

# EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ÁCIDO HIALURÓNICO CD44 Y RHAMM. ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

Marilina MASCARÓ, Matías PIBUEL & Silvia E. HAJOS\*

<sup>1</sup>Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Dr. Ricardo A. Margni (IDEHU), UBA-CONICET. E-mail:shajos@ffyb.uba.ar \*Autor a quien se debe dirigir la correspondencia

RESUMEN	45
SUMMARY	46
Expression of CD44 and RHAMM Hyaluronic Acid Receptors. Activation of signaling pathways in Gestational Trophoblastic Disease	46
CÁNCER	46
¿Qué es la Enfermedad Trofoblástica Gestacional?	47
Epidemiología	48
Mola Hidatiforme	48
p57kip2	49
Coriocarcinoma	49
Tumor trofoblástico de sitio placentario	50
MARCADORES TROFOBLÁSTICOS	50
Gonadotropina coriónica humana (hCG)	50
HLA-G	51
Sincitina-2	51
MICROAMBIENTE TUMORAL	52
ÁCIDO HIALURÓNICO: Estructura Simple, Función Compleja	52
Metabolismo de AH	53
Biosíntesis mediada por HAS	53
Catabolismo del AH	53
HYALADHERINAS	54
CD44	54
RHAMM	55
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	56
Vía Ras-ERK	56
Función del AH en la migración celular. Mecanismos de acción	57
Agradecimientos	58

## RESUMEN

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) comprende un grupo heterogéneo de entidades interrelacionadas en las que se observa un crecimiento anormal de células en el útero. Están asociadas al trofoblasto y poseen características clínicas, morfológicas y patogenia específicas. Algunas de ellas representan lesiones benignas, como mola hidatiforme completa o parcial mientras que otras son neoplasias como coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario. Es de destacar que todas las variantes de ETG difieren genéticamente de la madre por lo tanto constituyen un aloinjerto dentro del tejido materno. El ácido hialurónico (AH) es el principal glicosaminoglicano lineal presente en la matriz extracelular. En neoplasias los principales receptores con los cuales interactúa son CD44 y RHAMM, modulando procesos biológicos tales como proliferación, diferenciación, adhesión, migración, invasión, resistencia a multidroga, senescencia. La

participación del AH ha sido estudiada en la progresión de varios tipos de tumores sólidos y nosotros, en particular, en enfermedades oncohematológicas. Sin embargo, su participación en neoplasias asociadas a trastornos gestacionales es prácticamente desconocida. En nuestro laboratorio evaluamos la función del ácido hialurónico y sus receptores en los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular así como las vías de señalización involucradas, las que podrían ser utilizadas como blancos terapéuticos para el tratamiento de la neoplasia trofoblástica gestacional.

**PALABRAS CLAVE:** ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL (ETG); ÁCIDO HIALURÓNICO (AH); CD44 Y RHAMM

## SUMMARY

### **Expression of CD44 and RHAMM Hyaluronic Acid Receptors. Activation of signaling pathways in Gestational Trophoblastic Disease**

Gestational Trophoblastic Disease (GTD) comprises a group of trophoblast-related disorders with abnormal growth of cells inside a woman's uterus. GTD shows specific clinical and morphological characteristics as well as pathogenesis. Some of them are benign lesions such as complete or partial hydatiform mole while others are neoplasm like choriocarcinoma and placental-site trophoblastic tumors. It is noteworthy that all variants of GTD differ genetically from the mother and therefore constitute an allograft in maternal tissue. Hyaluronan (HA) is the major glycosaminoglycan present in the extracellular matrix. HA has been associated with many important functions such as proliferation, wound healing, inflammation, migration and invasion, multidrug resistance or senescence. HA exerts its functions upon interaction with several receptors such as CD44 or RHAMM (principal receptors in cancer). Although HA-receptor interaction has been studied in various types of tumors its participation in neoplasm associated with gestational disorders is virtually unknown. In our laboratory we evaluated the role of hyaluronan and its receptors in the processes of proliferation, migration and differentiation, including the signaling pathways involved, which could be used as therapeutic targets for the treatment of Gestational Trophoblastic Neoplasia.

**KEY WORDS:** CD44 and RHAMM, Gestational Trophoblastic Disease (GTD), hyaluronan (HA).

## CÁNCER

Durante las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo para tratar de entender no sólo la forma en que crecen los tumores sino también su evolución. El concepto de cáncer se ha modificado desde su definición como una masa de células transformadas que proliferan de modo descontrolado para definirlo como "tejidos complejos" e incluso "órganos", compuestos por diversos tipos celulares que interactúan entre sí. De esta forma, actualmente la biología tumoral no se limita solo a las características propias de las células tumorales sino también a la contribución del microambiente que lo rodea (Egeblad *et al.*, 2010; Marongiu *et al.*, 2012).

Se han descrito ciertas características distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica (Hanahan & Weinberg, 2011), a saber:

1. Angiogénesis sostenida,
2. Evasión a la muerte celular,
3. Autosuficiencia en señales de crecimiento,
4. Falta de sensibilidad frente a señales inhibitorias del crecimiento,
5. Invasión de tejidos y metástasis,
6. Ilimitado potencial de replicación,
7. Evasión de la respuesta inmune,
8. Desregulación del metabolismo celular.

Por otra parte, la placenta humana contiene células trofoblásticas que comparten ciertas características con las células tumorales en relación a su capacidad de proliferación, migración e invasión y activación de vías de señalización, entre otras. Es interesante la comparación e identificación de moléculas que participan en determinados eventos en ambos procesos, gestacional y tumoral, ya que puede proveer nuevos blancos para el diagnóstico y tratamiento tanto de patologías oncológicas como gestacionales (Ferretti *et al.*, 2007; Holtan *et al.*, 2009).

### ¿Qué es la Enfermedad Trofoblástica Gestacional?

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) comprende un grupo heterogéneo de entidades interrelacionadas y asociadas al trofoblasto con patogenia y características clínicas y morfológicas específicas. Algunas de ellas representan lesiones benignas mientras que otras son neoplasias. Es interesante destacar que todas las variantes de ETG difieren genéticamente de la madre y por lo tanto constituyen un aloinjerto.

Si bien existen múltiples clasificaciones para este grupo de enfermedades, la siguiente propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se enfoca desde el punto de vista histopatológico (Shih, 2007; Mao, 2007; Cheung *et al.*, 2009). Así, la ETG está compuesta por:

- *Mola hidatiforme (MH)*, la cual puede ser parcial o completa.
- *Neoplasia trofoblástica gestacional (NTG)*, dentro de la cual se incluyen coriocarcinoma (CC), tumor trofoblástico de sitio placentario (TTSP) y tumor trofoblástico epitelioide (TTE).
- *Lesiones benignas*, como sitio placentar exagerado y nódulo de sitio placentar.

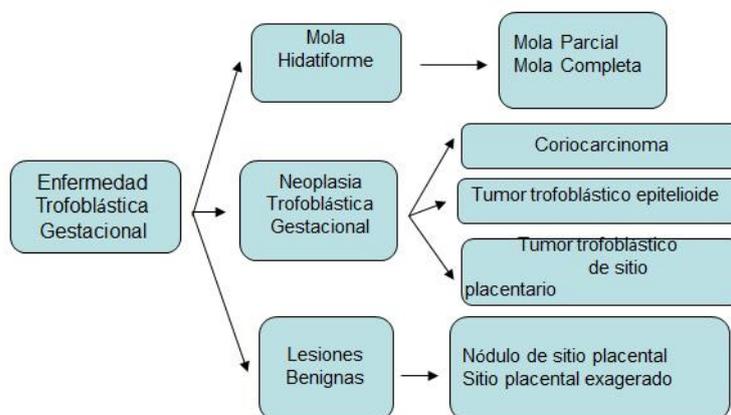


Figura 1. Clasificación de ETG desde el punto de vista histopatológico (Modificada de Shih, 2007).

Todas estas patologías tienen una alta probabilidad de cura luego del diagnóstico y seguimiento terapéutico adecuados. Sin embargo, aún quedan sin comprender aspectos de su biología que podrían permitir controlar los casos resistentes o recurrentes.

## Epidemiología

Los estudios epidemiológicos en ETG son escasos y están limitados a la definición de la entidad (tipo de gesta o tumor), la detección del caso (ausencia de confirmación histopatológica) y el empleo de un denominador común (embarazo, parto, nacidos vivos) para calcular la incidencia de casos.

La estimación de la incidencia de ETG varía según la región geográfica. La incidencia de MH es entre 1,5 – 6 de 1.000 embarazos en Sudamérica mientras que la de CC es de entre 2 – 7 de 100.000 embarazos y la de TTSP fue estimada de 0,2% de todos los casos de ETG (Mangili *et al.*, 2014).

Entre los factores de riesgo de ETG se enumeran:

- la edad materna, ha sido identificada como un factor importante ya que los casos de MH se incrementan en los extremos de la edad reproductiva (menor de 15 o mayor de 40 años).
- la etnicidad, varios estudios han reportado una alta incidencia de ETG en mujeres de origen asiático.
- la historia obstétrica, la enfermedad molar repetida incrementa el riesgo de desarrollar NTG.
- la nutrición, asociado al estado socioeconómico y localización geográfica; se postula que una dieta pobre en caroteno y proteínas y abundante en grasas podría constituir un factor de riesgo.

Este trabajo se enfocará en las características de mola hidatiforme, coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario.

## Mola Hidatiforme

La mola hidatiforme (MH) o embarazo molar, es un evento gestacional en el cual la placenta se desarrolla de modo anormal si bien no se genera un tumor. Puede ser parcial o completa tratándose de dos entidades diferentes e independientes entre sí. Cada una de éstas posee características citogenéticas particulares que derivan en hallazgos clínicos e histopatológicos propios.

Según la hipótesis más aceptada, ya que no se conoce exactamente el mecanismo, la MH se produce luego de la fertilización de un óvulo por uno o dos espermatozoides. En la MH Parcial (MHP), el óvulo con carga genética haploide es fertilizado por un espermatozoide que luego endoduplica, o por dos espermatozoides, pudiendo ser el cariotipo del producto triploide XXX, XXY o XYY. Así, MHP contiene material genético tanto materno como paterno. En cambio en MH Completa (MHC), el óvulo carece de material genético y es fertilizado por un espermatozoide que luego endoduplica, o por dos espermatozoides, siendo el cariotipo del producto diploide pudiendo ser XX o XY. El producto YY no es viable (Cheung *et al.*, 2009).

En determinados casos la MH puede coexistir con el embrión y concluir en un parto a término bajo seguimiento médico. Este tipo de embarazo se denomina gemelar (MH + embarazo normal) (Sebire *et al.*, 2010). La importancia en el diagnóstico y diferenciación de ambas entidades radica en el riesgo aumentado de desarrollar posteriormente NTG (Sun *et al.*, 2015).

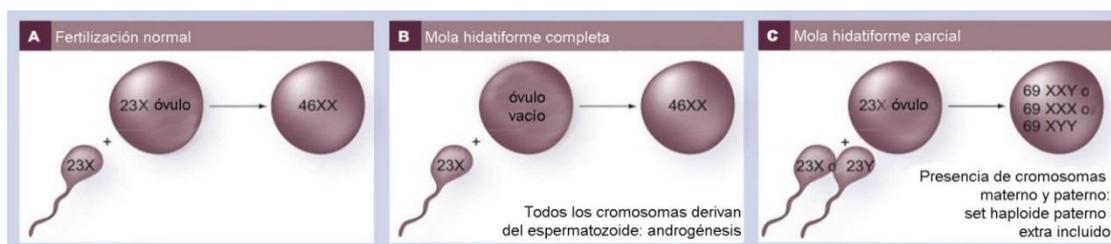


Figura 2. Génesis de MH parcial y completa. (Adaptado de Cheung *et al.*, 2009).

## p57kip2

Aunque MHP y MHC son fácilmente distinguibles en el examen histológico, el uso rutinario de técnicas de ultrasonido en el control del embarazo ha llevado a un diagnóstico clínico y evacuación más temprano en la gestación, frecuentemente en las primeras semanas. Como resultado, las características clásicas observadas en edad gestacional más avanzada no alcanzan a desarrollarse y el diagnóstico histopatológico se hace dificultoso. El empleo de la tinción para p57kip2 (proteína producto del gen *CDKN1C*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), que participa en la regulación del ciclo celular, constituye una herramienta útil y contribuye a la clasificación de MHC aunque no es ampliamente utilizada en la clínica.

Varios trabajos empleando inmunohistoquímica han demostrado que p57kip2 se encuentra expresado en el núcleo de las células del mesénquima veloso y de la capa citotrofoblástica en placenta humana y se ha demostrado su utilidad en la discriminación de MHC versus embarazos no molares ya que en MHC la expresión de p57kip2 es nula (porque no hay aporte genético materno). La exactitud de la tinción de p57kip2 en el diagnóstico de MHC ha sido validado con estudios genéticos moleculares (Kipp *et al.*, 2010; Sarmadi *et al.*, 2011). A pesar de las diferencias entre MHP y MHC mencionadas, ambas entidades tienen un manejo clínico similar.

El diagnóstico de este tipo de gestas, denominadas ETG benignas desde el punto de vista clínico, se basa en el examen ecográfico y en la cuantificación de la subunidad beta ( $\beta$ ) de hCG sérica cuyo nivel, en estos casos, es muy superior al de un embarazo normal en edad gestacional similar. Una vez hecho el diagnóstico, se procede a la evacuación de la mola, si no es que ya ocurrió una evacuación espontánea, y se remite el material para su estudio anatomopatológico y confirmación del diagnóstico.

Posteriormente, durante un período de vigilancia de seis meses se debe mantener una anticoncepción estricta ya que un eventual nuevo embarazo podría enmascarar un aumento de hCG producida por la enfermedad. Esto es muy importante ya que la vigilancia se realiza monitoreando el nivel de  $\beta$  hCG semanalmente y la conducta terapéutica adoptada dependerá del comportamiento de este marcador. Si el nivel de  $\beta$  hCG desciende gradualmente hasta negativizarse se tratará de una ETG benigna. Por el contrario, el aumento o plateau del nivel de  $\beta$  hCG indica malignización y la paciente entra en un nuevo protocolo diagnóstico para NTG.

## Coriocarcinoma

El CC es un tumor epitelial altamente maligno. Se trata de la entidad más frecuentemente observada entre las NTG, capaz de invadir múltiples órganos como pulmón, vagina, bazo, riñón, sistema gastrointestinal, hígado y cerebro. El marcador tumoral por excelencia es la subunidad  $\beta$  hCG sérica el que se encuentra en niveles muy altos. Se lo utiliza tanto para definir el diagnóstico como para el seguimiento de la enfermedad ya que correlaciona directamente con la masa tumoral.

La presentación clínica de esta enfermedad es variable y depende del estadio en que se detecte. Aunque la mayoría de los casos de CC se desarrollan poco tiempo después de la gestación, cuanto mayor sea la latencia entre ese desarrollo y el diagnóstico, aumentará la posibilidad de metástasis. El sangrado uterino anormal y el compromiso vaginal constituyen la forma de presentación más frecuente así como también las metástasis en pulmón. Las metástasis en hígado y cerebro son de mal pronóstico. En aquellos casos que además presentan multiquimioresistencia puede verse comprometida la vida de la paciente.

A pesar del origen de este tumor y de su alta capacidad de proliferación e invasión, bajo tratamiento y seguimiento médico adecuado la sobrevida de CC es aproximadamente 100%. La mayoría de las pacientes conservan su capacidad reproductiva y pueden sostener a futuro un embarazo normal a término sin verse comprometida la vida del neonato (Sebire and Lindsay, 2010).

### **Tumor trofoblástico de sitio placentario**

EL TTSP es una entidad muy poco frecuente dado que existen poco más de 100 casos en todo el mundo<sup>1</sup>. La presentación clínica más frecuente es el sangrado vaginal irregular con o sin amenorrea y puede llegar a manifestarse varios años después de la gestación precedente. La mayoría de los TTSP estudiados se limitan al útero. El tumor invade miometrio hacia la serosa y puede causar perforación. No obstante, algunos TTSP pueden ser malignos y metastatizar a pulmón, hígado, cavidad abdominal y cerebro. Los TTSP con múltiples metástasis tienen mal pronóstico y las pacientes pueden morir a pesar de la multiquimioterapia. Tanto el comportamiento como la quimiosensibilidad de esta patología son variables y difíciles de predecir. Los niveles de  $\beta$  hCG permanecen bajos y no correlacionan con la masa tumoral (Sebire & Lindsay, 2010).

En NTG el diagnóstico se basa en la sospecha por la presentación clínica sumado al dosaje de  $\beta$  hCG. Dicha presentación es más importante que el diagnóstico histológico e incluso, en ocasiones, el tratamiento es llevado a cabo sin este último.

### **MARCADORES TROFOBLÁSTICOS**

El proceso de diferenciación trofoblástica tanto hacia sincitiotrofoblasto como a trofoblasto extraveloso va acompañado del cambio en el patrón de expresión de determinadas proteínas como las que se detallan a continuación:

#### **Gonadotropina coriónica humana (hCG)**

La hCG es una proteína heterodimérica con un grado variable de glicosilación. Está formada por una subunidad alfa de 92 aminoácidos, codificada por un único gen, común a las gonadotropinas pituitarias LH, FSH y TSH, y por una subunidad beta de 145 aminoácidos que le confiere actividad biológica específica. Existen seis genes que codifican para la subunidad beta de los cuales CG beta 5 se expresa predominantemente en la placenta. Tanto la variabilidad en el grado de glicosilación, ya sea debido a la cantidad de cadenas laterales o tipo de unión N- u O- como la combinación de subunidades, libres o degradadas, confieren a esta hormona una significativa heterogeneidad en la estructura y como consecuencia en su función.

Entre las moléculas clínicamente importantes se encuentran la hCG intacta (o regular) y la hCG hiperglicosilada (hCG-H) (Cole *et al.*, 2011; Cole and Butler, 2012).

---

<sup>1</sup> Las muestras de TTSP están nucleadas en una base de datos mundial para su estudio (The International Society for the Study of Trophoblastic Diseases (ISSTD) global Placental Site Trophoblastic Tumour database).

La hCG es sintetizada por el sincitiotrofoblasto luego de la implantación del blastocisto. Es la primera señal que deriva del trofoblasto y puede ser detectada en la sangre materna en la primera semana de gestación (Guibourdenche *et al.*, 2010). La hCG evita la regresión del cuerpo lúteo en el ovario y estimula la producción de progesterona favoreciendo el mantenimiento del embarazo. Además, está involucrada en la angiogénesis y en la diferenciación trofoblástica. No sólo actúa de modo endócrino sino también autócrino favoreciendo su propia síntesis a través del receptor LH/CG (Fournier *et al.*, 2015). En cambio, hCG-H (denominada también antígeno trofoblástico invasivo) es sintetizada por el trofoblasto extraveloso y promueve la invasión trofoblástica de modo autócrino en forma independiente del receptor LH/CG (Guibourdenche *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013).

En la enfermedad trofoblástica gestacional el nivel de hCG en circulación es de suma importancia para el diagnóstico, junto con otros parámetros clínicos (vigilancia y decisión de la conducta terapéutica de la enfermedad) constituyendo el marcador tumoral por excelencia. Tanto en MH como en CC el nivel de hCG correlaciona directamente con la masa de tejido mientras que en TTSP los niveles de hCG se mantienen relativamente bajos.

### **HLA-G**

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) es una molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. Se la define como no clásica debido al bajo polimorfismo comparado con las moléculas clásicas del CMH (HLA-A y -B). La expresión de HLA-G así como la producción de isoformas truncadas y solubles derivadas de splicing alternativo es limitada y dependiente del contexto y del tipo celular.

HLA-G forma parte de un circuito molecular compartido entre células trofoblásticas y tumorales constituyendo un factor beneficioso tanto para el desarrollo de la gestación como para el proceso tumoral, aunque es perjudicial para el paciente en este último caso. Se expresa en células de citotrofoblasto veloso y extraveloso y es una importante molécula tolerogénica natural en el contexto de la interfase materno-fetal. Sin embargo, también puede expresarse en algunos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias. Desde el punto de vista inmunológico, HLA-G desempeña un importante papel ya que las células que lo expresan puede evadir el ataque del sistema inmune (Carosella *et al.*, 2008).

Por otro lado, la expresión de HLA-G en la población trofoblástica con capacidad invasiva correlaciona con la importancia de esta molécula en dicho evento. Se ha descrito que HLA-G no sólo induce un aumento en la invasión en la línea JEG-3 sino que también induce el aumento de uPA y MMPs (Guo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013a) mientras que su disminución produce el efecto contrario (Liu *et al.*, 2013b). HLA-G también se expresa en el trofoblasto extraveloso de embarazos molares en los que se reportó un incremento en comparación con placenta de primer trimestre (Rabreau *et al.*, 2000; Goldman-Wohl, 2001) y en tumores trofoblásticos compuestos por dicha población como son CC, TTSP y TTE (Singer *et al.*, 2002).

### **Sincitina-2**

El genoma humano contiene una fracción de elementos de origen retroviral producto de infecciones por retrovirus activos en la línea germinal ancestral que luego fue transmitida de modo mendeliano. La mayoría de estos elementos son no codificantes debido a mutaciones, deleciones y/o truncamientos.

Sincitina-2 es una proteína codificada por un gen de la familia FRD de retrovirus endógenos humanos (*human endogenous retroviruses* - HERV) cuyo gen también es denominado sincitina-2 o HERV-FRD (Blaise *et al.*, 2003). Tanto sincitina-2 como su receptor específico, MFSD2 (*major facilitator superfamily domain containing 2*), se expresan específicamente en la placenta humana (Blaise *et al.*, 2003; Esnault *et al.*, 2008).

Sincitina-2 se expresa en citotrofoblasto veloso mientras que el receptor MFSD2 se expresa en sincitiotrofoblasto, lo que llevó a proponer la participación de estas proteínas en la fusión célula-célula y como consecuencia en la morfología placentaria (Esnault *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2009). Esto fue demostrado tanto en células de citotrofoblasto veloso primario como en la línea celular BeWo donde se observó que el aumento en la expresión ARNm y proteína para sincitina-2 correlaciona directamente con la sincitización (Vargas *et al.*, 2009).

## MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral está compuesto por células estromales tales como fibroblastos, células endoteliales e infiltrado de células inmunes, además de las células tumorales, y de compartimentos celulares que incluyen factores solubles y otros componentes estructurales propios de la matriz extracelular (MEC). Se ha demostrado que existe un importante crosstalk entre las células y los componentes de la matriz extracelular y que esto favorece múltiples procesos.

Las células tumorales sensan las señales del microambiente y se comunican bilateralmente con las células del estroma. Durante la progresión tumoral este diálogo celular se altera influenciado por los cambios en la composición celular y molecular del microambiente tumoral a fin de sostener la proliferación, migración, invasión y metástasis (Itano & Kimata, 2008; Hanahan *et al.*, 2011).

## ÁCIDO HIALURÓNICO: Estructura Simple, Función Compleja

El ácido hialurónico (AH) es el glicosaminoglicano (GAG) mayoritario en la MEC. Está compuesto por unidades disacarídicas repetitivas de N-acetil-glucosamina y ácido glucurónico:  $[(\beta 1,3)\text{-GlcUA}-(\beta 1,4)\text{-GlcNAc}]_n$  (Figura 3). Su estructura es lineal y está cargado negativamente. A diferencia de otros GAGs no está modificado químicamente (por ejemplo: acetilación, sulfatación) ni está unido covalentemente a un núcleo (*core*) proteico. Su peso molecular varía entre  $10^5$  y  $10^7$  Da.

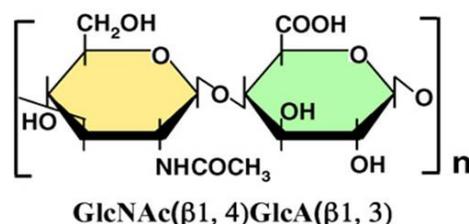


Figura 3. Estructura disacarídica del AH (Tomado de Itano & Kimata, 2008)

El AH se encuentra distribuido de modo ubicuo en los tejidos de mamíferos aunque en mayores concentraciones en el cordón umbilical, líquido sinovial, dermis, humor vítreo y en menor concentración en el suero sanguíneo (Itano, 2008).

Fisiológicamente, se lo encuentra como AH de alto peso molecular. En estas condiciones, debido a su carga negativa y la capacidad de formar redes, es altamente higroscópico lo que deriva en una mayor hidratación, viscosidad y elasticidad. Estas propiedades biofísicas y mecánicas han conducido a su empleo en el área oftalmológica, cosmetológica, dermatológica, en medicina regenerativa y en el tratamiento de lesiones articulares (Tamer, 2013). Además, por ser un compuesto no inmunogénico, se lo está estudiando como

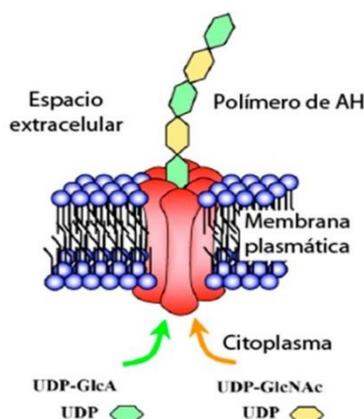
transportador de drogas principalmente para el tratamiento oncológico (Karbownik *et al.*, 2013; Dicker *et al.*, 2014). Las funciones del AH son pleiotrópicas y dependen de su tamaño y concentración, las que son reguladas de modo complejo a través de su metabolismo, unión a otras moléculas extracelulares y activación de vías de señalización (Turley *et al.*, 2016).

### Metabolismo de AH

El recambio dinámico de AH se lleva a cabo a través de la modulación de su metabolismo. Mientras su síntesis está regulada por sintasas de hialurónico (HAS), su catabolismo, que es donde se ejerce mayor control, está regulado por degradación enzimática mediada por hialuronidasas (Hyal) y/o estrés oxidativo.

### Biosíntesis mediada por HAS

Las sintasas de ácido hialurónico (HAS) son proteínas integrales de membrana encargadas de sintetizar AH empleando como sustratos UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc presentes en el citosol. Los sitios activos de estas enzimas están localizados en la cara interna de la membrana celular y el polímero es extruido hacia la superficie celular a través de un poro central a medida que es sintetizado e incluso puede permanecer allí retenido por la sintasa (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo de síntesis de AH por acción de HAS (Tomado de Itano & Kimata, 2008)

Existen tres isoformas de sintasas denominadas HAS1, HAS2 y HAS3, las que en el hombre residen en 3 cromosomas distintos, HAS1 se localiza en el cromosoma 19atq13.3–13.4, HAS2 en el cromosoma 8 atq24.12 y HAS3 en el cromosoma 16atq22.1. De ellas, la deficiencia de HAS2 es letal durante el desarrollo fetal. A pesar de que comparten una alta homología en su secuencia aminoacídica y similares características hidrofóbicas, las distintas HAS difieren en su localización subcelular y actividad enzimática. Se ha demostrado recientemente que la actividad puede ser controlada por fosforilación directa, glicosilación y ubiquitinación. La expresión de las HAS es regulada a nivel transcripcional por la acción de varias citoquinas y factores de crecimiento (Tammi *et al.*, 2011; Monslow *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las 3 isoformas forman complejos homo- u hetero-diméricos y que existe una cooperación funcional entre las distintas isoformas

### Catabolismo del AH

Una vez sintetizado, la localización del AH puede ser extracelular, pericelular (particularmente en estadios de proliferación y migración) o encontrarse en el interior celular (Toole, 2002). Posteriormente, su catabolismo puede ocurrir localmente (*in situ*) y/o luego del drenaje por el sistema linfático en los ganglios

linfáticos regionales. Los vasos linfáticos drenan una considerable cantidad de AH a través de su unión a los receptores HARE (HA receptor for endocytosis) o LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial receptor-1) el cual posteriormente es removido en el hígado aunque una pequeña cantidad puede ser eliminada a través de los riñones (~10%) y excretada en la orina (1-2%) (Monslow *et al.*, 2015). En los sitios donde la concentración de AH es muy elevada, el catabolismo *in situ* involucra el clivaje enzimático mediado por Hyals e internalización vía el receptor CD44.

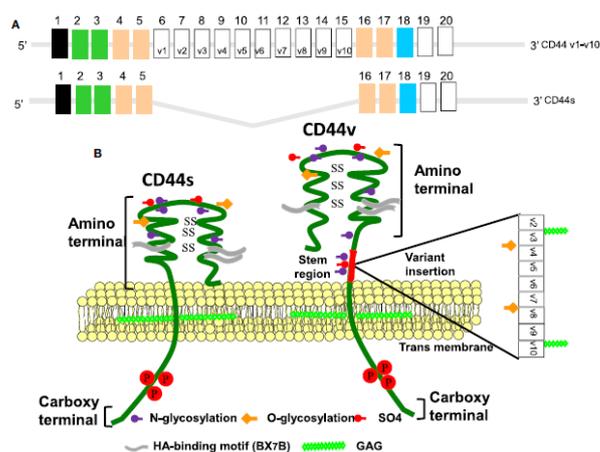
Hyal1 y -2 son las principales hialuronidasas en tejidos somáticos mientras que PH20 es esencial para la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida. Mientras Hyal1 es una enzima lisosomal con pH óptimo ácido que cliva el AH en oligosacáridos, Hyal2 se encuentra anclada a través de una unión glicosilfosfatidilinositol (GPI-) a la superficie de la membrana plasmática y es capaz de degradar AH-APM a unidades intermedias de 20KDa. Ambas enzimas pueden actuar de forma secuencial para la degradación del AH-APM y posterior internalización vía CD44 (Harada and Takahashi, 2006). También hay que considerar que el AH puede ser clivado por especies reactivas del oxígeno y/o nitrógeno en un proceso no selectivo generando como producto fragmentos de diversos tamaños (Monzon *et al.*, 2010).

## HYALADHERINAS

Así como la interacción de AH con otras moléculas extracelulares (proteoglicanos) es crucial para el ensamblaje y mantenimiento de las matrices peri y extracelulares, el AH es capaz de interactuar directamente con las células a través de la interacción con hialadherinas. Estas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas cuya característica en común es la habilidad de unir AH: CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, TSG-6 y TLRs. De este modo el AH es capaz de influenciar el comportamiento celular modulando vías de señalización intracelular. Incluso las interacciones intracelulares AH-hialadherinas con importantes quinasas llevan a la modulación de la actividad de HAS, ciclo celular, migración y diferenciación (Toole, 2004; Jiang *et al.*, 2013). Entre ellas, CD44 y RHAMM son los principales receptores de AH involucrados en procesos neoplásicos (Naor, 2016).

## CD44

CD44 es una proteína integral de membrana cuyo principal ligando es AH. Como la mayoría de las hialadherinas, es capaz de unir AH mediante una secuencia de 100 aminoácidos conocida como “módulo link”. La isoforma estándar de CD44 ronda los 85KDa aunque puede ser mayor ya que CD44 está sujeto a modificación por splicing de 9 exones alternativos insertados en diferentes combinaciones entre dos regiones constantes (Figura 5). La multifuncionalidad de CD44 se encuentra asociada tanto a su estructura como a la lista de ligandos conocidos. De esta forma, mediante interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, CD44 participa en la migración y en la transmisión de señales desde el exterior hacia el

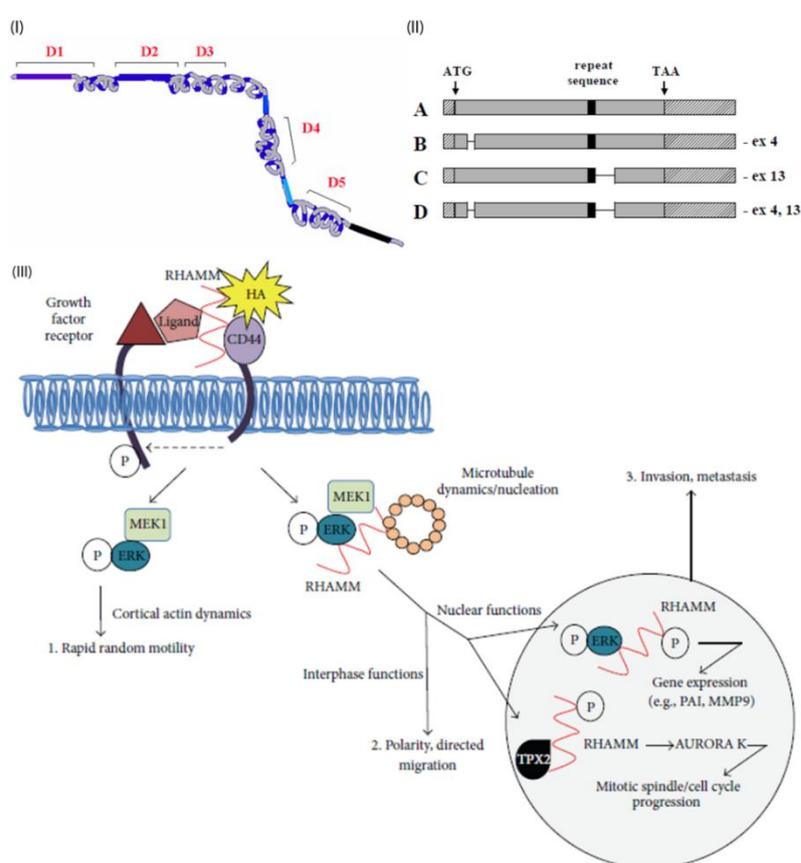


**Figura 5.** (A) Modelo de estructura genética de CD44 estándar y sus variantes. (B) Modelo de estructura proteica de CD44 estándar y sus variantes. (Tomado de Misra *et al.*, 2015)

interior celular que pueden conducir hacia la muerte celular programada o a la sobrevida y proliferación celular Takahashi (Johnson *et al.*, 2009; *et al.*, 2014; Misra *et al.*, 2015; Naor, 2016).

## RHAMM

RHAMM (receptor hyaluronan-mediated motility), a diferencia de CD44, es capaz de unir AH mediante una secuencia de 9-11 aminoácidos conteniendo múltiples aminoácidos básicos (Yang *et al.*, 1994). La forma de mayor tamaño ronda los 95 KDa aunque puede ser menor ya que está sujeto a modificación por splicing alternativo de su ARNm dando origen a 3 isoformas. La estructura de RHAMM es súper enrollada (Figura 6), pierde el péptido señal de exportación en su paso por el retículo endoplásmico/aparato de Golgi y no contiene fragmento transmembrana. Sin embargo, exhibe múltiples funciones intra y extracelulares algunas de las cuales no pueden predecirse en base a su estructura (Turley *et al.*, 2001).



**Figura 6.** (I) Estructura secundaria y dominios de RHAMM. D1 codifica un dominio proteico que regula negativamente la capacidad de RHAMM de promover la activación de ERK1; D2 codifica un cierre leucina imperfecto requerido para mediar la motilidad mediada por RHAMM y la formación de podosomas; D3 es necesario para la interacción de RHAMM intracelular con MEK1; D4 contribuye a la unión de ERK1 a RHAMM intracelular; D5 codifica la secuencia de unión a AH responsable de la interacción de AH con RHAMM extracelular y la unión de ERK1 a RHAMM intracelular. (II) Representación esquemática de las isoformas de RHAMM. Las secuencias deletionadas en las isoformas B, C y D (indicadas con línea negra) corresponden a los exones 4 (en D1), 13 y 4+13, respectivamente. Adaptado de (Assmann *et al.*, 1999; Turley and Harrison, 1999). (III) Modelo de señalización mediada por RHAMM. En la superficie celular RHAMM interactúa con CD44, AH y factores de crecimiento y a través de receptores tirosina quinasa activa ERK. Esta señalización puede afectar la migración celular independientemente de RHAMM intracelular. Además, RHAMM intracelular se une a varias proteínas intracelulares y regula la dinámica de microtúbulos, función y estructura de centrosomas y expresión génica (ejemplo, PAI-1 y MMP9) contribuyendo a la progresión del ciclo celular, polaridad, migración celular e integridad del polo mitótico (Tomado de Tolg *et al.*, 2014).

Originalmente RHAMM fue descubierto en sobrenadantes de cultivo (Hardwick *et al.*, 1992) y también fue descrita su localización en citoplasma, núcleo (Wang *et al.*, 1998; Assmann *et al.*, 1999) y en la superficie celular (Zhang *et al.*, 1998). Se ha reportado que se asocia con receptores transmembrana como CD44 y con receptores de factores de crecimiento EGFR, PDGFR y RON (Tolg *et al.*, 2014; Turley *et al.*, 2016). De este modo RHAMM puede modular las vías de señalización asociadas a los receptores a los cuales se acopla y controlar la expresión de genes asociados al ciclo celular (Savani *et al.*, 2001; Maxwell *et al.*, 2008; Twarock *et al.*, 2010; Tolg *et al.*, 2014). Estudios clínicos sugieren que RHAMM podría cumplir una función en la resistencia a drogas, hecho que determinaría la evolución del paciente. Tanto su expresión en superficie como la intracelular contribuyen a incrementar la agresividad del tumor. Además, entre sus funciones intracelulares RHAMM participa en la formación e integridad del centrosoma y del huso mitótico (Turley *et al.*, 2016).

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La transducción de señales a través de etapas secuenciales de fosforilación representa el mecanismo de control más común de la función celular. Múltiples estímulos como factores de crecimiento, hormonas, citoquinas o contacto célula-matriz extracelular inician la señalización como producto de la interacción con determinados receptores. Las vías de señalización de Ras-ERK y PI3K-Akt constituyen los principales mecanismos para el control de la supervivencia celular, diferenciación, proliferación, metabolismo y motilidad en respuesta a estímulos extracelulares.

### Vía Ras-ERK

ERK (quinasa regulada por señales intracelulares) es una MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y el principal efector de la oncoproteína Ras. Las vías MAPK están compuestas por una quinasa regulada por una GTPasa inicial (MAPKKK), la cual fosforila y activa a una quinasa intermedia (MAPKK), quien a su vez fosforila y activa a una quinasa efectora (MAPK). En la vía ERK-MAPK, esos componentes son Ras GTPasa y las proteínas Raf, MEK y ERK. Una vez que ERK está activada, fosforila proteínas de señalización citoplasmáticas y efectores de punto final como son los factores de transcripción (Mendoza *et al.*, 2011).

### Vía PI3K/Akt

Akt, también conocida como PKB, es una serina/treonina quinasa y el nodo central de la vía de PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa). La activación de receptores tirosina quinasa (siglas en inglés, RTK) ó acoplados a proteínas G (siglas en inglés, GPCRs) por unión a su ligando inducen el reclutamiento en la membrana y activación de las subunidades de PI3K p85 y p110, respectivamente. PI3K fosforila el sustrato PIP2 y lo convierte en PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 tri-fosfato). El aumento en los niveles de PIP3 induce el reclutamiento de Akt en la membrana y posterior activación de la misma por PDK1. Como consecuencia, se desencadena la fosforilación secuencial de un amplio rango de proteínas “rio abajo” (Manning *et al.*, 2007; Knofler, 2010; Mendoza *et al.*, 2011).

Varios factores afectan la dinámica de las vías de señalización. No sólo dependen de la intensidad y duración de la activación sino que también están reguladas por la fuerza del estímulo y los circuitos de retroalimentación. Incluso, algunos agonistas involucrados en la activación de una de las vías puede superponerse parcialmente con la otra vía de señalización. Además, el grado de activación depende de la disponibilidad de sustrato, la expresión y localización en la superficie celular de los receptores y la expresión de varias proteínas adaptadoras.

La participación de la vía de Ras-ERK y PI3K/Akt en el control de la migración e invasión se ha descrito en diferentes modelos de trofoblasto humano normal. La estimulación por diversos factores no sólo induce la motilidad del trofoblasto a través del aumento en la fosforilación de ERK, como se demostró tras la inhibición de MEK, sino que también algunos de ellos como EGF (factor de crecimiento epidérmico) y hCG regulan la inducción de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, cruciales para la invasión trofoblástica (Haslinger *et al.*, 2013).

### **Función del AH en la migración celular. Mecanismos de acción**

La migración es un pre-requisito indispensable para el establecimiento de las metástasis. En determinados casos éstas aparecen luego de la remoción quirúrgica del tumor primario e incluso pueden subsistir luego de su regresión.

La matriz extracelular enriquecida en AH, al encontrarse altamente hidratada, es maleable y permite un comportamiento celular dinámico, ya que las células pueden cambiar de forma durante la mitosis y penetrar tejidos durante la migración. A través de su interacción con CD44 y RHAMM, el AH promueve la migración e invasión celular. Estos receptores pueden actuar asociados o independientemente uno del otro. Como producto de esta interacción pueden activarse diversas quinasas entre las que se encuentran PI3K y MAPK (Zhu *et al.*, 2013). Este mecanismo ha sido descrito en células de cáncer de mama, pulmón, esófago, fibrosarcoma y en células de músculo liso vascular (Twarock *et al.*, 2010; Nikitovic *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la interacción AH-CD44 induce migración en dos modelos de células linfoides murinas (Alaniz *et al.*, 2006; Cordo-Russo *et al.*, 2010). En un modelo resistente a multidrogas, este efecto depende de PI3K denotando un nexo entre la migración y la quimioresistencia. Además hemos demostrado en un modelo murino que el aborto está asociado a un aumento en la expresión de ácido hialurónico en la interface materno-fetal (Cordo Russo *et al.*, 2009) y por otra parte, que líneas celulares leucémicas sintetizan ácido hialurónico para evitar la senescencia y resistir la quimioterapia (Lompardía *et al.*, 2013).

Hay que destacar que el peso molecular del AH influye en la interacción con sus receptores y como consecuencia en la intensidad de la señal que será traducida y el proceso celular que desencadenará. Se ha reportado que oligosacáridos de AH (oAH) pero no AH de alto peso molecular, promueven la migración celular a través de RHAMM (Tolg *et al.*, 2014, Turley *et al.*, 2016).

Otro evento que promueve la migración es el clivaje de CD44 de la superficie celular facilitando así su de-adhesión del AH. Dicho clivaje es mediado por la proteasa asociada a membrana MT1-MMP. Producto de este clivaje, la región intracelular de CD44 se dirige al núcleo y activa la transcripción de varios genes, incluido aquél que codifica para CD44, a través de la activación de PI3K (Toole, 2004).

En función de lo expuesto y teniendo en cuenta que: a) la mayoría de las pacientes con NTG se pueden curar con quimioterapia adecuada bajo supervisión médica experta, b) algunas pacientes pueden presentar recidiva y quimioresistencia y c) en las pacientes con NTG de alto riesgo la quimioterapia múltiple tiene como efecto adverso a largo plazo la inducción de un segundo tumor, el objetivo general de nuestro trabajo consistió en estudiar el papel del ácido hialurónico y sus receptores en los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular así como las vías de señalización involucradas, las que podrían ser utilizadas como blancos terapéuticos para el tratamiento de la Neoplasia trofoblástica gestacional. Pudimos demostrar por primera vez la expresión diferencial de AH y RHAMM en tejido de pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional así como en las líneas celulares empleadas (BeWo, JEG-3, JAR). También demostramos que la interacción AH-RHAMM induce la migración de las células de coriocarcinoma y que dicha migración está mediada por la vía de ERK. Estos resultados son novedosos y contribuyen al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad trofoblástica gestacional.

## Agradecimientos

Se agradece a la Dra. en Bioquímica Marilina Mascaró haber cedido parte de la Introducción de su Tesis Doctoral para el desarrollo de la presente revisión. Este trabajo fue realizado en parte con fondos del Subsidio UBACYT 20020130100415BA otorgado a la Dra. S. Hajos.

## REFERENCIAS

- Alaniz, L., M.G. García, C. Gallo-Rodriguez, R. Agusti, N. Sterín-Speziale, SE. Hajos, *et al.* (2006) Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF- B transcription factor. *Glycobiology*. **16**: 359-67.
- Assmann, V., D. Jenkinson, J.F. Marshall & I.R. Hart (1999) The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell Sci.* **112**: 3943-54.
- Blaise, S., N. de Parseval, L. Bénit & T. Heidmann (2003) Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *P. Natl. Acad Sci. USA* **100**: 13013-8.
- Carosella, E.D., B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau & J. Lemaoult (2008) Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. **111**: 4862-70.
- Cole, L.A., S. DuToit & T.N. Higgins (2011) Total hCG tests. *Clin. Chim. Acta* **412**: 2216-22.
- Cole, L.A. & S. Butler (2012) Hyperglycosylated hCG, hCG $\beta$  and Hyperglycosylated hCG $\beta$ : Interchangeable cancer promoters. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**: 232-8.
- Cordo-Russo, R., M.G. Garcia, G. Barrientos, A.S. Orsal, M. Viola, P. Moschansky, *et al.* (2009) Murine Abortion is Associated with Enhanced Hyaluronan Expression and Abnormal Localization at the Fetomaternal Interface. *Placenta* **30**: 88-95.
- Cordo-Russo, R.I., L.D. Alaniz, N. Saccodossi, S. Lompardía, G. Blanco, E. Alvarez, *et al.*, (2010) Hyaluronan induces migration of multidrug-resistant lymphoma cell lines in vitro through Tiam1 activation by a PI3K-dependent mechanism. *Leukemia Res.* **34**: 1525-32.
- Cheung, A.N., H.J. Zhang, W.C. Xue & M.K. Siu (2009) Pathogenesis of choriocarcinoma: clinical, genetic and stem cell perspectives. *Future Oncol.* **5**: 217-31.
- Dicker, K.T., L.A. Gurski, S. Pradhan-Bhatt, R.L. Witt, M.C. Farach-Carson & X. Jia (2014) Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia* **10**: 1558-70.
- Egeblad, M., E.S. Nakasone & Z. Werb (2010) Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Develop. Cell.* **18**: 884-901.
- Esnault, C., S. Priet, D. Ribet, C. Vernochet, T. Bruls, C. Lavielle, *et al.* (2008) A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *P. Natl. Acad Sci. USA* **105**: 17532-7.
- Ferretti, C., L. Bruni, V. Dangles-Marie, A.P. Pecking & D. Bellet (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum. Reprod. Update* **13**: 121-41.
- Fournier, T. J. Guibourdenche & D. Evain-Brion (2015) Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. *Trophoblast Res.* **29**: 60-5.
- Gad, S., R.J. Kurman, M.T. McMaster & I.-M Shih (2002) HLA-G Immunoreactivity Is Specific for Intermediate Trophoblast in Gestational Trophoblastic Disease and Can Serve as a Useful Marker in Differential Diagnosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**: 914-20.
- Goldman-Wohl, D., I. Ariel, C. Greenfield, D. Hochner-Celnikier, Y. Lavy & S. Yagel (2001) A study of human leukocyte antigen G expression in hydatidiform moles. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **185**: 476-80.
- Guibourdenche, J., K. Handschuh, V. Tsatsaris, P. Gerbaud, M.C. Leguy, F. Muller, *et al.*, (2010) Hyperglycosylated hCG Is a Marker of Early Human Trophoblast Invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**: E240-4.

- Guo, Y., C.L. Lee, K.H. So, J. Gao, W.S. Yeung, Y. Yao & K.F. Lee (2013) Soluble Human Leukocyte Antigen-G5 Activates Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signaling and Stimulates Trophoblast Invasion. *PLoS One*. 8(10): e76023.
- Hanahan, D. & R.A. Weinberg (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-74.
- Harada, H. & M. Takahashi (2006) CD44-dependent Intracellular and Extracellular Catabolism of Hyaluronic Acid by Hyaluronidase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **282**: 5597-607.
- Hardwick, C., K. Hoare, R. Owens, H.P. Hohn, M. Hook, D. Moore, *et al.*, (1992) Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J. Cell. Biol.* **117**: 1343-50.
- Haslinger, P., S. Haider, S. Sonderegger, J.V. Otten, J. Pollheimer, G. Whitley, *et al.* (2013) AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans. *Biol. Reprod.* **88**: 54.
- Holtan, S.G., D.J. Creedon, P. Haluska & S.N. Markovic (2009) Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clin. Proc.* **84**: 985-1000.
- Itano, N. (2008) Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *J. Biochem.* **144**: 131-7.
- Itano, N. & K. Kimata (2008) Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* **18**: 268-74.
- Jiang, J., P. Mohan & C.A. Maxwell (2013) The cytoskeletal protein RHAMM and ERK1/2 activity maintain the pluripotency of murine embryonic stem cells. *PLoS One*. **8**(9): e73548.
- Johnson, P. & B. Ruffell (2009) CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **8**:2 08-20.
- Karbownik, M. & J. Nowak (2013) Hyaluronan: Towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacol. Rep.* **65**: 1056-74.
- Kipp, B.R., R.P. Ketterling, T.N. Oberg, M.A. Cousin, A.M. Plagge, A.E. Wiktor, *et al.* (2010) Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization, p57 Immunostaining, Flow Cytometry, and Digital Image Analysis for Diagnosing Molar and Nonmolar Products of Conception. *Am. J. Clin. Pathol.* **133**: 196-204.
- Knofler, M. (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Develop. Biol.* **54**(2-3): 269-280.
- Lee, C.L., P.C. Chiu, L. Hautala, T. Salo, W.S. Yeung, U.H. Stenman, *et al.* (2013) Human chorionic gonadotropin and its free  $\beta$ -subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **375**: 43-52.
- Li, L., L. Qi, Z. Liang, W. Song, Y. Liu, Y. Wang, *et al.* (2015) Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* **36**: 113-22.
- Liu, H., X. Liu, H. Jin, F. Yang, W. Gu & X. Li (2013a) Proteomic analysis of knock-down HLA-G in invasion of human trophoblast cell line JEG-3. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**: 2451-9.
- Liu, X., W. Gu & X. Li (2013b) HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation. *Placenta* **34**: 1044-52.
- Lompardía, S.L., D.L. Papademetrio, M. Mascaró, E.M. Álvarez & S.E. Hajos (2013) Human leukemic cell lines synthesize hyaluronan to avoid senescence and resist chemotherapy. *Glycobiology* **23**: 1463-76.
- Mangili G., D. Lorusso, J. Brown, J. Pfisterer, L. Massuger, M. Vaughan, *et al.* (2014) Trophoblastic Disease Review for Diagnosis and Management. *Int. J. Gynecol. Cancer* **24**: S109YS116.
- Manning, B.D. & L.C. Cantley (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. **129**: 1261-74.
- Mao, T.L., R.J. Kurman, C.C. Huang, M.C. Lin & I.M. Shih (2007) Immunohistochemistry of choriocarcinoma: an aid in differential diagnosis and in elucidating pathogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**: 1726-32.
- Marongiu, F., S. Doratiotto, M. Sini, M.P. Serra & E. Laconi (2012) Cancer as a disease of tissue pattern formation. *Progr. Histochem. Cytochem.* **47**: 175-207.
- Maxwell, C.A., J. McCarthy & E. Turley (2008) Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J. Cell Sci.* **121**: 925-32.
- Mendoza, M.C., E.E. Er & J. Blenis (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 320-8.

- Misra, S., V.C. Hascall, R.R. Markwald & S. Ghatak (2015) Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **6**: 201. doi: 10.3389/fimmu.2015.00201.
- Monzon, M.E., N. Fregien, N. Schmid, N.S. Falcon, M. Campos, S.M. Casalino-Matsuda, *et al.* (2010) Reactive Oxygen Species and Hyaluronidase 2 Regulate Airway Epithelial Hyaluronan Fragmentation. *J. Biol. Chem.* **285**: 26126-34.
- Monslow, J., P. Govindaraju & E. Puré (2015) Hyaluronan-A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment. *Front. Immunol.* **6**: 231. doi: 10.3389/fimmu.2015.00231.
- Naor, D. (2016) Editorial: Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulates the Activity of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2016.00336
- Nikitovic, D., K. Kouvidi, N.K. Karamanos & G.N. Tzanakakis (2013) The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression. *BioMed Res. Int.* **2013**: 1-12.
- Rabreau, M., N. Rouas-Freiss, M. Landi, C. Le Danff & E.D. Carosella (2000) HLA-G Expression in Trophoblast Cells Is Independent of Embryonic Development. *Human Immunol.* **61**: 1108–12.
- Sarmadi, S., N. Izadi-Mood, A. Abbasi & S. Sanii (2011) p57KIP2 immunohistochemical expression: a useful diagnostic tool in discrimination between complete hydatidiform mole and its mimics. *Arch. Gynecol. Obstetr.* **283**: 743-8.
- Savani, R.C., G. Cao, P.M. Pooler, A. Zaman, Z. Zhou & H.M. DeLisser (2001) Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**: 36770-8.
- Sebire, N.J. & I. Lindsay (2010) Current Issues in the Histopathology of Gestational Trophoblastic Tumors. *Fetal Pediatr. Pathol.* **29**: 30-44.
- Shih, I.-M. (2007) Gestational trophoblastic neoplasia-pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lancet Oncol.* **8**: 642-50.
- Singer, G., R.J. Kurman, M.T. McMaster & I.M. Shih (2002) HLA-G Immunoreactivity Is Specific for Intermediate Trophoblast in Gestational Disease Center over the past three decades: Does early diagnosis alter risk for gestational trophoblastic neoplasia? *Gynecol. Oncol.* **138**: 46-9.
- Takahashi, H., T. Takizawa, S. Matsubara, A. Ohkuchi, T. Kuwata, R. Usui, *et al.* (2014) Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. *Placenta* **35**: 163-70.
- Tamer, T.M. (2013) Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscipl. Toxicol.* **6**: 111–25.
- Tammi, R.H., A.G. Passi, K. Rilla, E. Karousou, D. Vigetti, K. Makkonen, *et al.* (2011) Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J.* **278**: 1419–28.
- Tolg, C., J.B. McCarthy, A. Yazdani & E.A. Turley (2014) Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the cancerization of stromal tissues. *Biomed Res. Int.* **2014**:103923.
- Toole, B.P. (2002) Mini Review: Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* **12**: 37R-42.
- Toole, B.P. (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer* **4**: 528-39.
- Turley, E. & R. Harrison (1999) RHAMM, a member of the hyaladherins. *Glycoforum*. Disponible en: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>>.
- Turley, E.A., P.W. Noble & L.Y. Bourguignon (2001) Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *J. Biol. Chem.* **277**: 4589-92.
- Turley, E.A., D.K. Wood & J.B. McCarthy (2016) Carcinoma Cell Hyaluronan as a Portable Cancerized Prometastatic Microenvironment. *Cancer Res.* **76**: 1–6.
- Twarock, S., M.I. Tammi, R.C. Savani & J.W. Fischer (2010) Hyaluronan Stabilizes Focal Adhesions, Filopodia, and the Proliferative Phenotype in Esophageal Squamous Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **285**: 23276-84.
- Vargas, A., J. Moreau, S. Landry, F. LeBellego, C. Toufaily, E. Rassart, *et al.*, (2009) Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J. Mol. Biol.* **392**: 301-18.
- Sun, S.Y., A. Melamed, D.P. Goldstein, M.R. Bernstein, N.S. Horowitz, A.F. Moron, *et al.*, (2015) Changing presentation of complete hydatidiform mole at the New England Trophoblastic Disease Center over the past three decades: Does early diagnosis alter risk for gestational trophoblastic neoplasia? *Gynecol. Oncol.* **138**: 46–9
- Wang, C., A.D. Thor, D.H. Moore 2<sup>nd</sup>, Y. Zhao, R. Kerschmann, R. Stern, *et al.* (1998) The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. *Clin. Cancer Res.* **4**: 567-76.

- Yang, B., B.L. Yang, R.C. Savani & E.A. Turley (1994) Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.* **13**: 286-96.
- Zhang, S., M.C. Chang, D. Zylka, S. Turley, R. Harrison & E.A. Turley (1998) The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 11342-8.
- Zhu, R., Y.H. Huang, Y. Tao, S.C. Wang, Ch. Sun, H.L. Piao, *et al.* (2013) Hyaluronan up-regulates growth and invasion of trophoblasts in an autocrine manner via PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways in early human pregnancy. *Placenta* **34**: 784-91