

# LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO REDUCE LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMOR EN CÁNCER DE PULMÓN EXPERIMENTAL

Fernando Gayet Preiss<sup>1</sup>, Flavia Piccioni<sup>2</sup>, Mariel Fusco<sup>2</sup>, Marco Aurelio Díaz Gutierrez<sup>2</sup>, Pamela Ribatto<sup>2</sup>, Juan Bayo<sup>2</sup>, Manglio Rizzo<sup>1,2</sup>, Mariana Malvicini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Oncología, Hospital Universitario Austral, <sup>2</sup>Laboratorio de Inmunobiología del Cáncer, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IMT, Universidad Austral-CONICET), Buenos Aires, Argentina

**Dirección postal:** Mariana Malvicini, Av. Pte. Perón 1500, 1629 Derqui, Pilar, Buenos Aires, Argentina

e-mail: mmalvicini@austral.edu.ar

## Resumen

La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) progresan o recaen luego del tratamiento con taxanos-platinos. En el microambiente tumoral (TME) las *cancer stem cells* (CSCs), que expresan CD133, están involucradas en la recurrencia. El ácido hialurónico (HA) del TME regula, en parte, la función de las CSCs. Analizamos HA en el TME y si su modulación con la cumarina 4-Methylumbelliferona (4Mu) modifica las propiedades de las CSCs. Utilizamos líneas murinas (Lewis Lung Carcinoma; LLC) y humanas (A549) para evaluar viabilidad luego de la exposición al paclitaxel, pemetrexed o cisplatino, o combinados con 4Mu. Analizamos sintasas HAS y hialuronidasas HYAL y factores de transcripción de CSCs a partir de datos de pacientes (TCGA) y por qPCR. Aislamos células CD133+ y estudiamos la expresión de HA y la capacidad clonogénica y tumorigénica.

Observamos que los tumores de LLC producen HA, generado en parte por estas células. El  $8.53 \pm 0.35\%$  de LLC son CD133+, y expresan más HA y CD44 en comparación a las CD133- ( $p < 0,05$ ). El análisis de TCGA mostró que HAS3 se correlaciona positivamente con los niveles de KLF4 y SOX2, pero HYAL2 se correlaciona inversamente con la expresión de SOX2. La viabilidad de las CD133+ tratadas con 4Mu+quimioterapia (Qx) y la expresión génica de HAS, CD44, CD47 y SOX2 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ). A partir

de estos hallazgos, sugerimos que la inhibición de HA podría aumentar la susceptibilidad de las CSCs a la Qx, mejorando su eficacia y/o previniendo la recurrencia del tumor.

**Palabras clave:** células iniciadoras de tumor, resistencia, quimioterapia, cáncer de pulmón experimental, ácido hialurónico

## Abstract

Many patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) will progress or relapse after treatment with platinum-taxanes. Tumors are composed by a bulk of cells including cancer stem cells (CSCs), which express CD133, and are involved in recurrence. Hyaluronic acid (HA) a glycosaminoglycan of tumor microenvironment (TME) regulates, in part, the function of the CSCs. The aim of this work was to analyze HA in TME and if its modulation using coumarin 4-Methylumbelliferone (4Mu) modifies the properties of the CSCs. We used murine (Lewis Lung Carcinoma; LLC) and human (A549) lines to evaluate cell viability after exposure to paclitaxel, pemetrexed or cisplatin, alone or combined with 4Mu. Expression of HA synthases (HAS), hyaluronidase HYAL and CSC transcription factors were analyzed from patient data (TCGA) and by qPCR. We isolated CD133+ cells and studied the expression of HA before and after the treatments. We evaluated clonogenic and tumorigenic capacity.

We observed that LLC tumors produce HA, generated in part by these cells. The  $8.53 \pm 0.35\%$  of LLC are CD133+, and express more HA and CD44 compared to CD133- ( $p < 0.05$ ). The TCGA analysis showed that HAS3 is positively correlated with the levels of KLF4 and SOX2, while HYAL2 is inversely correlated with the expression of SOX2. The viability of CD133+ treated with 4Mu+chemotherapy (Qx) and the gene expression of HAS, CD44, CD47 and SOX2 decreased significantly ( $p < 0.05$ ). Based on this evidence, we suggest that inhibition of HA could increase the susceptibility of CSCs to Qx, improving their effectiveness and/or preventing tumor recurrence.

**Key words:** lung cancer, cancer stem cells, hyaluronan, resistance to chemotherapy

## Introducción

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (en inglés *non small cell lung carcinoma*, NSCLC) es la causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo y en nuestro país es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres<sup>1</sup>. Al mismo tiempo, aproximadamente el 40% de los pacientes con NSCLC se diagnostican en estadios avanzados. Para la enfermedad avanzada existen diferentes tratamientos según su perfil molecular. Los pacientes con mutaciones *driver* que se benefician de algunas terapias *target* son los menos frecuentes. La quimioterapia a base de platinos en combinación con taxanos o pemetrexed es el régimen de primera línea en los pacientes sin opción *target* o luego de que progresaron a esta. Sin embargo, la mayoría de los pacientes finalmente recaen. Se ha descrito que, dentro del microambiente tumoral, un pequeño subgrupo de células tumorales denominadas células madre tumorales (en inglés *cancer stem cells* (CSCs) con capacidad de autorrenovación y proliferación particularmente diferente<sup>2</sup>, y caracterizadas por la expresión de marcadores como las moléculas CD133, CD44 y aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) y ciertos factores de transcripción como SOX2, KLF4, Nanog y Oct4<sup>3-6</sup> están involucradas en la resistencia a la quimioterapia<sup>7</sup>. Por otra parte, el glicosaminoglicano de matriz extracelular, ácido hialurónico (HA) que regula una amplia variedad de procesos biológicos como el crecimiento, la adhesión, la migración y la diferenciación celular<sup>8</sup> y

es sintetizado por tres isoenzimas, las sintetasas de HA (HAS-1, HAS-2 y HAS-3)<sup>9</sup>, puede interactuar con varios receptores celulares, entre los que se encuentra el CD44, que también se describe como un marcador de CSCs. Ha sido reportado que HA está involucrado en la autorrenovación y el fenotipo de las CSCs<sup>10,11</sup> y la inhibición de CD44 sensibiliza a la resistencia a la quimioterapia con cisplatino al afectar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el carcinoma de cabeza y cuello<sup>12</sup>.

Finalmente, a partir de un análisis de los datos del Atlas del genoma del cáncer (TCGA) de 1000 pacientes con NSCLC encontramos que la expresión de HAS3 se correlaciona fuertemente con los niveles de los factores de transcripción KLF4 y SOX2 involucrados en la adquisición del fenotipo de CSCs. En este trabajo nos proponemos estudiar cómo HA modula el fenotipo de las CSC, y contribuye a la resistencia a la quimioterapia en NSCLC y como su inhibición, utilizando la cumarina 4-metilumbeliferona (4Mu), un agente disponible por vía oral, utilizado como colágeno y suplemento dietario, que bloquea la síntesis de HA mediante la reducción de los niveles de ARN mensajero de las HAS y por el agotamiento de su precursor, el ácido UDP-glucurónico, afecta la susceptibilidad a las terapias convencionales para cáncer de pulmón.

## Materiales y métodos

Para explorar la idea de que HA conduce a un fenotipo de células madre cancerosas o tumorales (CSC), primero estudiamos la presencia de HA utilizando líneas celulares de NSCLC murinas (LLC) y humanas (A549) y en un modelo de tumor subcutáneo experimental, utilizando ratones de la cepa C57. Luego, obtuvimos CSCs a partir de su aislamiento utilizando *beads* magnéticas y marcadores convencionales (CD133). Se midieron los niveles de HA, CD44, HAS3, HAS2 y HYAL en CSCs y no CSCs aisladas mediante qRT-PCR y citometría de flujo (FACS).

Determinamos el fenotipo de CSCs/no CSCs mediante el estudio de su capacidad clonogénica y de crecimiento celular, y con ensayos de formación de esferoides y evaluación de marcadores de *stemness* por qRT-PCR para validar los resultados obtenidos con los datos de pacientes con NSCLC de TCGA.

Para evaluar el rol de HA en la resistencia y mejorar la quimio sensibilidad de las CSC, presumiendo que los niveles de HA están implicados en una característica clave de las CSCs como la quimiorresistencia, utilizamos CSCs y no CSCs aisladas de células murinas LLC. Primero, medimos la susceptibilidad a platinos y taxanos en CSCs y no CSCs mediante determinación de la dosis inhibitoria 50 o IC50 (MTS estándar). Luego, analizamos el impacto de la inhibición de la síntesis de HA mediante el uso de la cumarina 4 metilumbiliferona (4Mu) en estos estudios *in vitro*.

**Análisis estadístico:** Se analizaron los datos obtenidos con las pruebas estadísticas apropiadas, de acuerdo a la variable implicada. Se utilizaron ANOVA con post-test de Tukey, Bonferroni o Kruskal- Wallis o los Test de T de Student o Mann-Whitney para el análisis de resultados. Se usaron programas estadísticos (GraphPad). Se consideraron significativas las diferencias cuando  $p < 0.05$ .

## Resultados

*HA sintasas (HAS), hialuronidasas (HYAL) y la expresión de factores de transcripción de CSC utilizando la base de datos del Atlas del genoma del cáncer (TCGA)*

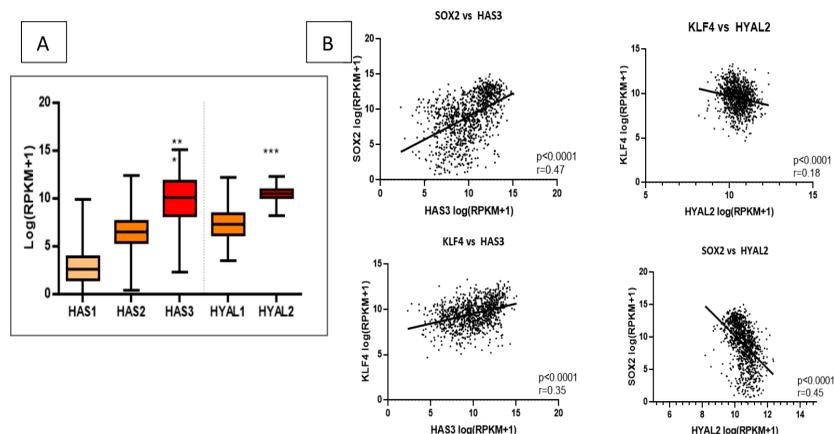
Analizamos utilizando la base de datos (TCGA) la expresión de las enzimas que sintetizan ácido hialurónico (HAS), las que lo degradan (HYAL) y la expresión de factores de transcripción de *cancer stem cells* en 1000 pacientes con NSCLC. Encontramos que hay un aumento en los niveles de expresión de las HAS en estos pacientes (Figura 1A) y que hay una correlación entre la mayor expresión de HAS3 y factores de transcripción característicos de las *cancer stem cells* como KLF4 y SOX2 (Figura 1B).

Al mismo tiempo existe una correlación inversa entre la expresión de HYAL 2 y estos mismos factores de transcripción.

### *Expresión de HA en secciones tumorales y células de cáncer de pulmón*

Primero, evaluamos la expresión de ácido hialurónico en tejido tumoral a partir de la administración de  $2 \times 10^6$  células de adenocarcinoma de pulmón murinas (Lewis Lung Carcinoma; LLC) singeneicas con ratones de la cepa C57. En la Figura 2A se observa una tinción de hematoxilina eosina del tejido tumoral obtenido de los ratones y en la Figura 2B la tinción positiva para ácido hialurónico (en negro) a partir de la incubación de los tejidos con una proteína de unión a HA (*HA binding protein*; HAbp). Para

**Figura 1. A)** Los genes que regulan las sintasas HAS1, HAS2 y HAS3 y las hialuronidasas HYAL1 y HYAL2 se expresan diferencialmente en muestras de tumores humanos de TCGA. Los datos de la secuencia de ARN del paciente se grafican como Log<sub>2</sub> (RSEM) + SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  frente a prueba T normal pareada. **B)** Los gráficos de regresión lineal mostraron que mientras que HAS3 se correlaciona positivamente con los niveles de KLF4 y SOX2, HYAL2 se correlaciona inversamente con la expresión de SOX2



asegurar la especificidad de la tinción se trataron los cortes con hialuronidasa (degrada el ácido hialurónico) y se ve como la marca desaparece (Figura 2C).

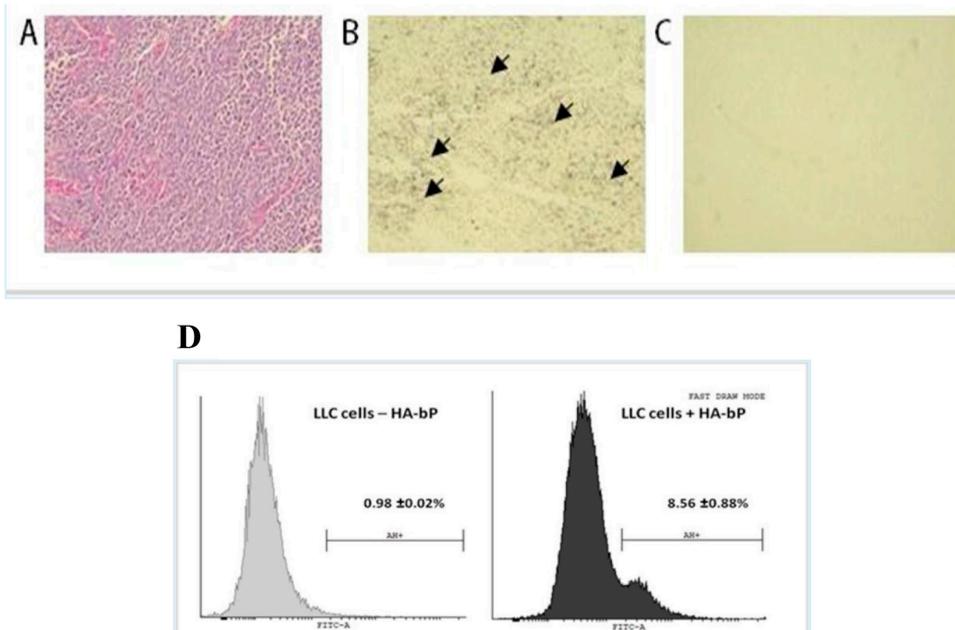
Evaluamos la expresión de HA por citometría de flujo, en la línea celular LLC que utilizamos para desarrollar el tumor (Figura 2D). Encontramos que las células de adenocarcinoma de Lewis murinas expresan alrededor de un  $8.6\% \pm 0.8\%$  de HA en la membrana, indicando que HA que observamos en el tejido es en parte producido por las células tumorales.

Posteriormente analizamos el porcentaje de células CD133+ o CSCs en la población total de células tumorales LLC. Hallamos que aproximadamente el  $6.6\% \pm 0.6\%$  de las células LLC eran positivas para el marcador CD133. Utilizando bolitas magnéticas con capacidad de unir anticuerpos (*beads*) y columnas, marcamos con un anti-prominin-1 (CD133) a todas las células LLC y separamos las células en CD133+ y CD133- y analizamos en todas las poblaciones, la expresión de HA. Notablemente, hallamos que las células

CD133+ expresan significativamente mayores niveles de HA (Figura 3).

Como mencionamos anteriormente, ha sido demostrado que las células CD133 + del NSCLC mostraron capacidades significativamente mayores de autorrenovación y características de resistencia a los fármacos en comparación con las células CD133<sup>-7</sup>. Evaluamos entonces la viabilidad de las células totales o separadas, luego de la exposición con taxanos y platinos, elaborando curvas de dosis respuesta. Teniendo en cuenta que la cumarina 4Mu puede modular la expresión de HA, en este punto entonces tenía sentido analizar si la inhibición de HA, podría mejorar la sensibilidad a la quimioterapia con taxano-platinos. Lo primero que demostramos fue que tanto células tumorales humanas (A549) como células tumorales murinas (LLC) son sensibles a 4Mu a partir de los 0.5Mm con una IC50 de 2.2 mM para A549 o 0.90 mM para LLC mientras que en esas dosis no tiene prácticamente efecto sobre líneas celulares no tumorales, con IC50 de 3 mM para fibroblastos y 4.4 mM para monocitos humanos.

**Figura 2.** HA en cáncer de pulmón. **A)** Tejidos teñidos con H&E representativos de ratones C57 con tumores establecidos por LLC. Ampliación de las regiones tumorales (20 ×) **B)** Cuantificación de HA en muestras tumorales de ratones portadores de tumores LLC mediante histoquímica con HA-bp. Los depósitos de HA se ven en negro (flechas) **C)** La histoquímica con HA-bp en muestras tumorales tratadas con hialuronidasa no mostró depósitos de HA. **D)** HA en células LLC. La evaluación de la expresión de HA en la línea celular LLC se realizó mediante citometría de flujo. Las células LLC se incubaron en presencia de HA-bp biotinilada (+ HA-bp) o no (control; -HA-bp) y luego se tiñeron con avidina-FITC. Las células se fijaron y se sometieron a citometría de flujo (FACS Aria, BD). El porcentaje de células HA + LLC se analizó utilizando el software Cyflogic



Luego aislamos nuevamente las células CD133+ y observamos que eran sensibles a 4Mu con una IC50 de 1mM para las CD133- y una IC50 de 0.6mM para las CD133+ (Figura 4).

Entonces corroboramos si 4Mu es capaz de disminuir la expresión de HA en la línea celular tumoral y encontramos que, a las 48h de tratamiento con el inhibidor, las células presentan significativamente menores niveles de expresión de HA (Figura 5).

Posteriormente incubamos las células con pemetrexed y paclitaxel y hallamos que 4Mu fue capaz de aumentar la susceptibilidad a la quimioterapia, particularmente, de las células CD133+ o CSCs (Figuras 6 y 7).

Luego realizamos ensayos funcionales, evaluando la capacidad de formar colonias (autorrenovación; Figura 8) y de crecer en tres dimensiones, contactando a través de sus moléculas de membrana con otras células (formación de esferoides; Figura 9). Los resultados muestran que las células cuando son tratadas con quimioterapia en presencia de 4Mu, pierden la capacidad clonogénica, demostrando así que nuestra molécula condiciona la habilidad de autorrenovación de las *cancer stem cells* (Figura 8).

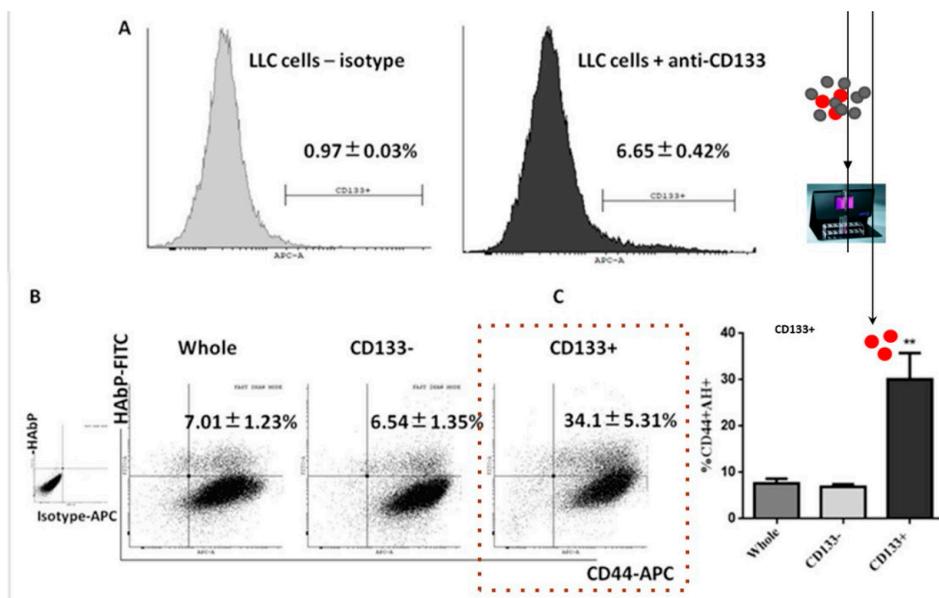
También obtuvimos resultados similares en cultivos 3D formando esferoides, en donde observamos que la combinación de quimioterapia +4Mu induce la pérdida de la capacidad tumorigénica de las CSCs (Figura 9).

Finalmente se validaron los hallazgos de la base de datos del TCGA y para eso, primero analizamos los niveles de expresión de algunos factores de transcripción de CSCs, por el momento utilizando el quimioterápico paclitaxel y hallamos que este taxano tiene una tendencia a aumentar los niveles de estos factores mientras que tratamiento con 4Mu los reduce (Figura 10).

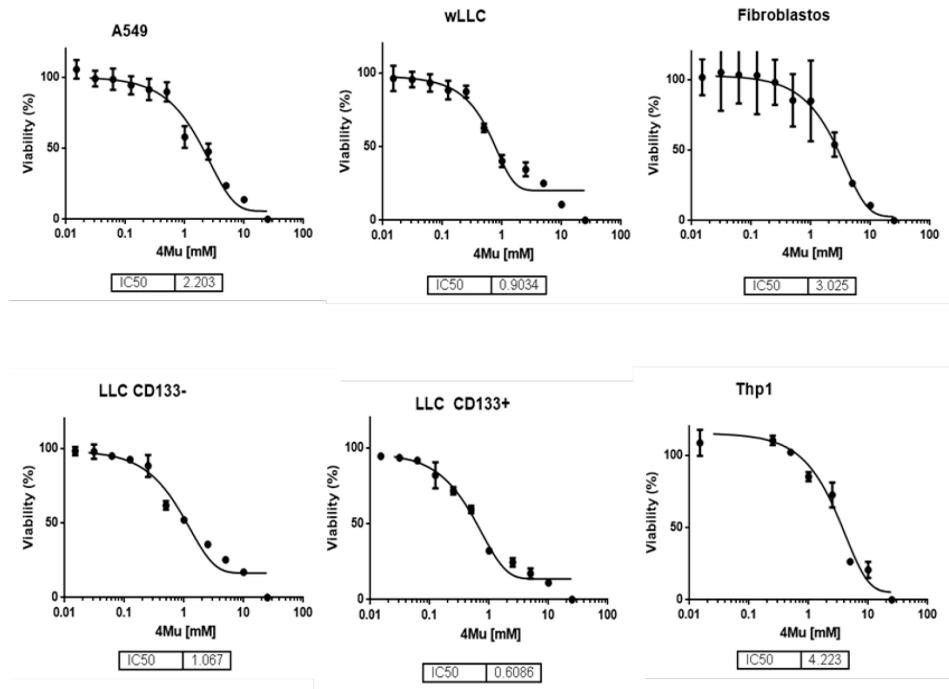
Cuando analizamos los niveles de expresión génica de las enzimas que sintetizan HA en las células tumorales observamos la misma tendencia. No se observaron cambios en los niveles de CD44 que además de ser marcador de CSCs es el principal receptor de HA (Figura 11).

Hallamos que el tratamiento con 4Mu reduce niveles de expresión de factores de transcripción para la adquisición del fenotipo *stem* y los relacionados con la síntesis y expresión de HA, en las células aisladas (Figura 12), ya que los niveles

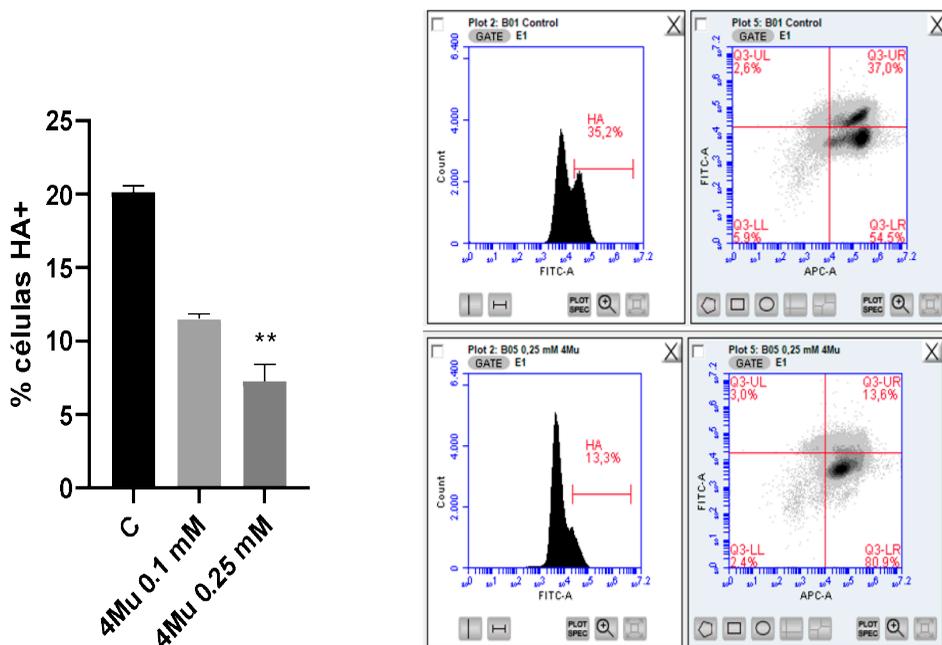
**Figura 3.** Niveles de HA en CSC. A) El porcentaje de células CD133+ se determinó mediante células LLC teñidas con anti-CD133- Aloficocianina (APC) B) Se incubaron células LLC completas, células CD133+ y CD133- aisladas magnéticamente con HAbP biotinilada (+ HAbP) y luego se tiñeron con avidina-FITC. Además, cada grupo se tiñó con anti-CD44-APC. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se sometieron a citometría de flujo (FACS Aria, BD). C) El porcentaje de células completas HA + CD44 + LLC, CD133-HA + CD44 + y CD133 + HA + CD44 + también se analizó utilizando el software Cyflogic



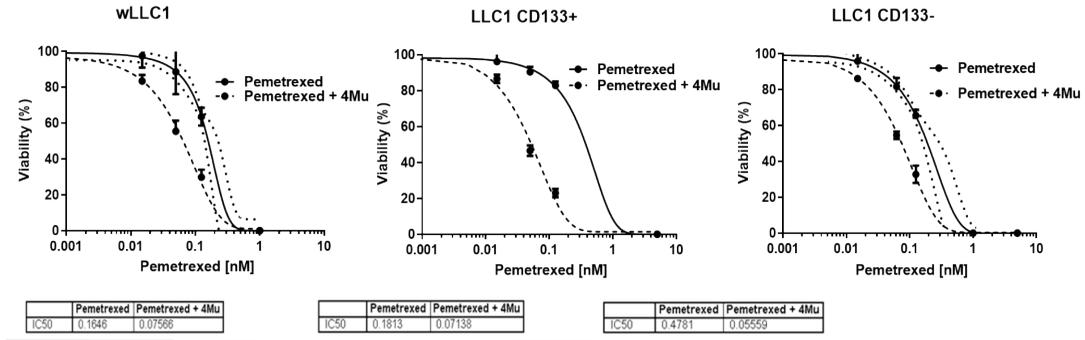
**Figura 4.** La supervivencia de células de cáncer de pulmón humano A549, LLC murino y células no tumorales mostró que las células tumorales son más sensibles a 4Mu.wLLC: células LLC totales (*whole*); Thp1: monocitos humanos



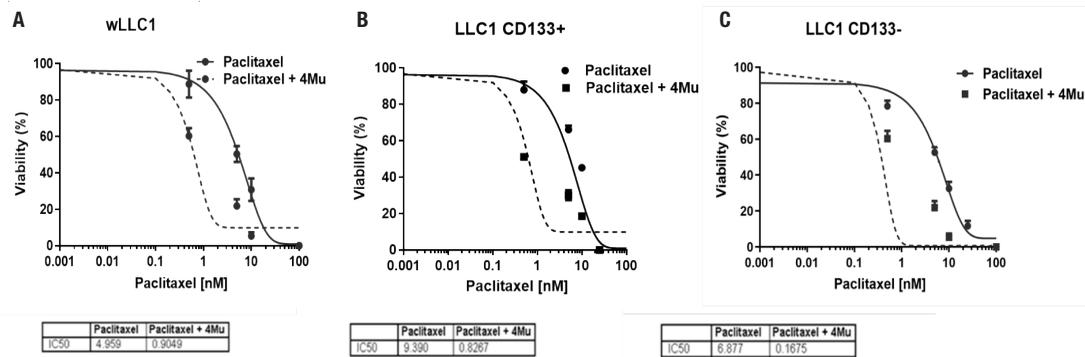
**Figura 5.** Niveles de HA en LLC. Se incubaron células LLC con HAbP biotinilada (+ HAbP) y luego se tiñeron con avidina-FITC. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se sometieron a citometría de flujo (FACS Aria, BD). El porcentaje de células HA+ se analizó utilizando el *software* Cyflogic. \*\*p<0.01 Kruskal-Wallis vs. control



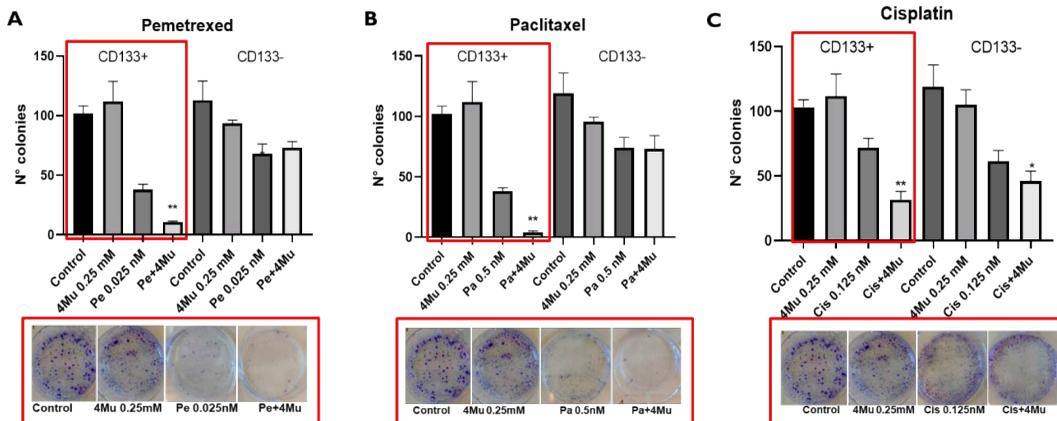
**Figura 6.** 4Mu sensibiliza las células de NSCLC a la quimioterapia basada en antimetabolitos y taxanos. Supervivencia de células LLC, CD133- o CD133 + tratadas con 0.25 mM 4Mu y 0.01 nM, 0.05 nM o 0.1 nM de pemetrexed (Pe). Los gráficos muestran uno de los dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. \*p <0.05 Pe frente a Pe + 4Mu (ANOVA de dos vías)



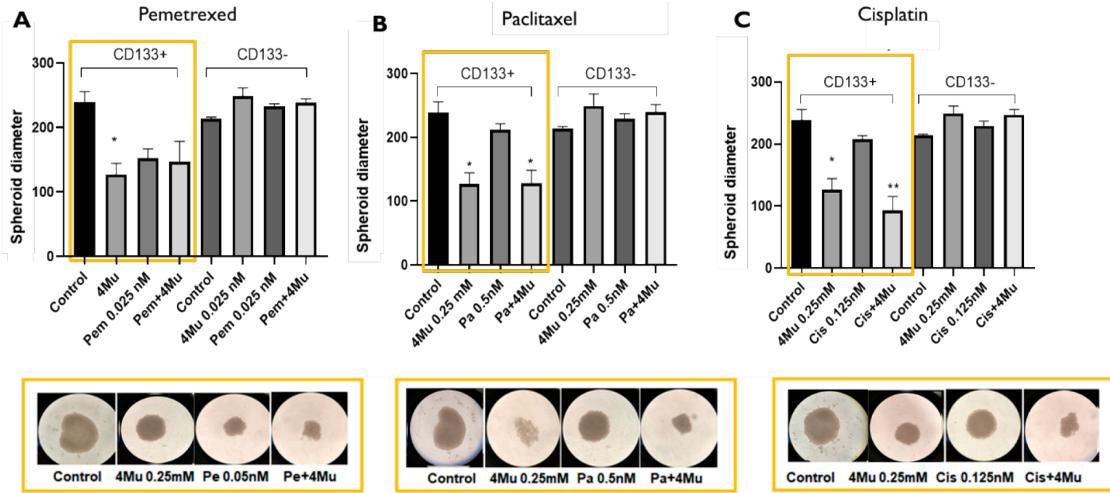
**Figura 7.** 4Mu sensibiliza las células de NSCLC a la quimioterapia basada en antimetabolitos y taxanos. Supervivencia de células LLC (A), CD133- (B) o CD133 + completas (C) tratadas con 4Mu 0.25 mM y Paclitaxel (Pa) 0.5 nM, 5 nM o 10 nM. \*p <0.05 wLLC Pa frente a Pa + 4Mu (ANOVA de dos vías); \*\*\*p <0.001, LLC/CD133- y CD133 + Pa frente a Pa + 4Mu (ANOVA de 2 vías)



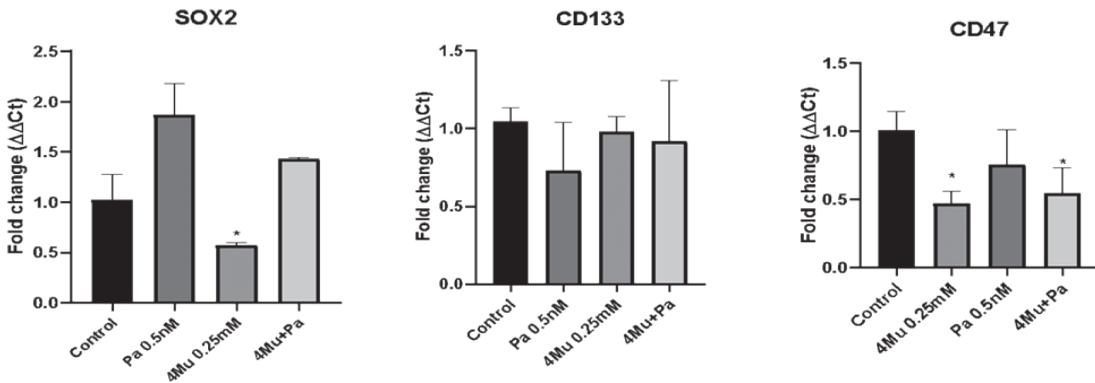
**Figura 8.** Se realizaron ensayos de formación de colonias a partir de clones de células LLC CD133+ y CD133-, tratadas o no con 4Mu y/o **A)** Pemetrexed, **B)** Paclitaxel, **C)** Cisplatino. Brevemente, se sembraron 500 células tratadas por 72h con Qx y/o 4Mu en pocillos de una placa p6 durante 7 días, y luego se fijaron con metanol y se tiñeron con violeta cristal. Se cuantificó el número de colonias. \*p <0.01, \*\*p <0.05 (prueba de Kruskal Wallis)



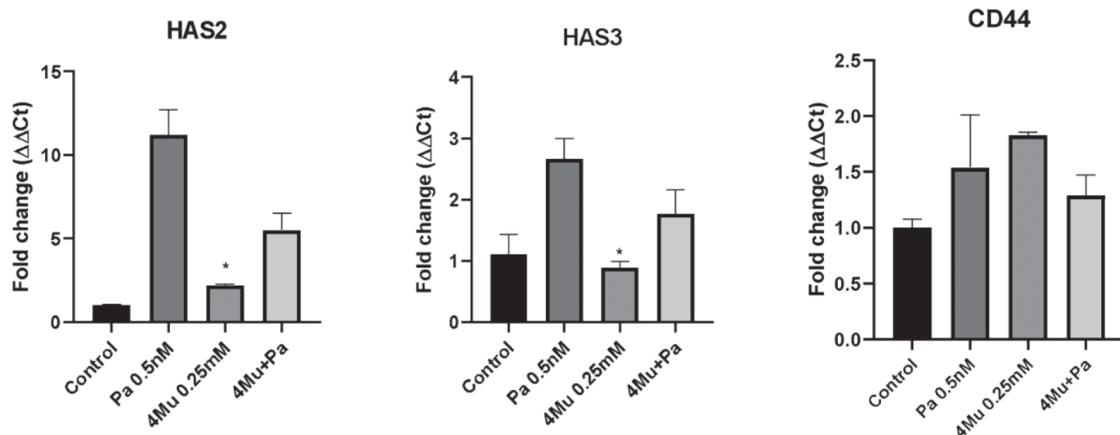
**Figura 9.** Ensayo de esferoides tridimensionales. Células CD133+ y CD133- tratadas o no con 4Mu y/o **A)** Pemetrexed, **B)** Paclitaxel, **C)** Cisplatino. Las células se sembraron en una placa p96 (5x10<sup>3</sup> células / pocillo) recubierta con agarosa al 1% y se incubaron durante al menos 7 días, hasta que se obtuvo un solo esferoide homotípico por pocillo. El diámetro de los esferoides se calculó utilizando el software Image J (NIH). \*p < 0.01, \*p < 0.05 (prueba de Kruskal Wallis).



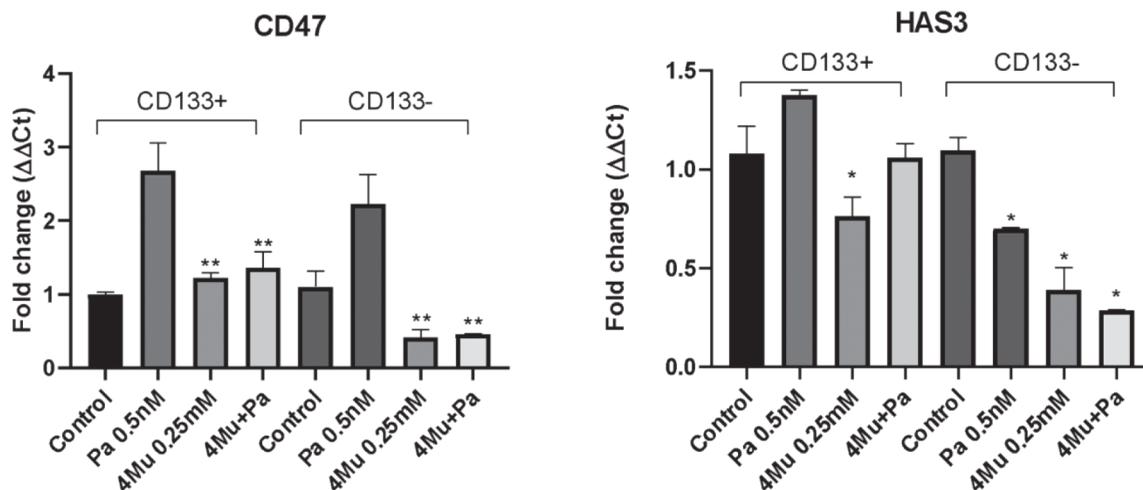
**Figura 10.** El tratamiento con 4Mu reduce los niveles de expresión de factores de transcripción para la adquisición del fenotipo stem en las células tumorales. Niveles de expresión génica de SOX2, CD133, CD47 en células LLC no tratadas o tratadas con 4Mu y/o Paclitaxel durante 24 h. Prueba de Kruskal Wallis \*p < 0.05



**Figura 11.** El tratamiento con 4Mu reduce los niveles génica de las enzimas que sintetizan HA en las células LLC. Niveles de expresión génica de HAS2, HAS3 y CD44 en células LLC no tratadas o tratadas con 4Mu y/o Paclitaxel durante 24 h. Prueba de Kruskal Wallis \*p < 0.05.



**Figura 12.** Niveles de expresión génica de CD47, HAS3 en células CD133+ y CD133- aisladas a partir de células LLC. Lu-ego fueron no tratadas o tratadas con 4Mu y/o Paclitaxel durante 24 h. Prueba de Kruskal Wallis \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



de expresión de CD47 y HAS3 también disminuyen en las CD133+ cuando estas son tratadas con paclitaxel en presencia de 4Mu.

## Discusión

Basándonos en trabajos previos que describieron que los niveles de todos los GAGs se encuentran elevados en tejidos tumorales de pacientes con cáncer de pulmón<sup>13</sup> en primer lugar, analizamos la presencia de HA en tumores generados en ratones con la línea celular de NSCLC, LLC y hallamos mediante histoquímica que los tumores experimentales expresan HA. Ha es un GAG de matriz extracelular, por lo que muchas de las células que forman parte del TME (células endoteliales, fibroblastos asociados al tumor, pericitos, células inmunitarias y *cancer stem cells*) pueden expresarlo<sup>14</sup>. Mediante citometría de flujo, encontramos que las células murinas LLC producen HA, lo que sugiere que al menos en parte, HA observado en los tejidos es producido por células cancerosas.

Cuando realizamos el análisis de expresión génica de las enzimas involucradas en el metabolismo y el control de la síntesis de HA en muestras de pacientes con cáncer de pulmón, a partir de la base de datos TCGA, encontramos que los niveles de expresión de HAS3 y de la hialuronidasa HYAL2 se encuentran significativamente elevados en los tumores respecto al tejido normal adyacente.

Analizamos también si existía correlación entre estas enzimas y factores de transcripción asociados al fenotipo de las CSCs, y hallamos que la expresión de HAS3 se correlaciona fuertemente con los niveles KLF4 y SOX2, mientras que HYAL2 correlaciona de manera negativa con los factores de transcripción. A partir de estos datos medimos nuevamente por citometría de flujo los niveles de HA de las células LLC que fueron separadas mediante columnas magnéticas en CD133+ y CD133-. Observamos una alta expresión de HA y su receptor CD44 en las células CD133+ en comparación con células CD133-, lo que demuestra una expresión diferencial de HA en la población de CSCs de la línea LLC.

La validación de los datos en nuestra línea celular mostró además que la exposición a quimioterapia con el taxano paclitaxel aumenta la expresión de genes SOX2 y CD47, relacionados con el fenotipo de CSC. Este resultado podría correlacionarse con la resistencia observada en los pacientes tras la quimioterapia<sup>15</sup>. Además, evaluamos el efecto de la inhibición de la síntesis del HA mediante el tratamiento con la cumarina 4Mu sobre estos mismos genes, y observamos que es capaz de modificar la expresión génica de esos factores, así como también de las sintasas HAS2 y HAS3.

Realizamos posteriormente ensayos funcionales para evaluar el efecto de la combinación de la quimioterapia con 4Mu en las células LLC separadas según la presencia del marcador CD133,

teniendo en cuenta que se ha reportado que HA está involucrado en la autorrenovación y fenotipo de las CSCs<sup>10,11</sup>. Observamos una disminución significativa de la viabilidad, la clonogenicidad (capacidad de formar colonias) y la tumorigénesis (esferoides) al tratar las células LLC CD133+ con 4Mu combinado con la quimioterapia con los taxanos pemetrexed y paclitaxel, así como también con cisplatino.

Es necesario ampliar el análisis acerca de los niveles de expresión de otros factores de transcripción esenciales para el perfil de CSCs como KLF4, y explorar los efectos de combinar la cumarina 4Mu con los otros agentes quimioterápicos utilizados en la práctica clínica, pero a partir de estos resultados podemos sugerir que modular la expresión de HA podría modificar el fenotipo de las CSC, volviéndolas más susceptibles a la quimioterapia. Además de mejorar su eficacia, esta estrategia podría prevenir la recurrencia del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

**Agradecimientos:** Agradecemos a Ana Bezazián, María José Cantero, Esteban Fiore, Plácida Baz, Ariel Billordo, Paula Roselló, Franco Puebla, Santiago Cabrera, Anabel Cañete y Guillermo Gastón por su colaboración y asistencia técnica profesional. Este trabajo fue apoyado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) a través de los PICT 2018-3804 (MM), PICT 2019-4446 (MR), y por la Universidad Austral a través de la 16ava Convocatoria de Subsidios Internos (MM/MADG).

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71:209-49.
2. Greaves, M. Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481:306-13.
3. Codd AS, Kanaseki T, Torigo T, Tabi Z. Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology* 2018; 153: 304-14.
4. Skirecki T, Hoser G, Kawiak J, Dziedzic D, Domagala-Kulawik J. Flow cytometric analysis of CD133- and EpCAM-positive cells in the peripheral blood of patients with lung cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014; 62:67-75.
5. Singh S, Chellappan S. Lung cancer stem cells: Molecular features and therapeutic targets. *Mol Aspects Med* 2014; 39: 50-60.
6. Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 2009; 18:1127-34.
7. Chen Y-C, Hsu H-S, Chen Y-W, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 2008; 3:e2637.
8. Stern R. Hyaluronan in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 237.
9. Weigel PH, DeAngelis PL. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem* 2007; 282:36777-81.
10. Bourguignon LYW, Peyrollier K, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 17635-51.
11. Bourguignon LYW, Wong G, Earle C, Chen L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 2012; 287: 32800-24.
12. Shigeishi H, Biddle A, Gammon L. Maintenance of stem cell self-renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3beta influenced by CD44 and RHAMM. *Stem Cells* 2013; 31:2073-83.
13. Li G, Li L, Joo EJ, et al. Glycosaminoglycans and glycolipids as potential biomarkers in lung cancer. *Glycoconj J* 2017; 34:661-9.
14. Spinelli FM, Vitale DL, Sevic I, Alaniz L. Hyaluronan in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1245:67-83.
15. Cui H, Arnst K, Miller DD, Li W. Recent advances in elucidating paclitaxel resistance mechanisms in non-small cell lung cancer and strategies to overcome drug resistance. *Curr Med Chem* 2020; 27:6573-95.