



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio de las bases moleculares de la respuesta a la hipoxia

Alumna: Almudena Pérez Camacho

Junio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA
Trabajo Fin de Grado

Estudio de las bases moleculares de la respuesta a la hipoxia

Almudena Pérez Camacho

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Almudena', with a large, stylized loop at the end.

Jaén, Junio 2014

ÍNDICE

1. RESUMEN (ABSTRACT)	Página 3
2. INTRODUCCIÓN	Página 4
3. SITUACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS ASOCIADAS A LA HIPOXIA	Página 5
4. HIF-1, PRINCIPAL RESPONSABLE DE LA RESPUESTA A LA HIPOXIA	Página 6
4.1. Estructura de HIF-1	Página 7
4.2. Principales mecanismos de regulación de HIF-1 α	Página 8
4.2.1. <i>Regulación transcripcional de HIF-1α</i>	Página 8
4.2.2. <i>Regulación post-transcripcional de HIF-1 α</i>	Página 9
4.2.3. <i>Regulación traduccional de HIF-1α</i>	Página 10
4.2.4. <i>Regulación post-traduccional de HIF-1α</i>	Página 14
4.2.4.1. Hidroxilación de HIF-1 α	Página 14
4.2.4.2. Acetilación de HIF-1 α	Página 22
4.2.5. <i>Regulación de la actividad transcripcional de HIF-1α</i>	Página 23
5. HIF-1, UNA DIANA TERAPÉUTICA	Página 24
6. CONCLUSIÓN	Página 28
7. BIBLIOGRAFÍA	Página 29

1. RESUMEN

ANTECEDENTES: Los organismos aeróbicos requieren oxígeno para producir energía. La hipoxia, definida como la reducción de la presión parcial de oxígeno en los tejidos, órganos o sistemas, tiene lugar en diferentes situaciones fisiológicas (ej. nacimiento) o patológicas (enfermedades cardiovasculares, cáncer...) y supone un estrés ante el que la célula debe responder en un intento de adaptar el aporte de oxígeno a las demandas bioenergéticas, metabólicas y redox. El principal responsable de la puesta en marcha de esta respuesta adaptativa es el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1), una proteína cuya expresión y actividad está sometida a finos mecanismos de regulación y que induce la síntesis de más de 100 genes diana.

OBJETIVOS: En este trabajo se ha pretendido revisar los mecanismos moleculares que participan en la adaptación a la hipoxia y, más concretamente, en la respuesta del factor de transcripción HIF-1, principal responsable de la misma. Dada la importancia patológica de los procesos hipóxicos, la revisión termina analizando la importancia de HIF-1 como diana terapéutica, un campo de intensa investigación en el momento actual.

ABSTRACT

BACKGROUND: *Aerobic organisms need oxygen to produce energy. The reduction in oxygen tension, hypoxia, is involved in different physiological (e.g. birth) and pathological situations (cardiovascular diseases, cancer...), and entail a stress situation at which the cell need to respond in order to readjust the oxygen supply to the bioenergetics, metabolic and redox demands. The main responsible of triggering this adaptive response is the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a highly regulated protein that activates over a hundred of target genes.*

AIMS: *In this context, we aimed to examine the molecular mechanisms involved in the adaptation to hypoxic situations, and more precisely, in the response of HIF-1, the key regulator of that response. Considering the involvement of hypoxia in several pathologies, the review finishes by analyzing the importance of HIF-1 as a therapeutic target.*

2. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es esencial para los organismos aeróbicos, ya que sin él es imposible la supervivencia y la producción de energía. Estos organismos y sus células han desarrollado numerosas respuestas adaptativas que hacen posible la supervivencia en condiciones con poco oxígeno.

La hipoxia se define, por lo tanto, como la disminución de la presión parcial de oxígeno en tejidos, órganos y sistemas. En las tablas 1 y 2 se recogen valores de presión parcial de oxígeno en diferentes órganos y tejidos así como los términos empleados para describir las situaciones en las que se produce una disminución de dicha presión (Koh et Powis, 2012).

Órgano	Normal pO_2 (mmHg)	% O_2
Tráquea	150	19.7
Alveolos	110	14.5
Sangre arterial	100	13.2
Sangre arterial pulmonar	40	5.3
Cerebro	35	4.4
Tejido intestinal	58	7.6
Hígado	41	5.4
Riñón	72	9.5
Músculo	29	3.8
Médula ósea	49	6.4

Tabla 1. Presiones de oxígeno fisiológico en una selección de tejidos humanos normales (Koh y Powis, 2012).

Condición	pO_2 (mmHg)	% O_2
Normoxia (ambiente)	159	21%
Hipoxia fisiológica	15-68	2% - 9%
Hipoxia leve	8-38	1% - 5%
Hipoxia	< 8	< 1%
Anoxia	< 0.08	< 0.1%

Tabla 2. Definiciones usadas frecuentemente para describir disminución de la presión de oxígeno (Koh y Powis, 2012).

3. SITUACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS ASOCIADAS A LA HIPOXIA

La reducción de la presión parcial de oxígeno ocurre tanto en situaciones fisiológicas (parto y adaptación a elevadas altitudes) como en situaciones patológicas. De hecho, la hipoxia se asocia a patologías como el cáncer, enfermedades pulmonares y cardiovasculares, traumas físicos e inflamaciones. Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2012 (Figura 1), las enfermedades con un porcentaje mayor de muerte en España (enfermedades del sistema circulatorio 30,3%; tumores 27,5% y enfermedades del sistema respiratorio 11,7%) están asociadas a situaciones de hipoxia.

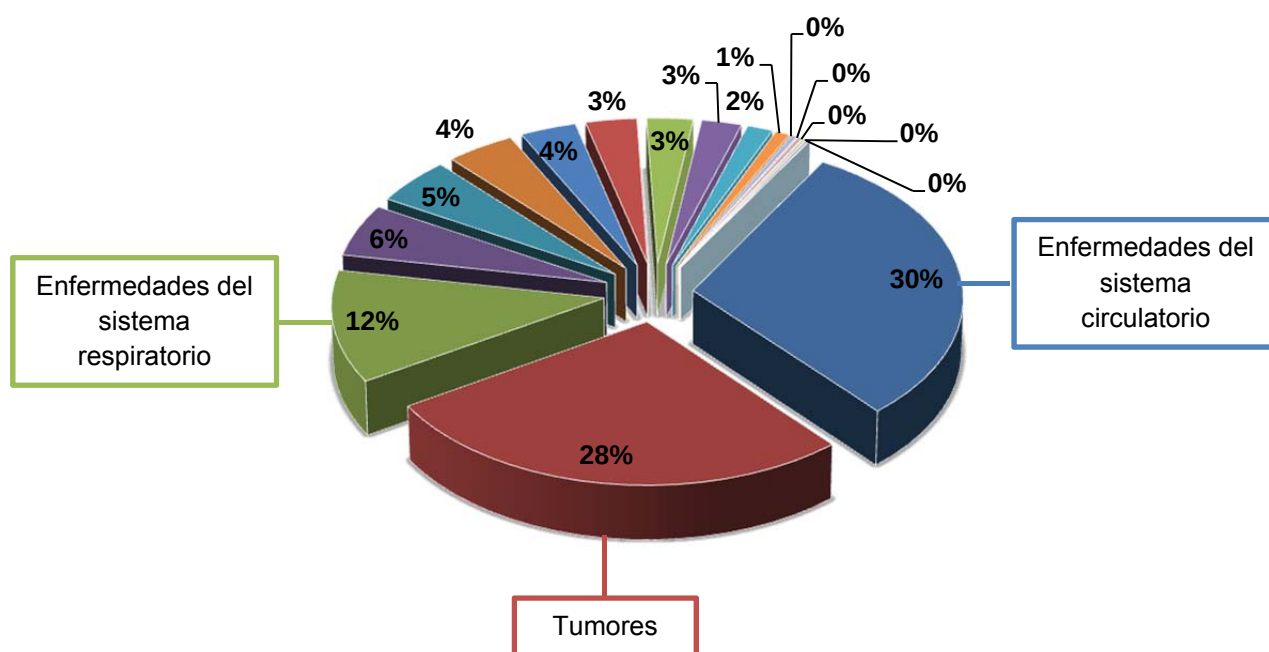


Figura 1. Porcentaje de causas de muerte por enfermedad.

- Enfermedades del sistema respiratorio (12%).
- Tumores (28%).
- Enfermedades del sistema circulatorio (30%).
- Enfermedades del sistema nervioso y de los órganos de los sentidos (5,5%).
- Enfermedades del sistema digestivo (4,9%).
- Trastornos mentales y del comportamiento (4,3%).
- Causas externas de mortalidad (3,5%).
- Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas (3,2%).
- Enfermedades del sistema genitourinario (2,9%).
- Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio (2,5%).
- Enfermedades infecciosas y parasitarias (1,6%).
- Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo (0,9%).
- Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos y trastornos que afectan al mecanismo de la inmunidad (0,4%).
- Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (0,3%).
- Afecciones originadas en el periodo perinatal (0,2%).
- Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías (0,2%).

- Embarazo, parto y puerperio (0%).

4. HIF-1, PRINCIPAL RESPONSABLE DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA A LA HIPOXIA

Todas las células y organismos tienen la habilidad de adaptarse a la hipoxia crónica o transitoria. Estos cambios de adaptación incluyen, a nivel del organismo completo, la hiperventilación y un incremento de la angiogénesis y la eritropoyesis. A nivel celular, la adaptación implica un incremento en el consumo de glucosa, un cambio en la obtención de energía metabólica, del uso de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia, y la expresión de proteínas relacionadas con la supervivencia celular (Semenza, 1998).

La respuesta a la hipoxia a nivel celular se regula, principalmente, mediante el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1), que es esencial en el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno. De hecho, aunque existen otras dos isoformas descritas con posterioridad (HIF-2 y HIF-3; Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997, 1998; Gu et al., 1998), HIF-1, es el más importante en la inducción de algunos genes que facilitan la adaptación y la supervivencia de las células y de los organismos completos cuando se produce el cambio desde condiciones de normoxia (~21% O₂) a condiciones de hipoxia (Wang et al., 1995).

Así, centrándonos en HIF-1, en respuesta a las condiciones de hipoxia, este factor de transcripción se une a unas secuencias consenso del ADN 5' – (A/G) CGTG – 3', denominadas elemento de respuesta a hipoxia (HRE), que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que participan en la respuesta adaptativa a la hipoxia. De hecho, HIF-1 se descubrió gracias a la identificación del HRE en la eritropoyetina (EPO), una hormona que estimula la proliferación de eritrocitos y la transcripción en condiciones de hipoxia (Goldberg et al., 1988; Semenza et al., 1991).

Se cree que este factor de transcripción activa entre 60 y 100 genes diana entre los que se encuentran además de la EPO, la óxido nítrico sintasa, varias enzimas glicolíticas como la 3-fosfoglicerato quinasa y diversos factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor Flt-1. Incluso,

algunos autores estiman que aproximadamente del 1 al 5% del genoma es regulado por la hipoxia (Semenza, 2003; Görlach, 2009).

4.1. Estructura de HIF-1

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico formado por dos subunidades: una subunidad α (HIF-1 α) y una subunidad β (HIF-1 β) también conocida como ARNT (translocador del receptor hidrocarburos de arilo), ambas pertenecientes a la familia de los factores de transcripción con dominios bHLH/PAS (dominio hélice básica-bucle-hélice homólogo a Per-ARNT-Sim). HIF-1 β se expresa de forma constitutiva en el núcleo, por lo tanto, la actividad del complejo HIF-1 es principalmente mediada por la estabilidad de la subunidad HIF-1 α (Wang et al., 1995).

Estructuralmente, el gen que codifica para la proteína de HIF-1 α (826 aminoácidos) se encuentra en el cromosoma 14, y está compuesto por 15 exones en una región de 53 Kb de ADN genómico.

Los dominios bHLH y PAS las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β , localizados en el extremo N-terminal, son determinantes para su unión al ADN en los HRE (Figura 2). Para que esto sea posible es necesaria la formación de un heterodímero entre ambas subunidades (Wang et al., 1995; Semenza et al., 1996; Crews et al., 1998).

HIF-1 α presenta también, en la región C-terminal, dos dominios de transactivación, un dominio N-terminal (N-TAD) y otro dominio C-terminal (C-TAD). Se ha observado que el dominio C-TAD interacciona con coactivadores como CBP/p300 activando así la transcripción de los genes diana (Lando et al., 2002a). En ambos dominios de transactivación se encuentran dos señales de localización nuclear (NLSs).

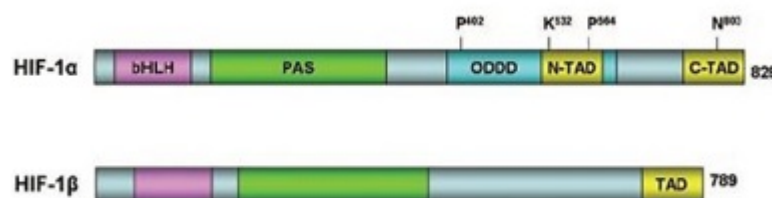


Figura 2. Estructura de HIF-1 α y HIF-1 β . Los residuos de prolina del dominio ODD (ODDD) están conservados en HIF-2 α y HIF-3 α . HIF-1 α contiene dos dominios de transactivación (C-TAD y N-TAD), mientras que HIF-1 β solo presenta un TAD. La Lys532 y la Asn803 de HIF-1 α se han señalado por su importancia en la regulación. El número total de aminoácidos de cada subunidad aparece al final de la estructura del dominio (Adaptada de Ke y Costa, 2006).

Además de lo mencionado anteriormente, HIF-1 α posee un único dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD). El dominio ODD está constituido por varios subdominios que se han estudiado ampliamente para entender el mecanismo de regulación de la estabilidad de HIF – 1 α dependiente de oxígeno que se explicará en el siguiente apartado.

4.2. Principales mecanismos de regulación de HIF-1

Como ocurre con todas las proteínas que desempeñan una función celular importante, la expresión y la actividad de HIF-1, están sometidas a complejos mecanismos de regulación que se dirigen, en este caso concreto, principalmente a la subunidad HIF-1 α . Existen diferentes tipos de tipos de regulación, entre los que se incluyen la regulación transcripcional, post – transcripcional, traduccional, y post – traduccional. Dentro de este último grupo hay que destacar los mecanismos de hidroxilación, ubiquitinación y acetilación, que participan en el control de la degradación de HIF-1 α , de forma dependiente de oxígeno en el proteasoma, que es el mecanismo de regulación más importante (Epstein et al., 2001; Lando et al., 2002a).

4.2.1. Regulación transcripcional de HIF-1 α

Los primeros trabajos realizados sobre HIF-1 α atribuían nula o escasa importancia a su regulación transcripcional. Sin embargo, estudios posteriores demostraron la existencia de regulación a este nivel, tanto en condiciones de hipoxia como en condiciones de normoxia (Wiener et al., 1996; Yu et al., 1998; Koshikawa et al., 2009).

En estos estudios se observó que el promotor del gen HIF-1 α contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción, que podrían participar en la transcripción constitutiva (Sp1) o inducible (AP-1, NF- κ B, Egr1) de dicho gen (Minet et al., 1999; Koshikawa et al., 2009). Diversas investigaciones han demostrado la participación de las rutas PI3K/Akt y proteína quinasa C (PKC) en la activación de la transcripción de HIF-1 α en respuesta a diferentes estímulos como tratamiento con TNF α /IL-4 (Jing et al., 2011), producción de ROS (Koshikawa, 2009) o hipoxia (Kim

et al., 2008), entre otros. Estos resultados parecen sugerir que la regulación transcripcional de HIF-1 α actúa, en determinados casos y, dependiendo del tipo celular, potenciando la regulación a otros niveles.

Por otra parte, la presencia de HREs en el promotor de HIF-1 α sugiere la existencia de un mecanismo de autorregulación positiva en el que HIF-1 promueve la síntesis de su subunidad inducible (Minet et al., 1999; Gonsalves et al., 2010).

4.2.2. Regulación post-transcripcional de HIF-1 α

Entre la transcripción del pre-ARNm que tiene lugar en el núcleo y la traducción del ARNm en los polirribosomas, los transcritos pueden sufrir corte y empalme, maduración, almacenamiento y degradación.

Estos procesos están regulados por la interacción de determinadas secuencias del ARNm, localizadas en las regiones 5' y 3'UTRs, o en la región codificante, con diversas proteínas como RBPs (*RNA-binding proteins*, proteínas de unión al ARN) o con ARNs reguladores como los microARN (miARN) y los ARNs antisentido.

La región 3'UTR de HIF-1 α es particularmente rica en AU y presenta numerosos motivos AUUUA susceptibles de unir RBPs que regulan la estabilidad y la traducción de este ARNm. Dentro del grupo de proteínas RBP destacan la proteína HuR y la proteína de unión a tramo de polipirimidina (PTB). Estas proteínas actúan regulando el nivel de traducción del ARNm de HIF-1 α pero además, parecen disminuir su estabilidad (Figura 3) (Galbán y Gorospe, 2009) .

En este mismo sentido, los miARN, pequeños ARNs no codificantes de unos 20-25 nucleótidos, regulan la expresión de los genes post-transcripcionalmente y que juegan un papel importante en diferentes procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis celular (Bartel, 2004; Shivdasani, 2006), mediante la inhibición de la traducción o la inducción de la degradación del ARNm, a través de la formación de complejos ARNm-miARN.

Se han descrito diferentes miARN, tales como el miR-107 (Dolt et al., 2006) o miR-145-3p (Camps et al., 2014), capaces de desestabilizar el ARNm de HIF-1 α . Además, existen gran cantidad de estudios que sugieren que alteraciones en la expresión de estos miARN tienen una gran importancia en la regulación de la

respuesta celular a la hipoxia (Kulshreshtha et al., 2008; Chan et al., 2010; Loscalzo, 2010).

Por otra parte, la estabilidad del ARNm de HIF-1 α está regulada por un transcrito antisentido denominado aHIF, que fue descubierto inicialmente por Uchida et al. (2004). Este transcrito es complementario a la región UTR en 3' del ARNm de HIF-1 α e induce su desestabilización. Este hecho se podría explicar también mediante la formación de un RNA de doble cadena (aHIF-HIF-1 α 3'UTR) que genera sitios de reconocimiento para proteínas desestabilizadoras o que impide la unión de proteínas estabilizadoras. Además, la presencia de un HRE en el promotor de este RNA antisentido sugiere la existencia de un mecanismo de control negativo en el que la actividad transcripcional HIF-1 induce la expresión de aHIF originando la disminución del nivel de ARNm de HIF-1 α , y por consiguiente, de la proteína HIF-1 α (Uchida et al., 2004).

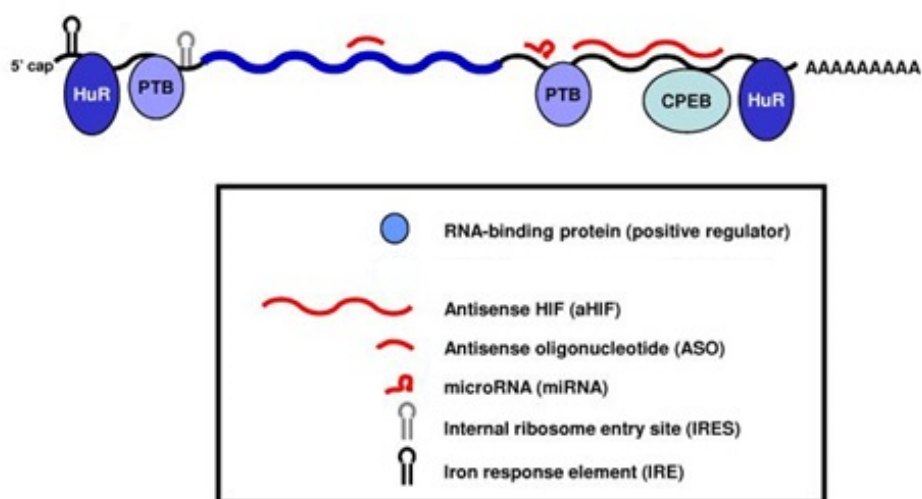


Figura 3. Representación esquemática del ARNm de HIF-1 α , y algunos de elementos de unión (Adaptada de Galbán y Gorospe, 2009).

4.2.3. Regulación traduccional de HIF-1 α

El principal mecanismo de regulación traduccional es la ruta metabólica de señalización PI3K/Akt/mTOR. Es una ruta compleja, implicada en el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y como consecuencia de ello, en el cáncer. La activación de esta ruta (Figura 4) comienza en la membrana celular, donde una señal activa la proteína fosoinositol 3-quinasa (PI3K). Esta activación puede

producirse a través de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa. Una vez activada, PI3K cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) generando fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$). El $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, se une a otra proteína quinasa denominada PDK-1 (quinasa-1 dependiente de $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$) que, a su vez, actúa sobre la quinasa Akt (también llamada proteína quinasa B, PKB), activándola mediante fosforilación. La proteína Akt, una vez activada es la responsable, como intermediaria que es, de activar otras proteínas, algunas de ellas quinasas como la diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR), que es una proteína serina/treonina quinasa altamente conservada perteneciente a la familia de quinasas similares a la PI3K (Keith y Schreiber, 1995). De hecho, Akt es la principal, aunque no la única, intermediaria entre PI3K y mTOR. mTOR es un importante regulador del crecimiento celular y del metabolismo, principalmente porque controla, entre otros, la activación del factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E (eIF-4E) y la inactivación de su inhibidor, la proteína 1 de unión al factor eIF-4E (4E-BP1) favoreciendo, por tanto, el proceso de traducción de diversas proteínas (Laughner et al., 2001), entre ellas de HIF-1 α tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia (Zundel et al., 2000; Pore et al., 2006; Xue et al., 2011; Choi et al., 2013).



Figura 4. Ruta metabólica de señalización de PI3K/Akt/mTOR (Adaptada de Prabhakar y Semenza, 2012).

Como ejemplo de la implicación de la ruta PI3K/Akt en la regulación transcripcional y traduccional de HIF-1 α , así como de la importancia de los miRNA en la regulación de la expresión génica, vamos a comentar una publicación de Sun et al., (2013) en la cual se analiza la posible implicación de la inducción de HIF-1 α , a través de la ruta de señalización PI3K/Akt, en el efecto protector del daño por hipoxia del miR-494.

Para detectar el efecto que miR-494 podría tener sobre la expresión de HIF-1 α , se transfectan las células hepáticas L02 para que dicho miARN se sobreexpresa (Figura 5). Además, se analiza también como varía la expresión de un gen diana de HIF-1, la hemo oxigenasa-1 (HO-1).

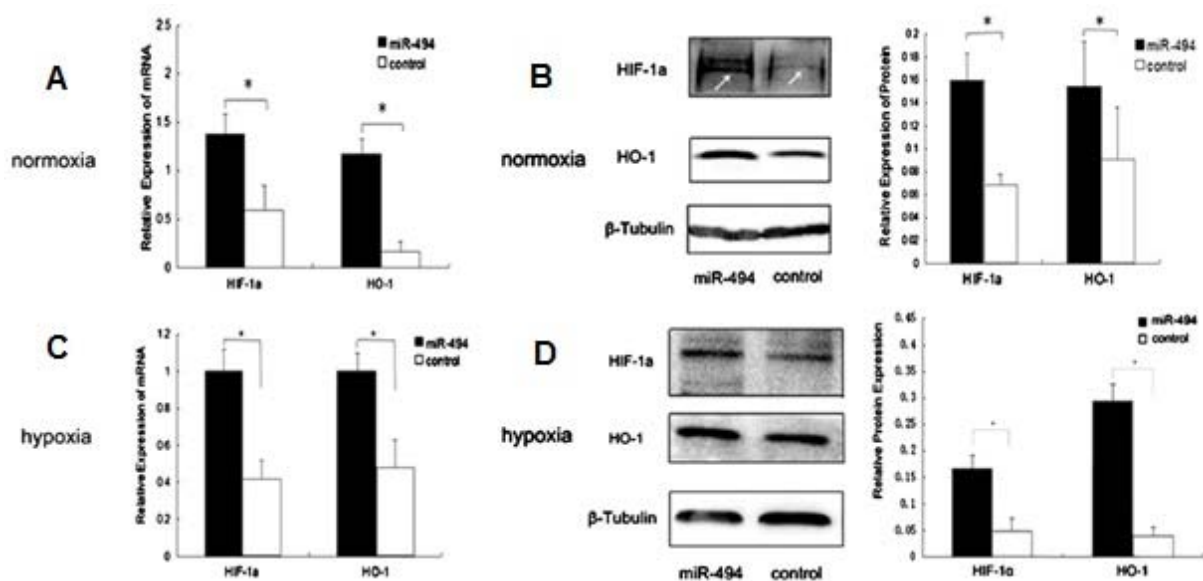


Figura 5. La sobre expresión de miR-494 incrementa la expresión de HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia y normoxia. A-B) Expresión de HIF-1 α y HO-1 en células hepáticas L02 en condiciones de normoxia. C-D) Expresión de HIF-1 α y HO-1 en células hepáticas L02 condiciones de hipoxia. * $p < 0.05$ (Sun et al., 2013).

Podemos observar cómo, en condiciones de normoxia, la sobreexpresión de miR-494 incrementa significativamente los niveles de ARNm y proteína HIF-1 α , así como del gen diana de HIF-1, HO-1. Para evaluar el efecto de miR-494 sobre HIF-1 α en condiciones de hipoxia, las células fueron sometidas a hipoxia (1% de O₂) durante 8 horas. Los resultados muestran que la sobreexpresión de miR-494 incrementa los niveles de HIF-1 α y HO-1 de forma significativa.

Posteriormente, se realiza otro ensayo para comprobar que la ruta PI3K/Akt está realmente implicada. Para ello, además de tener el grupo control y el grupo de

células trasfectadas con el miR-494, se realiza un tercer grupo que también presenta el miARN pero que, además, es tratado con LY294002 (inhibidor de PI3K). El fin de este inhibidor es bloquear la ruta de señalización de PI3K/Akt. De esta forma, si miR-494 está implicado en dicha ruta, los niveles de expresión de HIF-1 α y HO-1 estarán disminuidos cuando el inhibidor este presente (Figura 6). Efectivamente, los resultados obtenidos demuestran que la activación de la ruta PI3K/Akt es responsable de la inducción de HIF-1 α tanto en normoxia como en hipoxia. Además, dicha implicación queda también demostrada por el incremento en la nivel de la forma fosforilada (activa) de Akt (p-Akt).

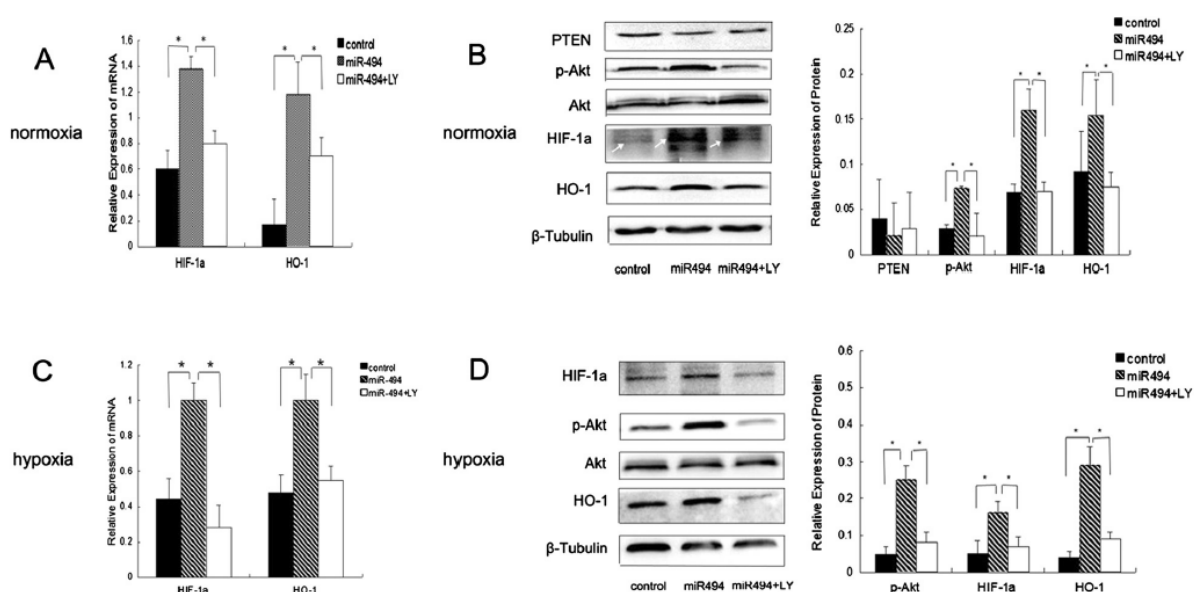


Figura 6. miR-494 induce la expresión de HIF-1 α y HO-1 mediante la activación de la ruta PI3K/Akt. En normoxia (A y B), se observa que los niveles de ARNm de HIF-1 α y HO-1 (A) aumentan en las células que sobre-expresan el miR-494 y disminuyen en presencia del inhibidor LY, y (B) la expresión proteica de p-Akt (forma activa), HIF-1 α y HO-1, también sufren una reducción en presencia de LY. En hipoxia (C y D), al igual que ocurre en normoxia, los niveles de ARNm HIF-1 α y HO-1 (C) disminuyen si el inhibidor LY está presente al igual que ocurre con la expresión de las proteínas HIF-1, p-Akt y HO-1 (D). *p<0.05 (Sun et al., 2013).

4.2.4. Regulación post-traducciona de HIF-1 α

La subunidad HIF-1 β se expresa constitutivamente y tanto su ARNm como la proteína se mantienen en niveles constantes independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Kallio et al., 1997). Por el contrario, la subunidad HIF-1 α tiene una vida media corta. Su transcripción y síntesis no se ve afectada por el nivel de oxígeno (Wang et al., 1995; Kallio et al., 1997; Wiesener et al., 1998). Sin

embargo, en condiciones de normoxia, HIF-1 α es rápidamente degradado, no llegando a detectarse sus niveles (Wang et al., 1995) por tanto, el principal mecanismo de regulación de HIF-1 α es a nivel post-traducciona. Así, como explicaremos más adelante, en condiciones de hipoxia, HIF-1 α se estabiliza y transloca desde el citoplasma hasta el núcleo, donde junto con la proteína HIF-1 β , constituye el complejo dimérico HIF-1, que es la forma transcripcionalmente activa. Como se ha descrito con anterioridad, el complejo HIF-1 activado se asocia a los HRE en regiones reguladoras de los genes diana, del mismo modo que se une a coactivadores que inducen la expresión génica (Lando et al., 2002a).

4.2.4.1. Hidroxilación de HIF-1 α

El mecanismo de hidroxilación destaca en regulación por el papel prioritario que desempeña el dominio ODD regulando la ubiquitinación de HIF-1.

Como ya hemos visto, en el dominio ODD existen dos residuos de prolina (Pro402 y Pro564) altamente conservados y dos subdominios C-terminal y N-terminal, que han sido altamente estudiados precisamente por su relación con los mecanismos de regulación y estabilidad de la subunidad HIF-1 α dependiente de oxígeno (Masson et al., 2001).

En condiciones de normoxia, los residuos de prolina mencionados anteriormente, son hidroxilados por unas enzimas denominadas prolil hidroxilasas (PHDs) (Epstein et al., 2001; Bruick et al., 2001). Esta hidroxilación permite el reconocimiento de HIF-1 α por la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (pVHL) que forma parte del complejo E3 ubiquitina proteína ligasa (Aso et al., 2000; Kamura et al., 2000). La proteína pVHL, presenta un dominio β que interactúa directamente con el dominio ODD de HIF-1 α dando lugar a la ubiquitinación de dicha subunidad y a su posterior degradación en el proteasoma (Bonicalzi et al., 2001).

Existen tres isoformas diferentes de las enzimas PHDs (PHD1, PHD2 y PHD3) aunque la que cataliza principalmente la degradación de HIF-1 α es la PHD2 (Berchner – Pfannschmidt et al., 2007). Estas enzimas introducen un grupo –OH en la proteína diana usando como sustrato el oxígeno molecular y como cofactor el ion ferroso, generando así como productos CO₂ y succinato (Figura 7) (McNeil et al., 2002).

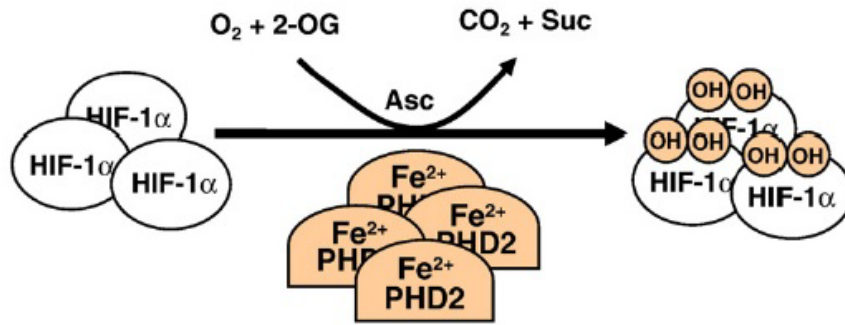


Figura 7. Hidroxilación de HIF-1 α catalizada por PHD2 (Adaptado de Berchner-Pfannschmidt et al., 2009).

Debido a que la actividad de estas enzimas depende de la disponibilidad de oxígeno, las condiciones de hipoxia limitan la hidroxilación de los residuos de prolina de HIF-1 α , de forma que se impide su unión a pVHL, por lo que HIF-1 α no se ubiquitina, no se degrada y como consecuencia aumenta su vida media (Figura 8).

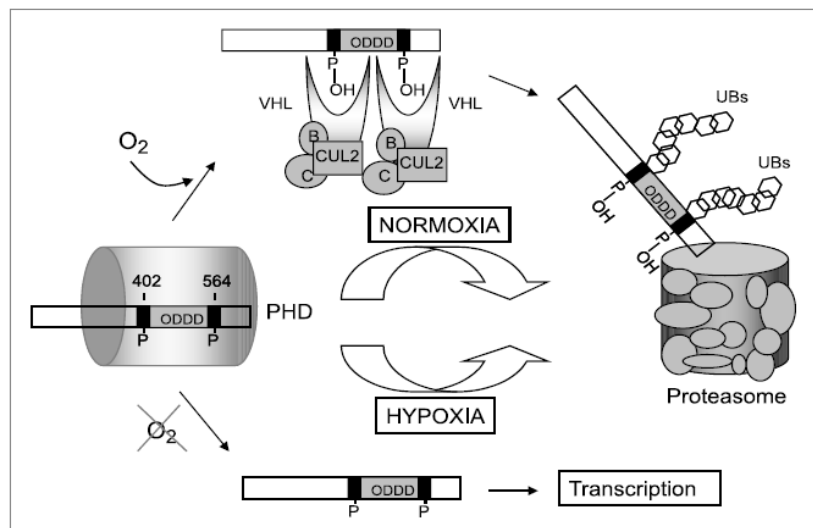


Figura 8. Efecto del oxígeno en la hidroxilación y degradación de HIF-1 α (Chun et al., 2002).

Podemos ejemplificar la importancia de la relación que existe entre pVHL y HIF-1 α , con un artículo reciente en el cual se pone de manifiesto que la supresión del factor HIF-1 α contribuye a la actividad antiangiogénica de los polifenoles de propóleo rojo (RPP) en células endoteliales humanas (Daleprane et al., 2012). En los resultados de esta investigación (Figura 9) se observa como en condiciones de normoxia, tanto

en presencia como en ausencia del polifenoles (calles 1 y 2), HIF-1 α no se expresa mientras que si lo hace la proteína pVHL. Sin embargo, en condiciones de hipoxia el resultado varía en función de la presencia (calle 4) o ausencia (calle 3) de los polifenoles. Cuando los polifenoles se encuentran presentes (calle 4), la proteína pVHL se expresa de forma notoria mientras que la expresión de HIF-1 α se inhibe. Por otro lado, en ausencia de los polifenoles (calle 3), pVHL se expresa solo levemente mientras que HIF-1 α se induce. En definitiva, este trabajo demuestra que en situaciones de hipoxia el tratamiento con RPP disminuye la acumulación de HIF-1 α como consecuencia de la inducción de la expresión de pVHL.

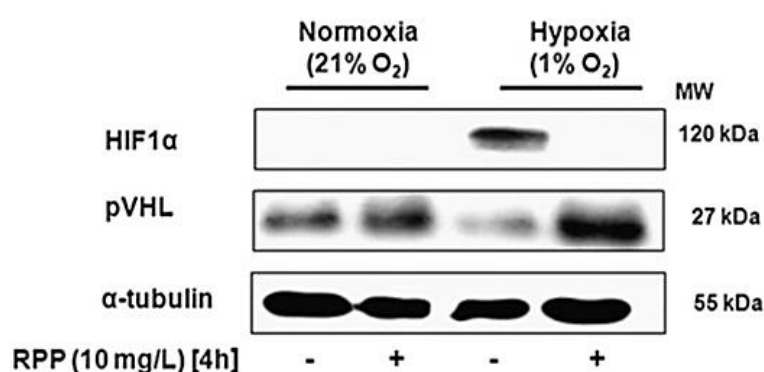


Figura 9. Efecto de la incubación con 10 mg/L RPP en los niveles proteicos de HIF1 α y pVHL en células endoteliales (EC) humanas. EC son incubadas con RPP (10 mg/L) durante 4 horas en condiciones de normoxia (21% O₂) e hipoxia (1% O₂) (Daleprane et al., 2012).

También podemos utilizar un artículo reciente (Kontani et al., 2013) para poner de manifiesto la importancia de la actividad de las PHDs en la regulación del nivel de HIF-1 α . El objeto de este artículo es testar y analizar el efecto protector en la hipoxia, de un nuevo inhibidor de las PHDs (TM6008) que, a diferencia de otros, actúa de forma selectiva sobre estas enzimas sin quelar el átomo de hierro de su centro activo. Para ello, inicialmente, los autores hacen un recuento del número de células que expresan HIF-1 α en normoxia, inmediatamente después de la hipoxia y 3 o 7 días después de la hipoxia tratando las células con o sin el inhibidor TM6008. Comprueban que la incubación con el inhibidor (7 días), favorece la acumulación de HIF-1 α (Figura 10).

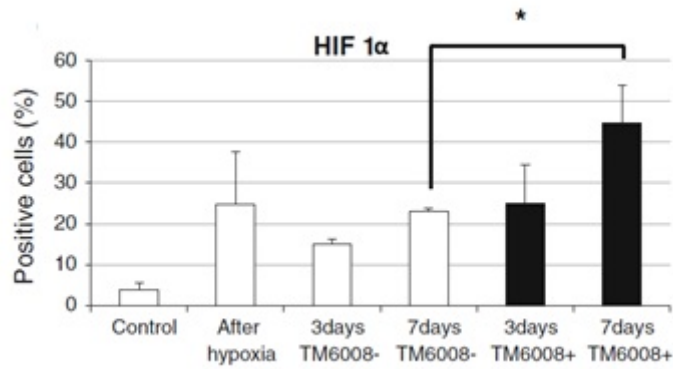
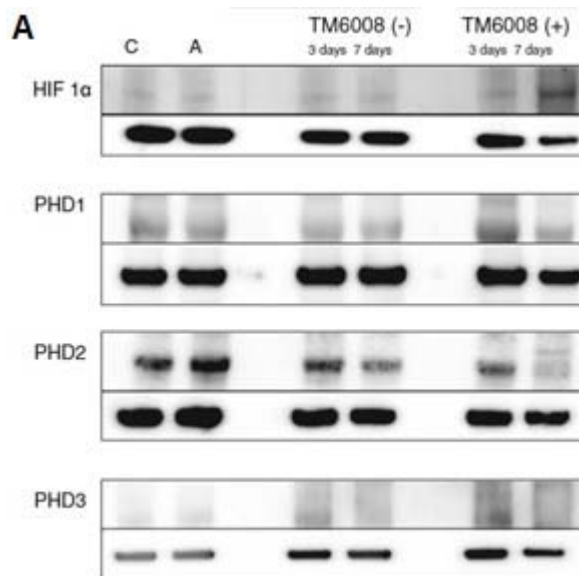


Figura 10. Número de células HIF-1 α positivas en células control, tras la hipoxia y después de 3 y 7 días en presencia o no de TM6008. * $p < 0.05$ respecto a TM6008 tras 7 días (Kontani et al., 2013).

A continuación, comprueban el resultado anterior mediante Western blot y analizan la expresión de las PHDs (Figura 11) demostrando que la incubación durante 7 días con este inhibidor disminuye el nivel de la PHD2 de forma significativa lo que sugiere que este inhibidor actúa además disminuyendo la expresión de PHD2 o favoreciendo su degradación. En cualquier caso, y tal y como cabría esperar según el mecanismo de regulación de HIF-1 α , se demuestra que la disminución/inhibición de las PHDs y, especialmente de la PHD2, se asocia con la acumulación de HIF-1 α .



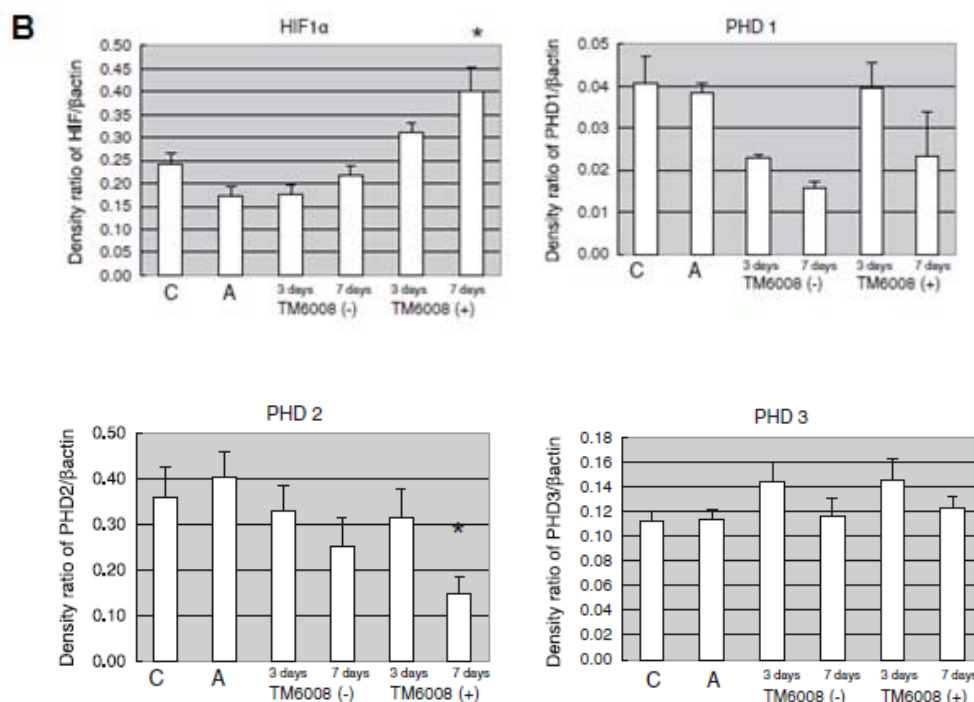


Figura 11. A) La expresión de la proteína HIF-1 α en células cultivadas en presencia de TM6008, un inhibidor de las PHDs, tras 7 días después de hipoxia, está aumentada. Por otro lado la expresión de PHD1, PHD2 y PHD3, en presencia de este mismo inhibidor esta disminuida, haciéndose más notable en PHD2. B) Densitometría. Se observa que los valores referentes a PHD2 son significativos. * $p < 0.05$ con TM6008 tras 7 días versus TM6008 tras 3 días (Kontani et al., 2013).

La actividad de las enzimas PHD, y por lo tanto su acción, está regulada por las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Chandel et al., 1998; Agani et al., 2000).

La investigación realizada por Metzen et al. (2003) demostró que la acumulación de HIF-1 α por acción del NO era independiente de la transcripción y traducción del propio HIF-1 α , pero que estaba causada por la inhibición de su degradación. De hecho, el NO produce la disminución de la interacción entre HIF-1 α y pVHL y una gran reducción en la ubiquitinación de HIF-1 α , lo que sugiere que la acumulación de HIF-1 α responde a que las enzimas PHDs se encuentra inhibidas como consecuencia de la unión competitiva del NO con el ion ferroso de su centro activo (Metzen et al., 2003).

De esta forma, los niveles de HIF-1 α en la célula aumentan considerablemente, lo que permite que esta subunidad pueda unirse a la subunidad HIF- β , dando lugar al complejo transcripcionalmente activo HIF-1, que se une a HRE induciendo la

expresión de los genes diana. Uno de estos genes diana es la PHD2. Por lo tanto, el incremento inicial de HIF-1 α conlleva un aumento de la expresión y actividad de PHD2 que da lugar a un incremento posterior en la hidroxilación de los residuos de HIF-1 α , lo cual favorece la ubiquitinación y la degradación por el proteasoma. La consecuencia de dicho mecanismo a largo plazo es la disminución de los niveles de HIF-1 α en la célula. Es decir, el NO ejerce un efecto bifásico sobre el nivel de HIF-1 α (Figura 12) favoreciendo su aumento inicial y su posterior disminución (Berchner-Pfannschmidt et al., 2008).

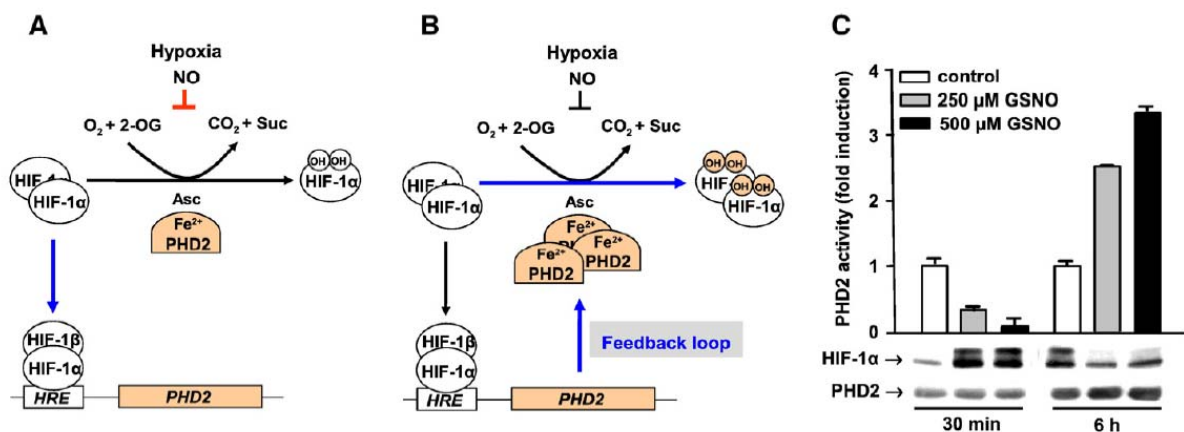


Figura 12. Efecto bifásico del NO sobre HIF-1 α . PHD2 es un gen diana de HIF-1 y parte de un bucle de retroalimentación negativa. A) La actividad de PHD2 es inhibida por hipoxia y/o el NO. HIF-1 α escapa de la hidroxilación y de la degradación, y se induce la expresión de PHD2. B) El incremento en el nivel de PHD2, permite el aumento de hidroxilación y degradación de HIF-1 α . C) Las células U2OS osteosarcoma fueron incubadas con el donador de NO S-nitrosoglutation (GSNO) en hipoxia (1% O₂) durante 30 minutos o 6 horas. En el primer punto experimental (30 min) el NO disminuye la actividad enzimática de PHD2 e incrementa la expresión de HIF-1 α . Cuando todo el NO ha sido liberado (6 h) la inducción de la expresión y actividad de PHD2 origina la disminución de la acumulación de HIF-1 α (Berchner-Pfannschmidt et al., 2009).

La influencia del NO en el nivel de HIF-1 α ha quedado demostrada en diversos trabajos posteriores al que acabamos de citar. Así, Martínez-Romero et al. (2012) estudió como los niveles de NO modulan la actividad de HIF-1 en respuesta a la hipoxia hipobárica.

En primer lugar, se evaluó la respuesta del sistema de NO en corteza cerebral tras 4 horas de hipoxia hipobárica (HH). La hipoxia promueve un incremento significativo en la producción de NO (Figura 13) que se anula como consecuencia del tratamiento con L-NAME, un inhibidor de la actividad de las óxido nítrico sintasas (NOS). Este

resultado demuestra, por tanto, la participación del sistema NOS en la producción de NO en respuesta a una situación de hipoxia.

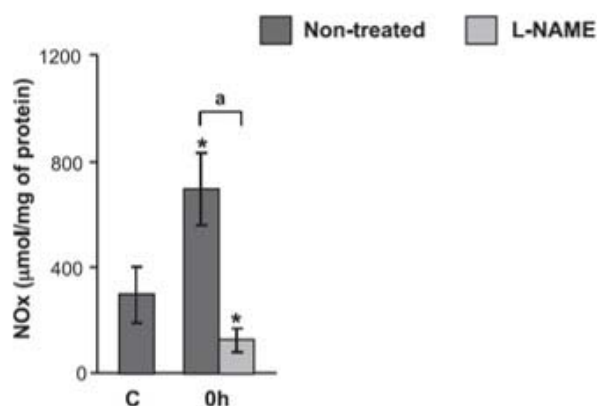


Figura 13. Efecto del tratamiento con L-NAME en la concentración de NO de la corteza cerebral de ratones sometidos a 4 horas de HH * $p < 0.05$ respecto al grupo control; ^a $p < 0.05$ respecto al grupo hipóxico no tratado. (Martínez-Romero et al., 2012).

A continuación, se demuestra la influencia del NO en la acumulación de HIF-1 α puesto que, como se observa en la siguiente figura (Figura 14), y obviando los resultados del tratamiento con DPQ, un inhibidor de la proteína PARP-1 que escapa a los objetivos de este trabajo fin de grado, el tratamiento con L-NAME origina una disminución significativa en la expresión de esta proteína.

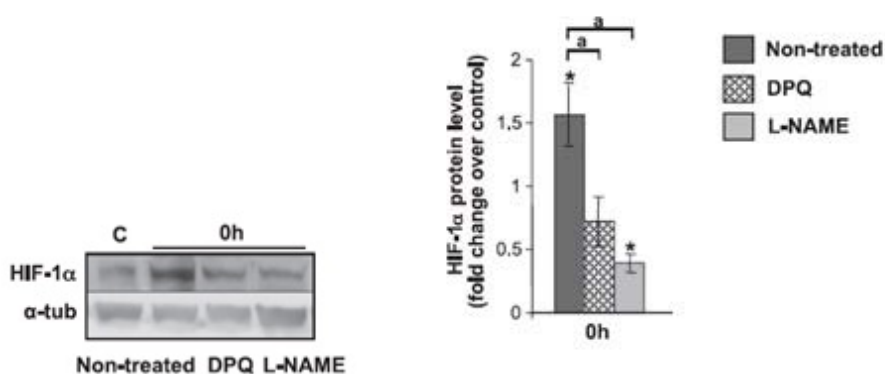


Figura 13. Análisis de Western blot a cerca del efecto de L-NAME sobre la estabilidad de HIF-1 α en condiciones de hipoxia inducida. Medidas de la actividad de HIF-1 α en ratón obtenidas por densitometría semicuantitativa en control, post-hipoxia (0h), y bajo el tratamiento con DPQ y L-NAME (0h) (Adaptada de Martínez-Romero et al., 2012).

En lo que respecta a ERO, su formación está normalmente relacionada con la inducción de HIF-1 α como consecuencia de la inhibición de la actividad de las PHDs (Chandel et al., 1998; Agani et al., 2000). En este mecanismo de actuación de ERO se ve implicado el hierro del centro de activo de las PHDs, el cual se oxida pasando de su forma férrica a su forma ferrosa.

Para ejemplificar la actividad de las ERO, podemos observar un estudio publicado a inicios de este año (Zhao et al., 2014) en el cual se ha analizado la relación entre ERO y HIF-1 en la metástasis pulmonar. Para llevarlo a cabo, las células fueron cultivadas con y sin el antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Los cultivos se realizaron manteniendo las células en situación de hipoxia (3% O₂) durante 24 horas y, en el grupo experimental 3 $\rightarrow$ 15%, reoxigenando parcialmente las células durante 6 horas. Tal y como se observa en las gráficas de los resultados (Figura 15A) cuando el NAC no está presente en el cultivo, el nivel de ERO aumenta en reoxigenación. Sin embargo, cuando está presente dicho antioxidante, los niveles de ROS prácticamente no varían. Este mismo resultado se ha obtenido en el Western blot (Figura 15B) donde se usan las proteínas carboniladas como marcadoras de estrés oxidativo.

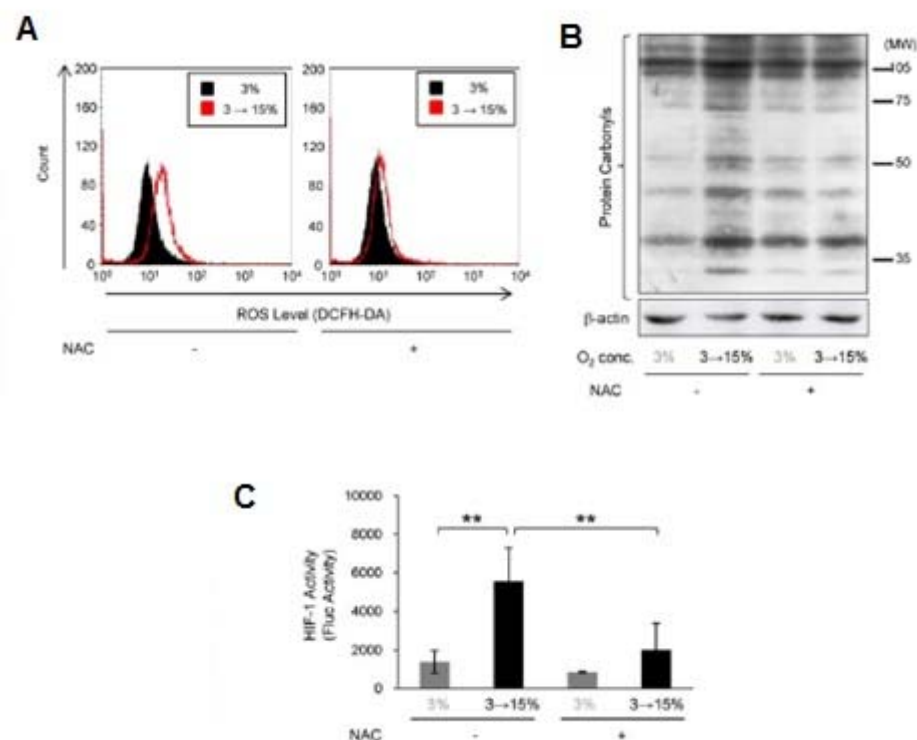


Figura 14. Análisis en células cultivadas con (+) y sin (-) NAC y sometidas a hipoxia (3%) o hipoxia+reoxigenación 3→15% de A) la producción de ERO valorada mediante citometría de flujo B) las proteínas carboniladas analizadas mediante Western blot y C) la actividad de HIF-1 mediante ensayo con luciferasa (Zhao et al., 2014).

En la última gráfica (Figura 15C) podemos ver cómo, en concordancia con los niveles de ERO, la actividad de HIF-1 aumenta solo en ausencia NAC. En definitiva, este artículo vuelve a poner de manifiesto la mencionada implicación de la producción de ERO en la acumulación de HIF-1 α puesto que, en la misma situación experimental, el tratamiento con un antioxidante anula la acumulación de HIF-1 α y, por tanto, la actividad transcripcional de HIF-1.

4.2.4.2. Acetilación de HIF-1 α

En este mecanismo de regulación, el residuo de lisina (Lys532) localizado en el dominio ODD de HIF-1 α , es acetilado mediante la acción de una enzima acetil transferasa denominada arrest-defective-1 (ARD1) (Jeong et al., 2002), identificada por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Whiteway y Szostak, 1985). La acetilación del residuo de lisina favorece la interacción de HIF-1 α con la proteína pVHL, desestabilizando consecuentemente HIF-1 α . Una mutación de Lys532 a Arg532, incrementa la estabilidad de HIF-1 α . Además, el mantenimiento artificial o el incremento del estado de acetilación de HIF-1 α por la presencia de ácido butírico, un inhibidor general de desacetilasas, provoca una disminución de los niveles de la proteína HIF-1 α .

La actividad de las acetil transferasas no está influenciada por el oxígeno, sin embargo, los niveles de ARNm y proteína ARD1 disminuyen en condiciones de hipoxia, por lo tanto la acetilación es menor en condiciones de hipoxia que en condiciones de normoxia (Jeong et al., 2002).

4.2.5. Regulación de la actividad transcripcional

La estabilización de HIF-1 α no es suficiente para completar totalmente la actividad transcripcional de HIF-1. Existe un segundo mecanismo fundamental que controla este aspecto, este mecanismo implica a los dos dominios de transactivación N-TAD y C-TAD, cuya función es reclutar coactivadores transcripcionales como CBP/p300, SRC-1, y TIF2 (Arany et al., 1996; Ebert y Bunn, 1998; Kallio et al., 1998; Ema et al.,

1999; Carrero et al., 2000). Bajo una presión normal de oxígeno, se hidroxila un residuo de asparagina (Asn803) localizado en el dominio C-TAD de HIF-1 α debido a la acción del factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1), una dioxigenasa cuya transcripción es independiente de la concentración de oxígeno (Metzen et al., 2003). De esta forma, se previene la interacción de HIF-1 α con CBP/p300 u otros coactivadores (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002a; Sang et al., 2002) impidiéndose la actividad transcripcional de HIF-1. Cuando nos encontramos frente a una situación de hipoxia, la hidroxilación del residuo de asparagina no tiene lugar, y consecuentemente, se produce la interacción entre el dominio C-TAD y CBP/p300, activándose la transcripción de los genes diana (Lando et al., 2002b). De hecho, cuando en la posición del residuo de asparagina (Asn803) nos encontramos con un residuo de alanina (Ala803), es decir, cuando se sustituye Asn803 por Ala803, en condiciones de normoxia, se permite la unión del coactivador a HIF-1 α (Lando et al., 2002a) y la actividad de HIF-1 a pesar de la presencia de oxígeno (Figura 16).

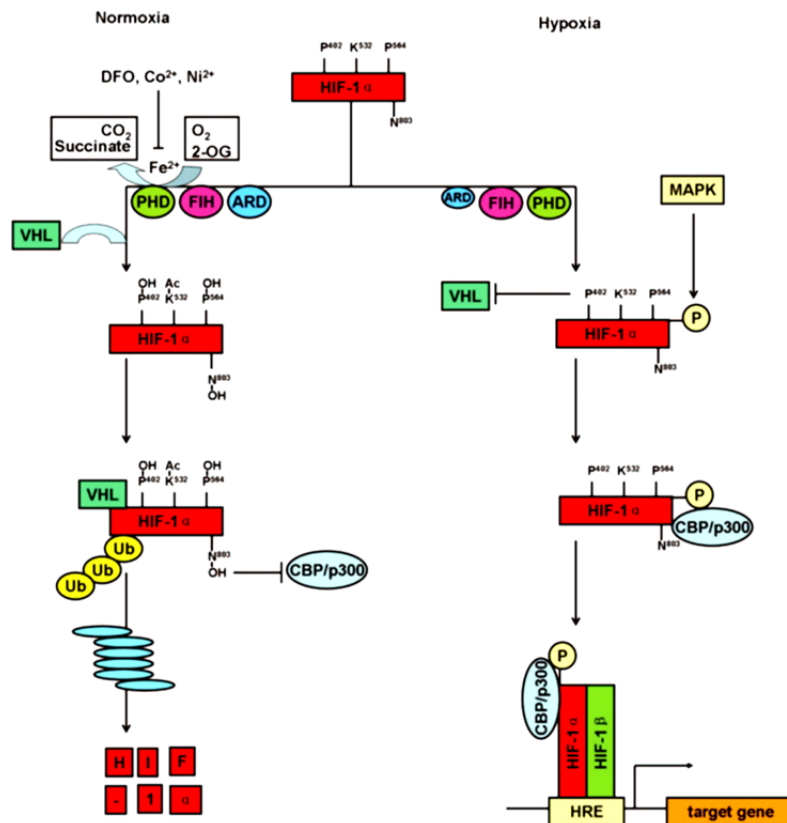


Figura 16. Imagen en la que se integran diferentes mecanismos de regulación de HIF-1 α . En normoxia (izquierda), los dos residuos de prolina de HIF-1 α (P402 y P564) y asparagina (N803) son hidroxilados por las PHD y FIH-1 respectivamente, de manera dependiente de O_2 , 2-OG y Fe^{2+} . HIF-1 α hidroxilado se une al complejo E3 ubiquitina proteína ligasa, permitiendo la degradación por parte del proteasoma. La acetilación de la lisina (K532) por parte de ARD1 favorece la interacción de HIF-1 α con pVHL. El residuo N803 hidroxilado bloquea el reclutamiento del coactivador transcripcional

CBP/p300. En hipoxia (derecha), la actividad de las PHDs y de FIH-1 está inhibida debido a la ausencia de O₂, teniendo como resultado la no hidroxilación de los residuos de prolina y asparagina. Por lo tanto, no hay unión a pVHL y HIF-1 α se estabiliza. HIF-1 α estabilizado pasa al núcleo donde se une a HIF-1 β , unión favorecida por la fosforilación de HIF-1. El residuo N803 no hidroxilado de HIF-1 α permite el reclutamiento de CBP/p300 y la expresión de los genes diana. Además, la expresión de ARD1 disminuye bajo condiciones de hipoxia, favoreciendo la acumulación de HIF-1 α (Ke y Costa, 2006).

5. HIF-1, UNA DIANA TERAPÉUTICA

La importancia de HIF-1 como factor de transcripción clave en la respuesta a la hipoxia y la implicación de ésta en una gran cantidad de patologías hizo pensar que HIF-1 podría ser una diana terapéutica de gran importancia clínica. Sus variados mecanismos de regulación permiten diversas posibilidades para la intervención terapéutica que podrá ir encaminada hacia la inhibición de su actividad, cuando esta sea perjudicial, como ocurre en el caso del cáncer, o hacia su activación, cuando interese potenciar la respuesta a la hipoxia, como ocurre en el caso de la isquemia.

Todas las células precisan de la cercanía de un vaso sanguíneo que le aporte el oxígeno y los nutrientes necesarios para su supervivencia. Así, la aparición de zonas hipóxicas, especialmente en la región central, es una de las principales características del tumor. Sin embargo, las células tumorales son especialmente resistentes a la hipoxia siendo capaces de sobrevivir y seguir proliferando gracias, en gran medida, a la sobreexpresión HIF-1 (Semenza y Wang, 1992; Wang et al., 1995). Como se ha descrito previamente, la inducción de HIF-1 media la adaptación primaria al estrés hipóxico favoreciendo la angiogénesis, la supervivencia celular, la proliferación, y la adaptación metabólica (Semenza, 2003). Así, la inducción de la angiogénesis permitirá la creación de nuevos vasos sanguíneos contribuyendo a la llegada de oxígeno y nutrientes; la inhibición de la apoptosis permitirá la supervivencia de la célula en condiciones desfavorables; la inducción de la proliferación celular permitirá el crecimiento del tumor; y la adaptación metabólica hará frente a las demandas energéticas de las células tumorales y prevendrá el daño producido por el estrés hipóxico (Semenza, 2010). De hecho, la inducción de la glucólisis anaerobia observada hace 80 años por Otto Warburg y conocida como efecto Warburg es responsabilidad de HIF-1 (Warburg, 1956; Semenza 2013).

Así, y como cabría esperar, se ha demostrado que la expresión de HIF-1 α está asociada con el incremento de la mortalidad en varios tipos de cáncer (Brennan y Quintero, 2005; Feng et al., 2014). En la figura inferior (Figura 17) se aprecia como

la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal es mucho mayor cuando HIF-1 α no se está expresando.

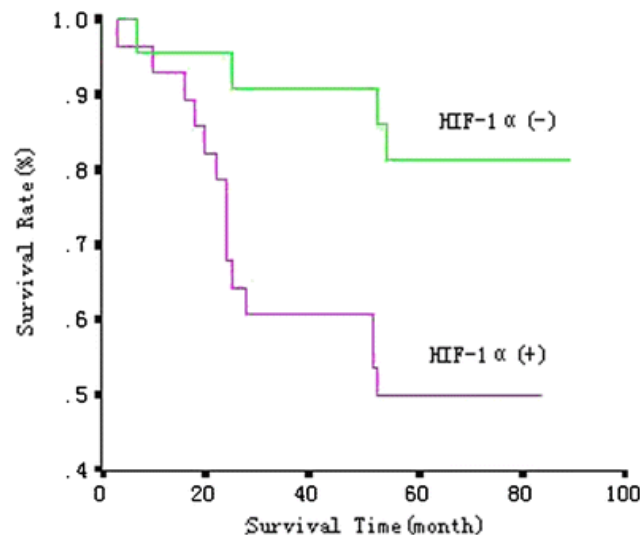


Figura 17. Relación entre la supervivencia y expresión de HIF-1 α en pacientes con cáncer colorrectal (Feng et al., 2014).

La interacción entre los radicales libres (ERO y ERN), la hipoxia y la actividad de HIF-1 influye las primeras etapas del desarrollo tumoral. El NO es generado, entre otros mecanismos, por NOS. Estas enzimas presentan diferentes isoformas, dos de las cuales, la endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) se sobreexpresan en los tumores. Esta sobreexpresión conlleva el aumento en la producción de NO, que inhibe la actividad de las PHDs favoreciendo la acumulación de HIF-1 α (Quintero et al., 2006; Brennan y Quintero, 2005). En el tumor también aumenta la producción de ERO, tanto en la cadena de transporte electrónico como por la actividad NADPH oxidasa lo que, al igual que la producción de NO, favorece la acumulación de HIF-1 α (Xia et al., 2007; Das y Vinayak, 2014).

Además de las implicaciones de los radicales libres, las alteraciones a nivel de la ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR también juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, en cáncer de próstata y mama, la activación de la señalización de la ruta PI3K/Akt incrementa la síntesis de HIF-1 α como resultado de la activación de mTOR (Zhong et al., 2000; Laughner et al., 2001; Hudson et al., 2002). De mismo modo, la inactivación del gen supresor de tumores PTEN, una

fosfatasa que contrarresta la acción de la PI3K al favorecer la desfosforilación de PI(3,4,5,)P favorece la síntesis y la estabilidad de HIF-1 α , facilitando la progresión tumoral (Ravi et al., 2000)

Además de favorecer la progresión tumoral, la sobreexpresión de HIF-1 α en las células tumorales es una causa de resistencia a los tratamientos radio y quimioterapéuticos (Brown y Wilson, 2004; Vaupel y Mayer, 2007). Centrándonos en la acción de HIF-1 en la respuesta a la radioterapia (Figura 18), el tratamiento con radiación disminuye el consumo de oxígeno como consecuencia de la muerte de algunas células, lo que facilita la reoxigenación. Puesto que aumenta la llegada de oxígeno, cabría esperar que disminuyera HIF-1 α . Sin embargo, se ha observado justo el efecto contrario. Para explicar este resultado, se han barajado diferentes hipótesis (Dewhirst et al., 2008). En primer lugar, el aumento de ERO después del tratamiento con radiación ionizante inhibe las PHDs y, como consecuencia, favorece la acumulación de HIF-1 α . En segundo lugar, la hipoxia, promueve la formación de gránulos de estrés, que son complejos de ARNm y proteínas agregadas en el citoplasma. La reoxigenación facilita la desagregación de los gránulos, permitiendo que los ARNm que acumulaban, muchos de ellos correspondientes a HIF-1 α y a sus genes diana, se traduzcan. Por último, un tercer mecanismo podría asociarse al aumento de la cantidad de macrófagos que tiene lugar en el interior del tumor tras la aplicación de radioterapia. Estos macrófagos expresan iNOS, lo cual hace que aumente la concentración de NO lo que, como ya sabemos, inhibe el reconocimiento de HIF-1 α por parte de pVHL, aumentando así la estabilidad y concentración de HIF-1 α .

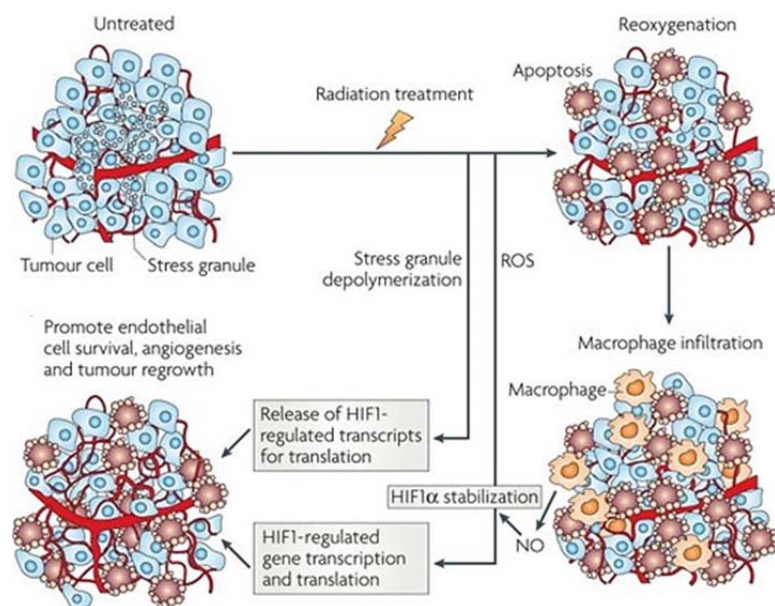


Figura 18. Mecanismos en los que se ve implicado HIF-1 α tras el tratamiento con radioterapia (Dewhirst et al., 2008).

En definitiva, de todo lo expuesto se deduce que la inhibición de la acumulación y activación de HIF-1 contribuiría a retrasar la progresión tumoral y a mejorar la respuesta a los tratamientos frente al cáncer. Son diversas las estrategias utilizadas para inhibir HIF-1. En las tablas inferiores (Tabla 3 y 4) se recogen algunos inhibidores de HIF-1 y su mecanismo de acción (Hu et al., 2013).

	Inhibition mechanisms	Agents	Current status	References
Transcriptional activity/ DNA binding	Regulate on multiple levels	YC-1 and analogs	Predinical	Chun et al. [2001, 2004], Li et al. [2008], Sun et al. [2007]
	Inhibiting thioredoxin-1	PX-12	Phase II	Welsh et al. [2003]
	Inhibiting thioredoxin-1 and DNA binding	Pleurotin AJM290/AW464	Predinical Not in clinical use	Jones and Harris [2006], Jones et al. [2006]
	Inhibiting HRE and DNA binding	Echinomycin (NSC-13502)	Suspended	Kong [2005], Vlamincik et al. [2007]
	Disrupting binding of HIF-1-HRE	Polyamides	Not in clinical use	Jacobs and Dervan [2009]
HIF-1 α translation	Inhibiting HIF-1 α gene transcription	Flavopiridol (alvocidib)	Phase III	Blagosklonny [2004], Newcomb et al. [2005]
	Inhibiting p300 recruitment	Chetomin	Predinical	Kung et al. [2004]
	Inhibiting FIH-1, and the p300 recruitment	Bortezomib (Velcade, PS-341)	Approved	Shin et al. [2008]
	Inhibiting PI3K	Amphotericin B	Approved	Yeo et al. [2006]
	Blocking mTOR	LY294002 and Wortmannin	Not in clinical use	Jiang et al. [2001]
HIF-1 α degradation	Blocking mTOR/p70S6K/4E-BP1 pathway	Rapamycin, Everolimus and CCI-779	Approved	Cejka et al. [2008], Hudson et al. [2002], Wan et al. [2006]
	Microtubule depolymerization	Silibinin	Approved	Garcia-Maceira and Mateo [2009]
	Regulate on multiple levels, specific unknown	2ME2 and ENMD-1198	Phase II/Phase I	LaVallee et al. [2008], Mabjeesh et al. [2003]
	Inhibit HIF-1 α mRNA translation	PX-478	Phase I	Welsh et al. [2004]
	Inhibiting Hsp90	2-phenethyl isothiocyanate GA and analogs	Phase II Phase II	Wang et al. [2009] Isaacs et al. [2002], Mabjeesh et al. [2002]
		Radicicol and its derivants	Not in clinical use	Hur et al. [2002], Kurebayashi et al. [2001]
	Inhibiting HDAC (Histone deacetylase)	Apigenin	Phase II	Fang et al. [2005]
		Trichostatin A (TSA)	Phase I	Yang et al. [2006]
		LAQ824	Not in clinical use	Qian et al. [2006]
		SAHA and FK228	Approved	Mie et al. [2003], Shankar et al. [2009]
	Increasing HIF-1 α and pVHL interaction	Wondonin	Not in clinical use	Jun et al. [2007]
	Blocking signaling pathways	Green tea extract and EGCG	Not in clinical use	Zhang et al. [2006]
	Inhibiting ERK 1/2 and AKT activation	Resveratrol	Phase II	Park et al. [2007], Zhang et al. [2005]

Tabla 3. Inhibidores químicos de HIF-1 (Hu et al., 2013).

	Inhibition mechanisms	Agents	References
HIF-1 α stability	Attenuate HIF-1 α stabilization possibly through zinc deprivation Cetuximab reduced the cellular level of HIF-1 α in the presence of a proteasome inhibitor, lactacystin, indicating that cetuximab acts mainly at the level of protein synthesis	Metallothioneins (MTs) Cetuximab	Devisscher et al. [2011] Luwor et al. [2005]
Transcriptional activity	Implicated in the induction of HIF-1 α translation, has antiangiogenic effect by inhibiting HIF-1 dependent induction of VEGF	Herceptin	Koukourakis et al. [2003]
mRNA and protein expression	RNA interference is the process of sequence specific post-transcriptional gene silencing, small Interfering RNA (siRNA) have been demonstrated to have stronger suppressive effects, in order to inhibit HIF-1 α expression RX-0047 is a 20-mer phosphorothioate antisense oligonucleotide (ASO) that is a potent inhibitor of HIF-1 α . RX-0047 inhibits HIF-1 α by reducing expression of its mRNA and protein. The results have been tested by experiment in vivo and in vitro	Small Interfering RNA (siRNA) RX-0047	Mizuno et al. [2006] Dikmen et al. [2008]
Dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β	Single-domain llama antibodies (VHH) directed against the HIF-1 α oxygen dependent degradation domain (ODDD) which encompass the N-terminal transactivation domain (N-TAD), the combination of them can prevent the dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β ; hetero-bivalent VHH markedly increased the binding affinity for HIF-1 α , to be novel agents for cancer therapy Anti-HIF-1 α VHH nanobodies (AHPC) screened by our laboratory is able to recognize HIF-1 α within the PAS domain and combine with it specifically in order to prevent the dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β ; the further characteristic of it is still under research	Anti-HIF-1 α VHH and Hetero-bivalent VHH nanobodies (AG1-5) Anti-HIF-1 α VHH nanobodies (AHPC)	Groot et al. [2006, 2008] Unpublished

Tabla 4. Proteínas y oligonucleótidos inhibidores de HIF-1 α (Hu et al., 2013)

Por último, existen otras patologías como la isquemia donde HIF-1 tiene una gran importancia y en las cuales, a diferencia de lo que ocurre en cáncer, la estrategia terapéutica consistiría en potenciar la respuesta de HIF-1, por ejemplo, mediante preacondicionamiento (exposición repetida a breves episodios de hipoxia).

6. CONCLUSIÓN

El objetivo de esta revisión ha sido poner de manifiesto la importancia de los mecanismos moleculares que subyacen a la respuesta adaptativa a la hipoxia. HIF-1, principal factor de transcripción implicado en dicha respuesta está sometido a complejos mecanismos de regulación. Los más importantes han sido tratados en este trabajo fin de grado y ejemplificados con diversos trabajos recientes, en un intento de dejar patente la importancia de este campo de investigación. Finalmente, y aunque son muchas las aplicaciones terapéuticas que se derivan del conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la activación de HIF, nos hemos centrado en la descripción de su importancia en cáncer, en un intento de ejemplificar la aplicación práctica de lo expuesto en los apartados previos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, and LaManna JC (2000). The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* 275: 35863-35867.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, and Livingston DM (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12969-12973.

Aso T, Yamazaki K, Aigaki T, and Kitajima S (2000). Drosophila von Hippel-Lindau tumor suppressor complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 355-361.

Bartel DP (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.

Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, and Fandrey J (2007). *J Biol Chem* 282 (3) 1788.

Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Trinidad B, Oehme F, Yamac H, Wotzlaw C, Flamme I, and Fandrey J (2008). Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 283 (46) 31745.

Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Kirsch M, and Fandrey J (2009). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cellular Signalling* 22: 349-356.

Bonicalzi ME, Groulx I, de Paulsen N, and Lee S (2001). Role of exón 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 276: 1407-1416.

Brennan PA, and Quintero M (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) by nitric oxide in oral squamous cell carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl* 87: 153-158.

Brown JM, and Wilson WR (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Rev. Cancer* 4: 437-447.

Bruick RK, and McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.

Camps C, Saini HK, Mole DR, Choudhry H, Reczko M, Guerra-Assunção JA, Tian YM, Buffa FM, Harris AL, Hatzigeorgiou AG, Enright AJ, and Ragoussis J (2014). Integrated

analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol Cancer* 13: 28.

Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, and Poellinger L (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SCR-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20: 402-415.

Chan SY, and Loscalzo J (2010). MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 9(6):1072–1083.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, and Schumacker PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11715-11720.

Choi YH, Jin GY, Li Lc, and Yan GH (2013). Inhibition of Protein Kinase C delta attenuates allergic airway inflammation through suppression of PI3K/Akt/ mTOR/HIF-1 alpha/VEGF pathway. *PLoS ONE* 8(11): 81773.

Chun YS, Kim MS, and Park JW (2002). Oxygen-dependent and –independent regulation of HIF-1 alpha. *J Korean Med Sci* 17: 581-588.

Crews ST (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12: 607-620.

Daleprane JB, Schmid T, Dehne N, Rudnicki M, Menrad H, Geis T, Ikegaki M, Ong TP, Brüne B, and Abdalla DSP (2012). Suppression of hypoxia-inducible factor-1α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. *The Journal of Nutrition*.

Das L, and Vinayak M (2014). Long term effect of curcumin in regulation of glycolytic pathway and angiogenesis via modulation of stress activated genes in prevention of cancer. *PLoS ONE* 9 (6): 99583.

Dewhirst MW, Cao Y, and Moeller B (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8 (6): 425-437.

Dolt KS, Mishra MK, Karar J, Baig MA, Ahmed Z, and Pasha MA (2007). cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 alpha in high altitude yak (*Bos grunniens*). *Gene* 386: 73-80.

Ebert BL, and Bunn HF (1998). Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 18: 4089-4096.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, and Fujii-Kuriyama Y (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4273-4278.

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, and Fujii-Kuriyama Y (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 18: 1905-1914.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, and Ratcliffe PJ (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-53.

Feng L, Tao L, Dawei H, Xuliang L, and Xiaodong L (2014). HIF-1 α expression correlates with cellular apoptosis, angiogenesis and clinical prognosis in rectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 20: 603-610.

Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, and Risau W (1997). HRF, a putative basic hélix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 63: 51-60.

Galbán S, and Gorospe M (2009). Factors interacting with HIF-1 α mRNA: novel therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 15 (33): 3853-3860.

Goldberg MA, Dunning SP, and Bunn HF (1998). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science (Wash DC)* 242: 1412-1415.

Gonsalves CS, and Kalra VK (2010). Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1 α and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p. *J Immunol* 184(7): 3878-3888.

Görlach A (2009). Regulation of HIF-1 alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des* 15: 3844-3852.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, and Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7: 205-213.

Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM et al. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277: 26351-26355.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, and Bradfield CA (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581–8593.

Hu Y, Liu J, and Huang H (2013). Recent agents targeting HIF-1a for cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 114: 498-509

Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, et al. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22: 7004–7014.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, and Kim KW (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709–720.

Jing Y, Ma N, Fan T, Wang C, Bu X, Jiang G, Li R, Gao L, Li D, Wu M, Wei L (2011). Tumor necrosis factor-alpha promotes tumor growth by inducing vascular endothelial growth factor. *Cancer invest* 29 (7): 485-483.

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, and Poellinger L (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5667–5672.

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, and Poellinger L (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 17: 6573–6586.

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, and Conaway JW (2000). Activation of HIF-1 alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10430-10435.

Ke Q, and Costa M (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70: 1469-1480.

Keith CT, and Schreiber SL (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270: 50–51.

Koh MY and Powis G (2012). Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem Sci* 37(9): 364-372.

Kim J, Shao Y, Kim SY et al. (2008). Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia – inducible factor-1 (alpha) expression through a Racc1-dependent NF-(kappa)B pathway. *Mol Biol Cell* 19: 433-444.

Kontani S, Nagata E, Uesugi T, Moriya T, Fujii N, Miyata T, and Takizawa S (2013). A novel prolyl hydroxylase inhibitor protects against cell death after hypoxia. *Neurochem Res* 38: 2588–2594

Koshikawa N, Hayashi J, Nakagawara A, and Takenaga K (2009). Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* 284(48): 33185-33194.

Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, and Ivan M (2008). A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 15: 667–671.

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML (2002a). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science (Wash DC)* 295: 858-861.

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, and Bruick RK (2002b). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16: 1466–1471.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, and Semenza GL (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21 (12): 3995-4004.

Loscalzo J (2010). The cellular response to hypoxia: tuning the system with micorRNAs. *J Clin Invest* 120(11): 3815–3817.

Martínez-Romero R, Cañuelo A, Siles E, Oliver J, and Martínez-Lara E (2012). Nitric oxide modulates hypoxia-inducible factor-1 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 cross talk in response to hypobaric hypoxia. *J Apply Physiol* 112: 816-823.

Masson N, William C, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20: 5197-5206.

McNeil LA, Hewitson KS, Gleadle JM, Horsfall LE, Oldham NJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Schofield CJ (2002). The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg Med Chem Lett* 12: 1547-1550.

Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, and Brune B (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14 (8) 3470.

Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, and Michiels C (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett.* 460 (2): 251-256.

Prabhakar NR, and Semenza GL (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 92: 967-1003.

Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, KaoGD, and Maity A (2006). Akt activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res.* 4 (7): 471-479.

Quintero M, Brennan PA, Gareth J et al., (2006). Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res* 66:770-774.

Ravi R, et al (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 14 (1): 34-44.

Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, and Caro J (2002). Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol* 22: 2984–2992.

Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, and Antonarakis SE (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5680-5684.

Semenza GL, and Wang GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-5454.

Semenza GL, Rue EA, Iyer NV, Pang MG, and Kearns WG (1996). Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics* 34: 437-439.

Semenza GL (1998). Hypoxia-inducible factor-1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 5: 588-594.

Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.

Semenza GL (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29: 625-634.

Semenza GL (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123 (9): 3664-3671.

Shivdasani RA (2006). MicroRNAs: regulators of gene expression and celldifferentiation. *Blood* 108(12):3646–3653.

Sun G, Zhou Y, Li H, Guo Y, Shan J, Xia M, Li M, Li S, Long D, and Feng L (2013). Over-expression of microRNA-494 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha expression via PI3K/Akt pathway and protects against hypoxia-induced apoptosis. *Journal of Biomedical Science* 20: 100.

Tian H, McKnight SL, and Russell DW (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72–82.

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, and McKnight SL (1998). The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12: 3320–3324.

Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mournier R, Couette S, Clottes E, and Clerici C (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and

HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem* 279 (15): 14871-14878.

Vaupel P, and Mayer A (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 225-239.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.

Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.

Whiteway M and Szostak JW (1985). The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell* 43: 483–492.

Wiener CM, Booth G, and Semenza GL (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 225 (2): 485-488.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, et al. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92: 2260–2268.

Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, et al. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* 67 (22): 10823-10830.

Xue Y, Li NL, Yang JY, Chen Y, Yang LL, and Liu WC (2011). Phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway is essential for Rac1-induced hypoxia-inducible factor-1(α) and vascular endothelial growth factor expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300 (6): 2169-2176.

Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, and Semenza GL (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275 (4 Pt 1): L818-826.

Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M and Harada H (2014). HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Scientific Reports*.

Zhong H, et al (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/ FRAP pathway in human

prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60 (6): 1541-1545.

Zundel W, et al (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14 (4): 391-396.