Por lo tanto, al inhibir la producción de AH, que es inicialmente baja, es esperable que no se observen variaciones significativas en la expresión de los genes analizados. Se ha reportado, mediante el cultivo de células MCF-7 en presencia de HYAL, que el aumento en la degradación del AH podría estar implicado en la progresión del cáncer de mama y en la resistencia a la terapia hormonal (Hanoux, et al., 2018). Por otro lado, al evaluar el volumen y área de las tumorosferas generadas con esta línea celular, observamos que disminuye el volumen de las mismas al día 5 al tratarlas con 4-MU con respecto al tratamiento con HYAL, lo cual podría deberse a una disminución en la acumulación de agua en la

MEC a causa de una menor cantidad de AH, tal como se mencionó previamente, y a la generación de fragmentos de AH de BPM al tratar las tumorosferas con HYAL, desencadenando cambios en la adhesión entre las células y, en consecuencia, aumentando el volumen de las tumorosferas. Sin embargo, este efecto no se mantiene al día 8, donde no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Como en estas células la síntesis de AH es escasa, resultaría esperable que la inhibición de la misma no genere diferencias estadísticamente significativas.

Se utilizaron células Caco-2 porque, como células de adenocarcinoma humano, son un modelo celular estándar para el cáncer colorrectal. Al analizar los niveles de ARNm, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en los tres experimentos realizados obtuvimos una disminución del ARNm de *HYAL1* al tratar las células con 4-MU con respecto a las células no tratadas. Esto podría indicar que la inhibición de la síntesis de AH también disminuye su degradación por parte de HYAL1, aunque deberíamos analizar los niveles de la proteína y la actividad enzimática correspondiente para obtener conclusiones más sólidas. Por otro lado, al tratar las tumorosferas con HYAL, obtuvimos una disminución de la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* en comparación con las tumorosferas sin tratar. Esto podría estar asociado con la remodelación del MAT por parte de HYAL, generando AH de BPM, el cual influye sobre la expresión de estos genes de reparación del ADN. Como se mencionó previamente, en cáncer colorrectal, la disminución de la expresión del ARNm de *BRCA1* se asocia con una menor supervivencia de los pacientes y con la enfermedad en estadios avanzados (Leaf, et al., 2021; Lou, 2022). Por lo tanto, se podría sugerir que, en este tipo de cáncer, la degradación del AH en la MEC provocaría una disminución de la síntesis del ARNm de *BRCA1* y *BRCA2*, asociado a su vez con un peor pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, al analizar el volumen y el área de las tumorosferas generadas con esta línea celular, solo observamos diferencias estadísticamente significativas en el día 8 de cultivo al tratar las células con 4-MU con respecto a las células sin tratar y al tratamiento con HYAL.

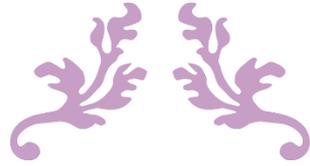
Para explorar las interacciones entre las proteínas implicadas en la reparación del ADN y las involucradas en el metabolismo del AH empleamos la herramienta bioinformática STRING. Se generaron redes de interacción de proteínas *in silico* para: *BRCA1*, *BRCA2*, *CD44*, *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TP53*, *CD74*, *MIF*, *ERBB2*, *MLH1*, *PALB2*, *BRIP1*, *BARD1*, *TICRR* y *TOPBP1*. En el análisis realizado identificamos una conexión potencial entre los dos conjuntos de proteínas a través de

CD44 y la proteína TP53. TP53 es un factor de transcripción que cumple una función clave en el control del ciclo celular y la apoptosis. Al ser un supresor tumoral, sus mutaciones están asociadas con la tumorigénesis y fenotipos de cáncer agresivos (Zhu, 2005). *TP53* es el gen mutado con mayor frecuencia en el cáncer de mama (Shahbandi, et al., 2020) y se ha asociado con el cáncer colorrectal, aunque no se considera un marcador de pronóstico útil ya que los datos actuales son insuficientes para su validación (Lv, et al., 2016). Estudios previos indicaron que el AH de muy APM podría activar a CD44, lo que llevaría a la atenuación parcial de p53 (Takasugi, 2020), lo que a su vez se vincula con la regulación de la detención del ciclo celular y la muerte celular. Por lo tanto, proponemos a futuro el estudio de la interacción de TP53 con los genes vinculados al metabolismo del AH como vía prometedora para avanzar en la comprensión y tratamiento del cáncer.

Tal como esperábamos, observamos interconexiones entre las enzimas responsables de la síntesis y degradación del AH (HASs e HYALs), así como con CD44, el principal receptor de AH. A su vez, CD44 interacciona con TP53, tal como fue indicado por Takasugi *et al.* (2020), el cual está interconectado, a su vez, con las proteínas de reparación del ADN BRCA1 y BRCA2. Además, CD44 y TP53 están vinculados a través de ERBB2 y MIF, dos proteínas de relevancia en el cáncer. MIF (Factor Inhibidor de Macrófagos) es una citoquina proinflamatoria que se encuentra sobreexpresada en los macrófagos del estroma en el cáncer, promoviendo interacciones entre los macrófagos y las células tumorales. Se ha reportado que CD44 actúa como correceptor de señalización de MIF, que interactúa con CD74 en la superficie celular (Yoo, et al., 2016), tal como se observó en nuestro análisis mediante STRING. MIF es capaz de aumentar la expresión de CD44, promover su reclutamiento y estimular la expresión de isoformas asociadas con la invasión oncogénica (Leng, et al., 2003; Ponta, et al., 2003; Shi, et al., 2006). Por otro lado, ERBB2, también conocido como HER2/neu (receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2) es un protooncogén clave para el crecimiento y división normal de las células. Se ha convertido en un importante marcador y diana en el tratamiento oncogénico, especialmente en cáncer de mama. CD44 es un correceptor de ERBB2 y activa la señalización Rac1 y Ras necesaria para la progresión del tumor de ovario humano (Ma, et al., 2018). La sobreexpresión de ERBB2 promueve la progresión tumoral mediante la activación de las vías de señalización RTK y Ras-Raf-Mek1/2-ERK1/2 (Ma, et al., 2018). CD44 se combina con ERBB2 para mediar en la reparación del daño del ADN (Ma, et al., 2018). Por lo que también lo consideramos un link importante entre la reparación del ADN y el metabolismo del AH.

Además, obtuvimos interacciones con otras proteínas como MLH1, TOPBP1, BARD1, BRIP1, PALB2 cuyas funciones son esenciales en la reparación del ADN, por lo cual mutaciones en estos genes aumentan el riesgo de desarrollar cáncer. MLH1 (MutL Homology 1) se encuentra mutado en el síndrome de Lynch, una condición hereditaria que incrementa la predisposición al cáncer de colon, cáncer de recto y otros tumores malignos. Por otro lado, la sobreexpresión TOPBP1 (proteína 1 de unión a la topoisomerasa 2) desregula la función de p53 inhibiendo la apoptosis y deteniendo el ciclo celular (Liu, et al., 2009). Los tumores que sobreexpresan TOPBP1 muestran características agresivas como carcinomas de mama de alto grado, sarcomas avanzados y metástasis pulmonar (Liu, et al., 2009; Wu, et al., 2017). En cuanto a BARD1, su función es crucial para la estabilidad de BRCA1. Por ende, las mutaciones en el gen *BARD1* se vinculan con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Thompson, et al., 2016; Couch, et al., 2017; Kurian, et al., 2017; Slavin, et al., 2017; Weber-Lassalle, et al., 2019), cáncer de ovario (Norquist, et al., 2016; Kurian, et al., 2017; Lilyquist, et al., 2017) y cáncer colorrectal (Aldubayan, et al., 2018b). BRIP1, por su parte, es una proteína que interactúa con BRCA1 y forma un complejo esencial para la reparación de roturas de doble hebra. Mutaciones en BRIP1 se asocian con el desarrollo de cáncer de mama (Rafnar, et al., 2011; Couch, et al., 2017; Kurian, et al., 2017), cáncer colorrectal (Aldubayan, et al., 2018b), cáncer de ovario (Rafnar, et al., 2011; Easton, et al., 2016; Norquist, et al., 2016; Kurian, et al., 2017; Lilyquist, et al., 2017), cáncer de páncreas (Rafnar, et al., 2011; Hu, et al., 2018b) y cáncer de próstata (Momozawa, et al., 2020). Por último, PALB2 es una proteína nuclear que colocaliza con BRCA1 y BRCA2, y actúa como puente funcional entre las dos proteínas. Mutaciones en PALB2 se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama (Antoniou, et al., 2014; Thompson, et al., 2016; Couch, et al., 2017; Kurian, et al., 2017; Yang, et al., 2020), cáncer colorrectal (Aldubayan, et al., 2018b; Yang, et al., 2020), cáncer de ovario (Norquist, et al., 2016; Kurian, et al., 2017; Lilyquist, et al., 2017; Yang, et al., 2020), cáncer de páncreas (Hu, et al., 2018a; Hu, et al., 2018b; Yang, et al., 2020) y cáncer de próstata (Momozawa, et al., 2020; Yang, et al., 2020).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos por STRING, consideramos que el presente estudio proporciona información valiosa acerca de las complejas interacciones entre las proteínas asociadas a la reparación del ADN y el metabolismo del AH y establece una base para investigaciones futuras. Destacamos la relevancia de comprender estas complejas redes moleculares para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas contra el cáncer.



CONCLUSIÓN



El presente trabajo aporta nueva y consistente evidencia que respalda la idea de que las alteraciones en el metabolismo del GAG AH en el microambiente del cáncer de mama o colorrectal, son capaces de modular la expresión de genes implicados en la reparación del ADN. En particular, demostramos que estos genes pueden variar individualmente o de manera conjunta. Además, respaldamos otras investigaciones al señalar que los genes BRCA no solo están asociados al cáncer de mama, sino también al cáncer colorrectal.

Por otro lado, destacamos que la inhibición de la síntesis de AH con 4-MU disminuye el tamaño de las tumorosferas generadas a partir de una línea celular de cáncer de mama triple negativo, al tiempo que restablece la expresión de genes de reparación del ADN, lo que podría ser de suma importancia para estos pacientes, principalmente debido a la agresión de la enfermedad y a la dificultad del tratamiento. Por otro lado, también observamos que la degradación del AH (mediante HYAL) genera un aumento del tamaño de las tumorosferas, lo que podría deberse a la generación de fragmentos de AH de BPM.

Los genes y proteínas analizadas interactúan entre sí creando un círculo de retroalimentación complejo, ofreciendo una perspectiva interesante para comprender los mecanismos subyacentes al cáncer.

Esta evidencia en conjunto con diversos antecedentes, son cruciales para la identificación de marcadores clave para predecir el desarrollo de la enfermedad y orientar posibles enfoques terapéuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1743. doi:<https://doi.org/10.3390/cells9071743>
- Ahmad, F., Merwin, M., Jaffri, A., & Krajicek, B. (2023, Jan 26). Association of Non-traditional Indicators of Readers' Engagement With Traditional Dissemination Metrics of COVID-19-Related Research. *Cureus*, 15(1), e34238. doi:10.7759/cureus.34238
- Alaniz, L., García, M., Gallo-Rodriguez, C., Agusti, R., Sterín-Speziale, N., Hajos, S., & Alvarez, E. (2006, May). Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor. *Glycobiology*, 16(5), 359-367. doi:10.1093/glycob/cwj085
- Alaniz, L., Garcia, M., Rizzo, M., Piccioni, F., & Mazzolini, G. (2009, Nov 1). Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective. *Mini Rev Med Chem*, 9(13), 1538-1546. doi:10.2174/138955709790361485
- AlDubayan, S., Giannakis, M., Moore, N., Han, G. R., Hamada, T., Mu, X. N., . . . al., e. (2018, Mar 1). Defects in Colorectal Cancer. *Am J Hum Genet*, 102(3), 401-414. doi:10.1016/j.ajhg.2018.01.018
- AlDubayan, S., Giannakis, M., Moore, N., Han, G., Reardon, B., Hamada, T., . . . al., e. (2018, Mar 1). Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *Am J Hum Genet*, 102(3), 401-414. doi:10.1016/j.ajhg.2018.01.018
- Amer Ali, E., Nori, W., Salman, A., Al-Rawi, T., Hameed, B., & Al-Ani, R. (2023, Jun 16). Elabela is a reliable biomarker for predicting early onset preeclampsia: A comparative study. *World J Clin Cases*, 11(17), 3993-4002. doi:10.12998/wjcc.v11.i17.3993
- Amin, M., Edge, S., Greene, F., Compton, C., Gershenwald, J., Brookland, R., . . . Winchester, D. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93-99. doi:10.3322/caac.21388
- Anand, V., Khandelwal, M., Appunni, S., Gupta, N., Seth, A., Singh, P., . . . Sharma, A. (2019, Nov). CD44 splice variant (CD44v3) promotes progression of urothelial carcinoma of bladder through Akt/ERK/STAT3 pathways: novel therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(11), 2649-2661. doi:10.1007/s00432-019-03024-9
- Andreuzzi, E., Capuano, A., Poletto, E., Pivetta, E., Fejza, A., Favero, A., . . . Mongiat, M. (2020). Role of Extracellular Matrix in Gastrointestinal Cancer-Associated Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(10), 3686. doi:10.3390/ijms21103686
- Antoniou, A., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., . . . al., e. (2014, Aug 7). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*, 371(6), 497-506. doi:10.1056/NEJMoa1400382

- Antoniou, A., Pharoah, P., Narod, S., Risch, H., Eyfjord, J., Hopper, J., . . . Easton, D. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.*, *72*(5), 1117-1130. doi:10.1086/375033
- Anttila, M., Tammi, R., Tammi, M., Syrjänen, K., Saarikoski, S., & Kosma, V. (2000). High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, *60*, 150–155.
- Auvinen, P., Tammi, R., Parkkinen, J., Tammi, M., Agren, U., Johansson, R., . . . Kosma, V. (2000). Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol*, *156*, 529–536.
- Bernert, B., Porsch, H., & Heldin, P. (2011, Dec 9). Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1). *J Biol Chem*, *286*(49), 42349-42359. doi:10.1074/jbc.M111.278598
- Bissell, M., Radisky, D., Rizki, A., Weaver, V., & Petersen, O. (2002, Dec). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, *70*(9-10), 537-546. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x
- Bizzarri, M. (2014). Tumor and the Microenvironment: A Chance to Reframe the Paradigm of Carcinogenesis? *The Tumor Microenvironment and Cancer*. doi:10.1155/2014/934038
- Bock-Hennig, B., Kohle, C., Nill, K., & Bock, K. (2002, Jan 15). Influence of t-butylhydroquinone and beta-naphthoflavone on formation and transport of 4-methylumbelliferone glucuronide in Caco-2/TC-7 cell monolayers. *Biochem Pharmacol*, *63*(2), 123-128. doi:10.1016/s0006-2952(01)00833-4
- Bollyky, P., Falk, B., Long, S., Preisinger, A., Braun, K., Wu, R., . . . Nepom, G. (2009, Aug 15). CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol*, *183*(4), 2232-2241. doi:10.4049/jimmunol.0900191
- Bollyky, P., Falk, B., Wu, R., Buckner, J., Wight, T., & Nepom, G. (2009, Sep). Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.*, *86*(3), 567-572. doi:10.1189/jlb.0109001
- Boregowda, R., Appaiah, H., Siddaiah, M., Kumarswamy, S., Sunila, S., Thimmaiah, K., . . . Banerjee, S. (2006, Jan 10). Expression of hyaluronan in human tumor progression. *J Carcinog*, *5*, 2. doi:10.1186/1477-3163-5-2
- Borland, G., Ross, J., & Guy, K. (1998, Feb). Forms and functions of CD44. *Immunology*, *93*(2), 139-148. doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00431.x.
- Breast Cancer Linkage Consortium. (1999, Aug). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, *91*(15), 1310-1316. doi:10.1093/jnci/91.15.1310
- Bruno, A., Pagani, A., Pulze, L., Albini, A., Dallaglio, K., Noonan, D., & Mortara, L. (2014). Orchestration of Angiogenesis by Immune Cells. *Frontiers in Oncology*, *4*. doi:10.3389/fonc.2014.00131

- Calderón-Garcidueñas, A., Martínez-Reyes, G., Gallardo-Gómez, A., Rojas-Martínez, A., & Cerda-Flores, R. (2012). Triple Marker Immunohistochemistry Analysis in Breast Cancer Mexican Patients. *Patol Rev Latinoam.*, 50(2), 72-79. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=34871>
- Caon, I., Bartolini, B., Moretto, P., Parnigoni, A., Caravà, E., Vitale, D., . . . Vigetti, D. (2020, Mar 13). Sirtuin 1 reduces hyaluronan synthase 2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF-κB and expression of the long-noncoding RNA HAS2-AS1. *J Biol Chem*, 295(11), 3485-3496. doi:10.1074/jbc.RA119.011982
- Chao, H., & Spicer, A. (2005, Jul 29). Natural antisense mRNAs to hyaluronan synthase 2 inhibit hyaluronan biosynthesis and cell proliferation. *J Biol Chem*, 280(30), 27513-22. doi:10.1074/jbc.M411544200
- Chen, S., Iversen, E., Friebel, T., Finkelstein, D., Weber, B., Eisen, A., . . . Parmigiani, G. (2006, Feb). Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol*, 24(6), 863-871. doi:10.1200/JCO.2005.03.6772
- Chen, W., & Abatangelo, G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 7(2), 79-89. doi:10.1046/j.1524-475x.1999.00079.x
- Closset, L., Gultekin, O., Salehi, S., Sarhan, D., Lehti, K., & Gonzalez-Molina, J. (2023, Aug). The extracellular matrix - immune microenvironment crosstalk in cancer therapy: Challenges and opportunities. *Matrix Biol.*, 121, 217-228. doi:10.1016/j.matbio.2023.07.003
- Costa, E., Moreira, A., De Melo-Diogo, D., Gaspar, V., Carvalho, M., & Correia, I. (2016, Dec). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*, 34(8), 1427-1441. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
- Couch, F., Shimelis, H., Hu, C., Hart, S., Polley, E., Na, J., . . . al., e. (2017, Sep 1). Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol*, 3(9), 1190-1196. doi:10.1001/jamaoncol.2017.0424
- Darbeheshti, F., Izadi, P., Emami Razavi, A., Yekaninejad, M., & Tavakkoly Bazzaz, J. (2018, May 1). Comparison of BRCA1 Expression between Triple-Negative and Luminal Breast Tumors. *Iran Biomed J*, 22(3), 210-4. doi:10.22034/ibj.22.3.210
- Davis, G., & Senger, D. (2005). Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis. *Vascular Cell Diversity*. doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
- Delpech, B., Chevallier, B., Reinhardt, N., Julien, J., Duval, C., Maingonnat, C., . . . Asselain, B. (1990, Sep 15). Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. *Int J Cancer*, 46(3), 388-390. doi:10.1002/ijc.2910460309
- Dicker, K., Gurski, L., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R., Farach-Carson, M., & Jia, X. (2014, Apr). Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*, 10(4), 1558-1570. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019

- Dillekås, H., Rogers, M., & Straume, O. (2019, Sep). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*, 8(12), 5574-5576. doi:10.1002/cam4.2474
- Du, C., Peng, Y., He, Y., Chen, G., & Chen, H. (2021, Mar). Low levels of BRCA1 protein expression predict a worse prognosis in stage I-II colon cancer. *Int J Biol Markers*, 36(1), 47-53. doi:10.1177/1724600820986572
- Easton, D., Lesueur, F., Decker, B., Michailidou, K., Li, J., Allen, J., . . . al., e. (2016, May). No evidence that protein truncating variants in BRIP1 are associated with breast cancer risk: implications for gene panel testing. *J Med Genet*, 53(5), 298-309. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103529
- Eberst, L., Brahmi, M., & Cassier, P. (2017, Nov). Nouvelles perspectives dans le ciblage thérapeutique de la réparation de l'ADN [DNA repair as a therapeutic target]. *Bull Cancer*, 104(11), 988-998. doi:10.1016/j.bulcan.2017.09.005
- Elston, C., & Ellis, I. (1991). Factores de pronóstico patológico en cáncer de mama. I. El valor del grado histológico en el cáncer de mama: experiencia de un gran estudio con seguimiento a largo plazo. *Histopathology*, 19(5), 403-410. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Evanko, S., & Wight, T. (1999). Intracellular Localization of Hyaluronan in Proliferating Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(10), 1331-1341. doi:10.1177/002215549904701013
- Fan, F., Schimming, A., Jaeger, D., & Podar, K. (2012). Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol*. doi:10.1155/2012/281261
- Feng, Z., Yang, X., Tian, M., Zeng, N., Bai, Z., Deng, W., . . . Yang, Y. (2023). BRCA genes as candidates for colorectal cancer genetic testing panel: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 23(807). doi:https://doi.org/10.1186/s12885-023-11328-w
- Forrester, J., & Balazs, E. (1980, Jan 31). Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 435.
- Foty, R. (2011, May 6). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*(51), 2720. doi:10.3791/2720
- Fujita M, L. X., Kamatani, Y., Kubo, M., Akagi, K., Matsuda, N., & Momosawa, Y. (2022, Sep). Population-based Screening for Hereditary Colorectal Cancer Variants in Japan. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 20(9), 2132-2141. doi:10.1016/j.cgh.2020.12.007
- Gao, D., Herman, J., & Guo, M. (2016, Jun). The clinical value of aberrant epigenetic changes of DNA damage repair genes in human cancer. *Oncotarget*, 7(24), 37331-37346. doi:10.18632/oncotarget.7949
- George, S., & Shaw, P. (2014, Jan 23). BRCA and Early Events in the Development of Serous Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 4, 5. doi:10.3389/fonc.2014.00005
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

- Hänggi, K., & Ruffell, B. (2023, May). Cell death, therapeutics, and the immune response in cancer. *Trends Cancer*, 9(5), 381-396. doi:10.1016/j.trecan.2023.02.001
- Hanoux, V., Eguida, J., Fleurot, E., Levallet, J., & Bonnamy, P. (2018, Nov 15). Increase in hyaluronic acid degradation decreases the expression of estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 476, 185-197. doi:10.1016/j.mce.2018.05.008
- Harada, H., & Takahashi, M. (2007, Feb). CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *Biol Chem*, 282(8), 5597-5607. doi:10.1074/jbc.M608358200
- Hascall, V. (2019, Feb 1). The journey of hyaluronan research in the Journal of Biological Chemistry. *Journal*, 294(5), 1690-1696. doi:10.1074/jbc.TM118.005836
- Hascall, V., & Laurent, T. (1997). Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum*, 1.
- Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S., Mohtar, M., & Syahir, A. (2021, Dec 9). CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*, 11(12), 1850. doi:10.3390/biom11121850
- Heldin, P., Basu, K., Olofsson, B., Porsch, H., Kozlova, I., & Kahata, K. (2013, Nov). Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem*, 154(5), 395-408. doi:10.1093/jb/mvt085
- Horvath, E. (2021). Subtipos moleculares del cáncer mamario - lo que el radiólogo dedicado a imágenes mamarias debe saber. *Revista chilena de radiología*, 27(1), 17-26. doi:https://dx.doi.org/10.4067/S0717-93082021000100017
- Hu, C., Hart, S., Polley, E., Gnanaolivu, R., Shimelis, H., Lee, K., . . . al., e. (2018, Jun 19). Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA*, 319(23), 2401-2409. doi:10.1001/jama.2018.6228
- Hu, C., LaDuca, H., Shimelis, H., Polley, E., Lilyquist, J., Hart, S., . . . al., e. (2018). Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precis Oncol*, 2. doi:10.1200/PO.17.00291
- Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, y. (2021). Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Sig Transduct Target Ther*, 6(153). doi:10.1038/s41392-021-00544-0
- Iida, J., Clancy, R., Dorchak, J., Somiari, R., Somiari, S., Cutler, M., . . . Shriver, C. (2014, Feb 19). DNA aptamers against exon v10 of CD44 inhibit breast cancer cell migration. *PLoS One*, 9(2), e88712. doi:10.1371/journal.pone.0088712
- Iijima, J., Konno, K., & Itano, N. (2011, Aug 9). Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 3(3), 3189-205. doi:10.3390/cancers3033189
- Instituto Nacional del Cáncer. (2019). Los inhibidores de PARP muestran ser un tratamiento inicial prometedor para el cáncer de ovario. En línea. Recuperado el 07 de Mar de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2019/inhibidores-parp-tratamiento-inicial-cancer-ovario>

- Instituto Nacional del Cáncer. (2020). *Mutaciones en el gen BRCA: el riesgo de cáncer y las pruebas genéticas*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2023). *Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/pro/tratamiento-seno-pdq>
- Instituto Nacional del Cancer. (2024). *Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®)–Versión para profesionales de salud*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/tratamiento-colorrectal-pdq>
- Itano N, S. T., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyachi, S., Spicer, A., McDonald, J., & Kimata, K. (1999, Aug 27). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*, 274(35), 25085-92. doi:10.1074/jbc.274.35.25085
- Itano, N. (2008). Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *J Biochem*, 144(2), 131-137. doi:10.1093/jb/mvn046
- Iwuchukwu, O., Tallarida, R., & Nagar, S. (2011, Jun 6). Resveratrol in combination with other dietary polyphenols concomitantly enhances. *Life Sciences*, 88(23-24), 1047-54. doi:10.1016/j.lfs.2011.03.016
- Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 435-461. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
- Jokela, T., Makkonen, K., Oikari, S., Kärnä, R., Koli, E., Hart, G., . . . Tammi, M. (2011, Sep 23). Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1. *J Biol Chem*, 286(38), 33632-40. doi:10.1074/jbc.M111.265637
- Junker, N., Latini, S., Petersen, L., & Kristjansen, P. (2003). Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol Rep*, 10(3), 609-616.
- Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., . . . Itano, N. (2004, Aug 6). A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem*, 279(32), 33281-9. doi:10.1074/jbc.M405918200
- Karamanos, N., Piperigkou, Z., Theocharis, A., Watanabe, H., Franchi, M., Baud, S., . . . Iozzo, R. (2018, Sep 26). Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem Rev*, 118(18), 9152-9232. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00354
- Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., Shimozato, T., & Kincade, P. (1995, Aug 1). Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J Exp Med*, 182(2), 419-429. doi:10.1084/jem.182.2.419

- Kim, Y., Lee, S., Shim, S., Kim, A., Park, J., Jang, W., . . . Kim, M. (2019, Jul). Hyaluronic acid synthase 2 promotes malignant phenotypes of colorectal cancer cells through transforming growth factor beta signaling. *Cancer Sci*, *110*(7), 2226-2236. doi:10.1111/cas.14070
- Kobayashi, T., Chanmee, T., & Itano, N. (2020). Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*, *10*(11), 1525. doi:https://doi.org/10.3390/biom10111525
- Kolliopoulos, C., Lin, C., Heldin, C., Moustakas, A., & Heldin, P. (2019, Jul). Has2 natural antisense RNA and Hmga2 promote Has2 expression during TGFβ-induced EMT in breast cancer. *Matrix Biol*, *80*, 29-45. doi:10.1016/j.matbio.2018.09.002
- Kurian, A., Hughes, E., Handorf, E., Gutin, A., Allen, B., Hartman, A., & Hall, M. (2017, Nov). Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precis Oncol*, *1*, 1-12. doi:10.1200/PO.16.00066
- Kyndi, M., Sorensen, F., Knudsen, H., Overgaard, M., Nielsen, H., & Overgaard, J. (2008, Mar 20). Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, *26*(9), 1419-1426. doi:10.1200/JCO.2007.14.5565
- Lam, S., Jimenez, C., & Boven, E. (2014, Feb). Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat Rev*, *40*(1), 129-138. doi:10.1016/j.ctrv.2013.06.006
- Leaf, S., Carlsen, L., & El-Deiry, W. (2021, Sep 28). Opposing effects of BRCA1 mRNA expression on patient survival in breast and colorectal cancer and variations among African American, Asian, and younger patients. *Oncotarget*, *12*(20), 1992-2005. doi:10.18632/oncotarget.28082
- Leng, L., Metz, C., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., . . . Bucala, R. (2003, Jun 2). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, *197*(11), 1467-76. doi:10.1084/jem.20030286
- Lilyquist, J., LaDuca, H., Polley, E., Davis, B., Shimelis, H., Hu, C., . . . Goldgar, D. (2017). Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol*, *147*(2), 375-380. doi:10.1016/j.ygyno.2017.08.030
- Liu, K., Bellam, N., Lin, H., Wang, B., Stockard, C., Grizzle, W., & Lin, W. (2009, May). Regulation of p53 by TopBP1: a potential mechanism for p53 inactivation in cancer. *Mol Cell Biol*, *29*(10), 2673-93. doi:10.1128/MCB.01140-08
- Liu, M., Su, H., Huang, H., & Chen, J. (2019, Oct). Cancer stem-like cells with increased expression of NY-ESO-1 initiate breast cancer metastasis. *Oncol Lett*, *18*(4), 3664-3672. doi:10.3892/ol.2019.10699
- Lokeshwar VB, R. D. (2001, Apr 13). Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem*, *276*(15), 11922-32. doi:10.1074/jbc.M008432200

- Lokman, N., Price, Z., Hawkins, E., Macpherson, A., Oehler, M., & Ricciardelli, C. (2019, Aug 15). 4-Methylumbelliferone Inhibits Cancer Stem Cell Activation and Overcomes Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, *11*(8), 1187. doi:10.3390/cancers11081187
- Lou, E. (2022, Jan 14). Redefining and expanding the sphere of influence of BRCA in breast and colorectal cancers and beyond. *Oncotarget*, *13*, 120-121. doi:10.18632/oncotarget.28164
- Louhichi, T., Ziadi, S., Saad, H., Dhiab, M., Mestiri, S., & Trimeche, M. (2018, Nov). Clinicopathological significance of cancer stem cell markers CD44 and ALDH1 expression in breast cancer. *Breast Cancer*, *25*(6), 698-705. doi:10.1007/s12282-018-0875-3
- Lu, P., Weaver, V., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer. *Journal of Cell Biology*, *196*(4), 395–406. doi:10.1083/jcb.201102147
- Lv, H., Zhang, Z., Wang, Y., Li, C., Gong, W., & Wang, X. (2016). MicroRNA-92a Promotes Colorectal Cancer Cell Growth and Migration by Inhibiting KLF4. *Oncol Res.*, *23*(6), 283-90. doi:10.3727/096504016X14562725373833
- Ma, J., Wang, X., Chang, L., Zhong, X., Jing, H., Zhu, X., . . . Xiao, W. (2018, Sep 1). CD44 collaborates with ERBB2 mediate radiation resistance via p38 phosphorylation and DNA homologous recombination pathway in prostate cancer. *Exp Cell Res.*, *370*(1), 58-67. doi:10.1016/j.yexcr.2018.06.006
- Maishi, N., Ohba, Y., Akiyama, K., Ohga, N., Hamada, J., Nagao-Kitamoto, H., . . . Hida, K. (2016, Jun 13). Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep*, *6*, 28039. doi:10.1038/srep28039
- Manou, D., Caon, I., Bouris, P., Triantaphyllidou, I., Giaroni, C., Passi, A., . . . Theocharis, A. (2019). The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues. *Methods Mol Biol*, *1952*, 1-20. doi:10.1007/978-1-4939-9133-4_1
- Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., . . . Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer*, *20*(131). doi:10.1186/s12943-021-01428-1
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. (2017, Jan 19). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(1), 197. doi:10.3390/ijms18010197
- Masellis-Smith, A., Belch, A., Mant, M. T., & Pilarski, L. (1996, Mar 1). Hyaluronan-dependent motility of B cells and leukemic plasma cells in blood, but not of bone marrow plasma cells, in multiple myeloma: alternate use of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) and CD44. *Blood*, *87*(5), 1891-1899.
- McFarlane, S., Coulter, J., Tibbits, P., O'Grady, A., McFarlane, C., Montgomery, N., . . . Waugh, D. (2015, May 10). CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*, *6*(13), 11465-76. doi:10.18632/oncotarget.3410

- McKee, C., Penno, M., Cowman, M., Burdick, M., Strieter, R., Bao, C., & Noble, P. (1996, Nov 15). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, *98*(10), 2403-2413. doi:10.1172/JCI119054
- Michael, D., Phillips, A., Krupa, A., Martin, J., Redman, J., Altaher, A., . . . Bowen, T. (2011, Jun 3). The human hyaluronan synthase 2 (HAS2) gene and its natural antisense RNA exhibit coordinated expression in the renal proximal tubular epithelial cell. *J Biol Chem*, *286*(22), 19523-32. doi:10.1074/jbc.M111.233916
- Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC). (2023). *Estadísticas - Incidencia*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de Estadísticas - Mortalidad: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>
- Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC). (s.f.). *Registro Institucional de Tumores en Argentina - Boletín 2012-2020*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2023-02/2023-02-Bolet%C3%ADn-RITA-v-f.pdf>
- Misra, S., Ghatak, S., & Toole, B. (2005, May 27). Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J Biol Chem*, *280*(21), 20310-5. doi:10.1074/jbc.M500737200
- Momozawa, Y., Iwasaki, Y., Hirata, M., Liu, X., Kamatani, Y., Takahashi, A., . . . al., e. (2020, Apr 1). Germline Pathogenic Variants in 7636 Japanese Patients With Prostate Cancer and 12 366 Controls. *J Natl Cancer Inst*, *112*(4), 369-376. doi:10.1093/jnci/djz124
- Morera, D., Hennig, M., Talukder, A., Lokeshwar, S., Wang, J., Garcia-Roig, M., . . . Lokeshwar, V. (2017, Nov 7). Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Br J Cancer*, *117*(10), 1507-1517. doi:10.1038/bjc.2017.318
- Nagy, N., Kuipers, H., Frymoyer, A., Ishak, H., Bollyky, J., Wight, T., & Bollyky, P. (2015, Mar 23). 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol*, *6*, 123. doi:10.3389/fimmu.2015.00123
- Narod, S., & Foulkes, W. (2004, Sep). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*, *4*(9), 665-676. doi:10.1038/nrc1431
- Narod, S., & Rodríguez, A. (Oct de 2011). Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Pública de México*, *53*(5), 420-429. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342011000500010
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolář, J. (2008, Aug). Hyaluronic acid (Hyaluronan): A review. *Veterinární Medicina*, *53*(8). doi:10.17221/1930-VETMED
- Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J., & Brunk, U. (1984, Jul). Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, *44*(7), 3090-7.

- Nguyen, N., Kumar, A., Chacko, S., Ouellette, R., & Ghosh, A. (2017, Nov 14). Human hyaluronic acid synthase-1 promotes malignant transformation via epithelial-to-mesenchymal transition, micronucleation and centrosome abnormalities. *Cell Commun Signal*, *15*(1), 48. doi:10.1186/s12964-017-0204-z
- Ni, J., Cozzi, P., Hao, J., Beretov, J., Chang, L., Duan, W., . . . Li, Y. (2014, May). CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate*, *74*(6), 602-17. doi:10.1002/pros.22775
- Noble, P. (2002, Jan). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol*, *21*(1), 25-29. doi:10.1016/s0945-053x(01)00184-6
- Norquist, B., Harrell, M., Brady, M., Walsh, T., Lee, M., Gulsuner, S., & Bernards, S. C. (2016, Apr). Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol*, *2*(4), 482-90. doi:10.1001/jamaoncol.2015.5495
- Novak, U., Stylli, S., Kaye, A., & Lepperdinger, G. (1999, Dec 15). Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res*, *59*(24), 6246-6250.
- Oertli, B., Fan, X., & Wüthrich, R. (1998, Feb). Characterization of CD44-mediated hyaluronan binding by renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, *13*(2), 271-278. doi:10.1093/oxfordjournals.ndt.a027818
- Organización Panamericana de la Salud. (2023). *Día Mundial contra el Cáncer 2023: Por unos cuidados más justos*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-contra-cancer-2023-por-unos-cuidados-mas-justos>
- Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). *Cáncer de mama*, En línea. Recuperado el 5 de Feb de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/cancer-mama>
- Panal Cusati, M., Herrera de la Muela, M., Hardisson Hernaez, D., Choqueneira Dionisio, M., Román Guindo, A., & de Santiago Garcia, F. (2014). Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, *27*(4), 163-169. doi:10.1016/j.senol.2014.07.005
- Paritala, A., Takkar, B., Gaur, N., Soni, D., Ali, M., & Rathi, A. (2022, 22 Mar). Correlation of vitreous chamber depth with ocular biometry in high axial myopia. *Indian J Ophthalmol*, *70*(3), 914-920. doi:10.4103/ijo.IJO_1201_21
- Parnigoni, A., Caon, I., WX, T., Hua, S., Moretto, P., Bartolini, B., . . . Vigetti, D. (2022, May). The natural antisense transcript HAS2-AS1 regulates breast cancer cells aggressiveness independently from hyaluronan metabolism. *Matrix Biol*, *109*, 140-161. doi:10.1016/j.matbio.2022.03.009
- Passi, A., Vigetti, D., Buraschi, S., & Iozzo, R. (2019, Aug). Dissecting the role of hyaluronan synthases in the tumor microenvironment. *FEBS*, *286*(15), 2937-2949. doi:10.1111/febs.14847

- Pérez-Rodríguez, G. (2015). Prevalencia de subtipos por inmunohistoquímica del cáncer de mama en pacientes del Hospital General Regional 72, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cirugía y cirujanos*, 83(3), 193-198. doi:10.1016/j.circir.2015.05.003
- Phelan, C., Iqbal, J., Lynch, H., Lubinski, J., Gronwald, J., Moller, P., . . . Narod, S. (2014, Jan). Hereditary Breast Cancer Study Group. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*, 110(2), 530-534. doi:10.1038/bjc.2013.741
- Pirinen, R., Tammi, R., Tammi, M., Hirvikoski, P., Parkkinen, J., Johansson, R., . . . Kosma, V. (2001). Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 95, 12-17.
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. (2003, Jan). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1), 33-45. doi:10.1038/nrm1004. PMID: 12511867
- Posey, J., Soloway, M., Ekici, S., Sofer, M., Civantos, F., & Duncan, R. L. (2003, May 15). Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res*, 63(10), 2638-2644.
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., . . . al., e. (2011, Oct 2). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genet*, 43(11), 1104-7. doi:10.1038/ng.955
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., . . . al., e. (2011, Oct 2). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genet*, 43(11), 1104-7. doi:10.1038/ng.955
- Resovi, A., Bani, M., Porcu, L., Anastasia, A., Minoli, L., Allavena, P., . . . Giavazzi, R. (2018). Soluble stroma-related biomarkers of pancreatic cancer. *EMBO Mol Med*, 10, 8741. doi:10.15252/emmm.201708741
- Ropponen, K., Tammi, M., Parkkinen, J., Eskelinen, M., Tammi, R., Lipponen, P., . . . Kosma, V. (1998). Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, 342-347.
- Ruffell, B., & Johnson, P. (2008, Nov 15). Hyaluronan induces cell death in activated T cells through CD44. *J Immunol*, 181(10), 7044-7054. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7044
- Sá, V., Rocha, T., Moreira, A., Soares, F., Takagaki, T., Carvalho, L., . . . Capelozzi, V. (2015, Nov). 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(11), 1039-1047. doi:10.1590/1414-431X20154693
- Schmaus, A. K. (2014). Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis. *Br J Cancer*, 559-567. doi:https://doi.org/10.1038/bjc.2014.332
- Schmaus, A., Klusmeier, S., Rothley, M., Dimmler, A., Sipos, B., Faller, G., . . . Sleeman, J. (2014, Jul29). Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis. *Br J Cancer*, 111(3), 559-567. doi:10.1038/bjc.2014.332

- Senbanjo, L., & Chellaiah, M. (2017, Mar 7). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 5, 18. doi:10.3389/fcell.2017.00018
- Setälä, L., Tammi, M., Tammi, R., Eskelinen, M., Lipponen, P., Agren, U., . . . Kosma, V. (1999). Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer*, 79, 1133–1138.
- Sevic, I., Spinelli, F., Vitale, D., Icardi, A., Romano, L., Brandone, A., . . . Alaniz, L. (2020). Hyaluronan Metabolism is Associated with DNA Repair Genes in Breast and Colorectal Cancer. Screening of Potential Progression Markers Using qPCR. *Biomedicines*, 8(7), 183. doi:10.1016/j.ctrv.2013.06.006
- Shahbandi, A., Nguyen, H., & Jackson, J. (2020, Feb). TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends Cancer*, 6(2), 98-110. doi:10.1016/j.trecan.2020.01.007
- Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., & Ponta, H. (1994, Oct). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 6(5), 726-733. doi:10.1016/0955-0674(94)90100-7
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., . . . Bucala, R. (2006, Oct). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 25(4), 595-606. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.020
- Siiskonen, H., Poukka, M., Tyynelä-Korhonen, K., Sironen, R., & Pasonen-Seppänen, S. (2013, Apr 5). Inverse expression of hyaluronidase 2 and hyaluronan synthases 1-3 is associated with reduced hyaluronan content in malignant cutaneous melanoma. *BMC Cancer*, 13, 181. doi:10.1186/1471-2407-13-181
- Singleton, P., Mirzapioazova, T., Guo, Y., Sammani, S., Mambetsariev, N., Lennon, F., . . . Garcia, J. (2010, Nov). High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299(5), L639-51. doi:10.1152/ajplung.00405.2009
- Skelton, T., Zeng, C., Nocks, A., & Stamenkovic, I. (1998, Jan 26). Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol*, 140(2), 431-446. doi:10.1083/jcb.140.2.431
- Slavin, T., Maxwell, K., Lilyquist, J., Vijai, J., Neuhausen, S., Hart, S., . . . al., e. (2017, Jun 9). The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer*, 3, 22. doi:10.1038/s41523-017-0024-8
- Slevin, M., Kumar, S., & Gaffney, J. (2002, Oct 25). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem*, 277(43), 41046-41059. doi:10.1074/jbc.M109443200
- Smith, I., & Dowsett, M. (2003, Jun 12). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 348(24), 2431-42. doi:10.1056/NEJMra023246

- Soyano, A., Baldeo, C., & Kasi, P. (2018). BRCA Mutation and Its Association With Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 17(4), e647-e650. doi:10.1016/j.clcc.2018.06.006.
- Spinelli, F., Vitale, D., Demarchi, G., Cristina, C., & Alaniz, L. (2015, Dec 4). The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clin Transl Immunology*, 4(12), e52. doi:10.1038/cti.2015.35
- Spinelli, F., Vitale, D., Icardi, A., Caon, I., Brandone, A., Giannoni, P., . . . Alaniz, L. (2019, Sep). Spinelli FM, Vitale DL, Icardi A, Caon I, Brandone A, Giannoni P, Saturno V, Passi A, García M, Sevic I, Alaniz L. 286(17), 3433-3449. doi:10.1111/febs.14871
- Stern, R. (2003, Dec). Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 13(12), 105R-115R. doi:10.1093/glycob/cwg112
- Stern, R., Asari, A., & Sugahara, K. (2006, Aug). Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*, 85(8), 699-715. doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- Stuhlmeier, K., & Pollaschek, C. (2004, Mar 5). Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation. *J Biol Chem*, 279(10), 8753-60. doi:10.1074/jbc.M303945200
- Takasugi, M. F. (2020). Naked mole-rat very-high-molecular-mass hyaluronan exhibits superior cytoprotective properties. *Nat Commun*. doi:https://doi.org/10.1038/s41467-020-16050-w
- Tammi, R., Kultti, A., Kosma, V., Pirinen, R., Auvinen, P., & Tammi, M. (2008, Aug). Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol*, 18(4), 288-295. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.005
- Tan, J., Wang, X., Su, X., Li, H., Shi, Y., Wang, L., & Ren, G. (2011). Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One*, 6(7), e22836. doi:10.1371/journal.pone.0022836
- Theocharis, A., Skandalis, S., Gialeli, C., & Karamanos, N. (2015). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
- Thompson, E., Rowley, S., Li, N., McInerney, S., Devereux, L., Wong-Brown, M., . . . Campbell, I. (2016, May 1). Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *J Clin Oncol*, 34(13), 1455-9. doi:10.1200/JCO.2015.63.7454
- Tommasi, C., Pellegrino, B., Boggiani, D., Sikokis, A., Michiara, M., Uliana, V., . . . Musolino, A. (2021, Sep 6). Biological Role and Clinical Implications of microRNAs in BRCA Mutation Carriers. *Front Oncol*, 11, 700853. doi:10.3389/fonc.2021.700853
- Tong, L., Wang, Y., Ao, Y., & Sun, X. (2019, Jul). CREB1 induced lncRNA HAS2-AS1 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via the miR-466/RUNX2 axis. *Biomed Pharmacother*, 115, 108891. doi:10.1016/j.biopha.2019.108891

- Toole, B. (1990, Oct). Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2(5), 839-844. doi:10.1016/0955-0674(90)90081
- Toole, B. (2001, Apr). Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.*, 12(2), 79-87. doi:10.1006/scdb.2000.0244
- Toole, B. (2004, Jul). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular clue. *Nat Rev Cancer.*, 4(7), 528-539. doi:10.1038/nrc1391
- Turk, A., & Wisinski, K. (15 de Jun de 2018). PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer*, 124(12), 2498-2506. doi:10.1002/cncr.31307
- Turley, E., Noble, P., & Bourguignon, L. (2002, Feb 15). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, 277(7), 4589-4592. doi:10.1074/jbc.R100038200
- Turley, E., Noble, P., & Bourguignon, L. (2002, Feb). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, 277(7), 4589-4592. doi:10.1074/jbc.R100038200
- Udabage, L., Brownlee, G., Nilsson, S., & Brown, T. (2005, Oct 15). The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res*, 310(1), 205-217. doi:10.1016/j.yexcr.2005.07.026
- Uribe, J., Hernández, C., Menolascino, F., Rodríguez, J., Istúriz, L. M., Rodríguez, R., & Uribe, J. (2010). Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología*, 22(2), 109-116. Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-05822010000200005
- Valkonen, M., Haapasalo, H., Rilla, K., Tyynelä-Korhonen, K., Soini, Y., & Pasonen-Seppänen, S. (2018, Jun 18). Elevated expression of hyaluronan synthase 2 associates with decreased survival in diffusely infiltrating astrocytomas. *BMC Cancer*, 18(1), 664. doi:10.1186/s12885-018-4569-1
- Vanneste, M., Hanoux, V., Bouakka, M., & Bonnamy, P. (2017, Mar 15). Hyaluronate synthase-2 overexpression alters estrogen dependence and induces histone deacetylase inhibitor-like effects on ER-driven genes in MCF7 breast tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 444, 48-58. doi:10.1016/j.mce.2017.01.046
- Vesiotis, C., Vasileiou, S., & Vynios, D. (2019, Aug). A guide to hyaluronan and related enzymes in breast cancer: biological significance and diagnostic value. *FEBS J*, 286(15), 3057-3074. doi:10.1111/febs.14860
- Vigetti, D., Deleonibus, S., Moretto, P., Bowen, T., Fischer, J., Grandoch, M., . . . Passi, A. (2014, Oct 17). Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*, 289(42), 28816-26. doi:10.1074/jbc.M114.597401
- Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G., & Passi, A. (2014, Aug). Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1840(8), 2452-9. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
- Vigetti, D., Ori, M., Viola, M., Genasetti, A., Karousou, E., Rizzi, M., . . . Passi, A. (2006, Mar 24). Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. *J Biol Chem*, 281(12), 8254-63. doi:10.1074/jbc.M508516200

- Vitale, D. (2022). *Microambiente tumoral: rol del ácido hialurónico en el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires.
- Walker, C., Mojares, E., & Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*, 3028. doi:10.3390/ijms19103028
- Weber-Lassalle, N., Borde, J., Weber-Lassalle, K., Horváth, J., Niederacher, D., Arnold, N., . . . Thiele, H. (2019, Apr 29). Germline loss-of-function variants in the BARD1 gene are associated with early-onset familial breast cancer but not ovarian cancer. *Breast Cancer Res*, *21*(1), 55. doi:10.1186/s13058-019-1137-9
- Weigel, P., Hascall, V., & Tammi, M. (1997, May 30). Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, *272*(22), 13997-4000. doi:10.1074/jbc.272.22.13997
- Weng, C., Hsieh, M., Wu, C., Lin, Y., Shan, Y., Hung, W., . . . Cheng, K. (2019, May 20). Loss of the transcriptional repressor TGIF1 results in enhanced Kras-driven development of pancreatic cancer. *Mol Cancer*, *18*(1), 96. doi:10.1186/s12943-019-1023-1
- World Health Organization. (2023). *World Health Statistics 2023*, En línea. Retrieved Feb 5, 2024, from file:///C:/Users/user/Downloads/9789240074323-eng.pdf
- World Health Organization. (2023a). *Colorectal cancer*, En línea. Retrieved Feb 5, 2024, from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer?gclid=Cj0KCQiA-62tBhDSARIsAO7twbZL95zRPxSPXTYoU39VmBueeLaMP-0b8lvDeUVKXmw9btrzciM1gPwaArj1EALw_wcB
- Wu, D., Yan, X., Liu, L., Tian, C., Han, K., Zhang, H., & Min, D. (2017, Sep). TopBP1 promotes malignant progression and correlates with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *21*(18), 4022-4031.
- Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Liu, Y., Wu, H., Liu, Q., . . . Wu, K. (2016, Jan 21). Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets Ther*, *9*, 431-44. doi:10.2147/OTT.S9719
- Xu, H., Wu, K., Tian, Y., Liu, Q., Han, N., Yuan, X., . . . Wu, K. (2016, Oct). CD44 correlates with clinicopathological characteristics and is upregulated by EGFR in breast cancer. *Int J Oncol*, *49*(4), 1343-50. doi:10.3892/ijo.2016.3639
- Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015, Sep). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*, *4*(9), 1033-1043. doi:10.5966/sctm.2015-0048
- Yang, X., Leslie, G., Doroszuk, A., Schneider, S., Allen, J., Decker, B., . . . al., e. (2020, Mar 1). Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol*, *38*(7), 674-685. doi:10.1200/JCO.19.01907
- Yip, G., Smollich, M., & Götte, M. (2006). Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Molecular cancer therapeutics*, *5*(9), 2139-2148.

- Yoo, S., Leng, L., Kim, B., Du, X., Tilstam, P. K., Kong, J., . . . Bucala, R. (2016, Dec 6). MIF allele-dependent regulation of the MIF coreceptor CD44 and role in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(49), E7917-E7926. doi:10.1073/pnas.1612717113
- Yuan, Z., Chen, S., Sun, Q., Wang, N., Li, D., Miao, S., . . . Jiang, Y. (2017, Aug 1). Olaparib hydroxamic acid derivatives as dual PARP and HDAC inhibitors for cancer therapy. *Bioorg Med Chem*, *25*(15), 4100-4109. doi:10.1016/j.bmc.2017.05.058
- Zhou, L., Graves, M., MacDonald, G., Cipollone, J. M., & Roskelley, C. (2013, Mar). Microenvironmental regulation of BRCA1 gene expression by c-Jun and Fra2 in premalignant human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Res*, *11*(3), 272-281. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0395
- Zhu, L. (2005, Nov). Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator. *Eur J Cancer*, *41*(16), 2415-27. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.009