



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL PAPEL QUE JUEGA EL
FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA EN EL
MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO
MALIGNO DE CÉLULAS HUMANAS DE
COLON EN CULTIVO

T E S I S

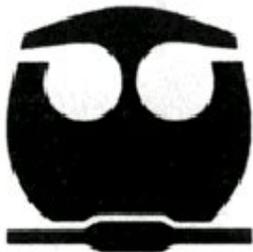
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A:

María Likhatcheva

Tutor: Dra. Martha Robles Flores



MÉXICO, D. F.

Agosto 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis abuelos, Vera Ramanovna Zarubina y Nikolay Nikitievich Alexandrov, por su amor, apoyo, comprensión y ejemplo de vida.

***“ESTUDIO DEL PAPEL QUE JUEGA EL FACTOR INDUCIBLE
POR HIPOXIA EN EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO
MALIGNO DE CÉLULAS HUMANAS DE COLON EN CULTIVO”***

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Marina Macias Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce y agradece la asesoría técnica y ayuda de Dra. María Cristina Castañeda Patlán en los experimentos.

Se reconoce la asesoría y ayuda de la maestra Paula Santoyo.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT 24778 y UNAM – PAPIIT IN213608 para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Macias Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Cancerología, UNAM
Suplente	Dra. Carmen Mejía Vázquez	Instituto de Biomédicas, UNAM

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	7
Capítulo 1. Introducción	8
1.1 Estructura del colon	8
1.2 Cáncer de colon	10
1.3 Factores inducibles por hipoxia	10
1.3.1 Regulación dependiente de oxígeno	13
1.3.2 Regulación independiente de oxígeno	16
1.4 HIF y cáncer	18
1.5 HIF-1α versus HIF-2α	21
1.6 c-Myc	24
1.7 Eje HIF – c-Myc	26
Capítulo 2. Justificación y Objetivos	32
2.1 Justificación e Impacto	32
2.2 Objetivo general	32
2.3 Objetivo particular	33
Capítulo 3. Hipótesis	33
Capítulo 4. Material y Método	34
4.1 Material Biológico	34
4.2 Anticuerpos	34
4.3 Obtención de extractos celulares y	
Separación de proteína por SDS-PAGE	35
4.4 Análisis por Western blot	35
4.5 Detección de lactato en cultivo celular	36
4.6 Ensayo de “knock-down” de HIF mediante siRNA	37
4.7 Análisis de expresión de HIF por citometría de flujo	38
4.8 Análisis de apoptosis por Anexina V	39
4.9 Ensayo de invasión (wound healing)	40
Capítulo 5. Resultados y discusión	41
Capítulo 6. Conclusiones	65
Referencias	68

Abreviaturas

Wnt	Determina el fenotipo “wingless” en <i>Drosophila</i>
TGF	Factor de crecimiento transformante
BMP	Proteína morfogénica ósea
APC	Adenomatous poliposis coli
HIF	Factor inducible por hipoxia
IPAS	Proteína con dominio inhibidor PAS
pVHL	Proteína von Hippel-Lindau
FIH	Factor inhibidor de HIF
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
Akt	Proteína cinasa B
mTOR	<i>Blanco de rapamicina en mamíferos</i>
IGF	Factor de crecimiento parecido a insulina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
MDM2	Minuto doble de ratón 2
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
PKC	Proteína cinasa C
RACK1	Receptor para la proteína cinasa C activada
VEGF	Factor de crecimiento endotelial-vascular
GLUT1	Transportador de glucosa 1
TCFα	Factor de necrosis tumoral α
MAX	Proteína X de asociación a MYC
MAD	Proteína de dimerización con MAX
Cdc25A	Homólogo A de división del ciclo celular

Cdk	Cinasa dependiente de ciclinas
Cyc	Ciclina
PDK1	Piruvato deshidrogenasa cinasa 1
Sp1	Proteína especifica 1
Nbs1	Nibrina
MRE11A	Proteína reparadora de doble hebra 11
RAD50	Proteína de reparación de DNA 50
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia

Resumen

El cáncer colo-rectal es el tercer tipo de cáncer mas común en el ser humano, probablemente debido a que la tasa de renovación del epitelio intestinal es muy alta haciéndolo susceptible a la transformación maligna.

Los factores inducibles por hipoxia (HIF's) son mediadores esenciales de las rutas de señalización sensibles a oxígeno de la célula que regulan múltiples fases de la tumorigénesis. Rutas de señalización mediadas por HIF tienen influencia en la adaptación metabólica, eritropoiesis, angiogénesis, tono vascular, crecimiento, diferenciación celular, sobrevivencia y apoptosis. Todos estos factores son críticos tanto en el desarrollo como en la fisiología de tumores malignos. HIF es un factor transcripcional heterodimérico compuesto de dos proteínas (subunidad α y subunidad β) de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS. En mamíferos existen tres genes que codifican subunidades HIF α : HIF-1 α , HIF-2 α (que son funcionales y se regulan de manera similar) y HIF-3 α cuyo papel fisiológico no se conoce del todo. Las subunidades HIF α , al igual que la subunidad HIF β , se transcriben y se traducen de manera constitutiva; pero a diferencia de HIF β , su vida media y su estabilidad dependen de la disponibilidad de oxígeno en la célula. Bajo condiciones de normoxia, las subunidades de HIF α tienen una vida media muy corta ya que son degradadas rápidamente vía ubiquitinación y actividad proteosómica mediada por el factor pVHL que es un componente del complejo ubiquitin ligasa E3. En condiciones de hipoxia, la proteína HIF α logra escapar de la lisis por proteosomas lo cual permite su acumulación y translocación al núcleo donde se dimeriza con HIF β . El heterodímero HIF α/β se une a la región HRE de las secuencias promotoras o de los "enhancers" de los genes blanco. Además de la ruta dependiente de oxígeno, la estabilidad y degradación de HIF α también se regula de manera independiente de oxígeno.

Se ha visto que HIF α puede estar sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer. La sobre-expresión de HIF α ocurre en el cáncer como una respuesta a estímulos tanto fisiológicos (hipoxia) como patológicos (mutaciones). Varios eventos característicos de la sobrevivencia tumoral como es la angiogénesis, la metástasis, la proliferación y el metabolismo glicolítico, están controlados por genes blancos de la ruta HIF.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el papel que juega el factor inducible por hipoxia en el mantenimiento del fenotipo maligno de las líneas celulares cancerosas de colon en cultivo (RKO, SW-480 y HT-29). Se vio que tanto HIF-1 α como HIF-2 α están sobre-expresadas y presentes en el núcleo de las líneas celulares estudiadas, aún en condiciones de normoxia. Se realizó un "knock-down" de estas dos proteínas mediante siRNA en la línea celular cancerígena de colon RKO y se vio que las células con el "knock-down" de HIF-1 α pero no HIF-2 α disminuyen la producción de lactato a comparación de la contraparte control. El lactato es el producto final de un metabolismo alterado conocido como el efecto Warburg que es uno de los sellos característicos de las células cancerosas. Este fenotipo no solo confiere ventajas adaptativas a ambientes hipóxicos de los tumores, sino que también impacta directamente la progresión maligna. Por otro lado también encontramos que las células con "knock-down" tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α tienen una tasa de apoptosis elevada en comparación con las células control, lo que sugiere que en esta línea celular de cancer de colon, HIF tiene un papel anti-apoptótico. Además también encontramos que tanto HIF-1 α como HIF-2 α están involucrados en la capacidad de migración e invasión de las células RKO.

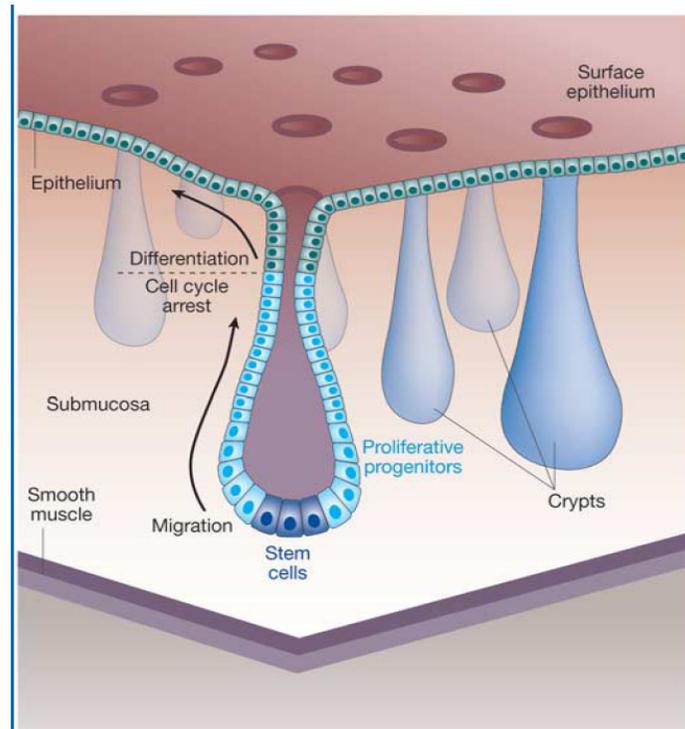
Los resultados de este trabajo indican que HIF es muy importante para el mantenimiento del fenotipo maligno de las células cancerígenas de colon estudiadas.

Capítulo 1. Introducción

1.1 ESTRUCTURA DEL COLON

El tracto intestinal de los mamíferos está formado por una monocapa de células epiteliales organizadas en una estructura bidimensional plegada en crestas y en invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn. Las células epiteliales del colon están sujetas a una continua renovación y se originan a partir de células troncales durante toda la vida del organismo. Así, en la base de las criptas proliferativas residen las células troncales las cuales dan origen a las células hijas que migran hacia arriba, después de experimentar dos o tres ciclos de división, las células se diferencian en linajes de absorción (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o *mucus*. Finalmente, al alcanzar la punta de las crestas intestinales, las células degeneran por apoptosis y son desprendidas en el lumen del intestino para su remoción [1,2]. La homeostasis del epitelio intestinal, por tanto, se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, por lo que representa un atractivo modelo para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares. La evidencia experimental actual indica que la ruta de señalización “Wnt” es la fuerza principal en el control de esta homeostasis, y que cuando está alterada se produce cáncer [1, 2]. (Fig. 1)

A)



B)

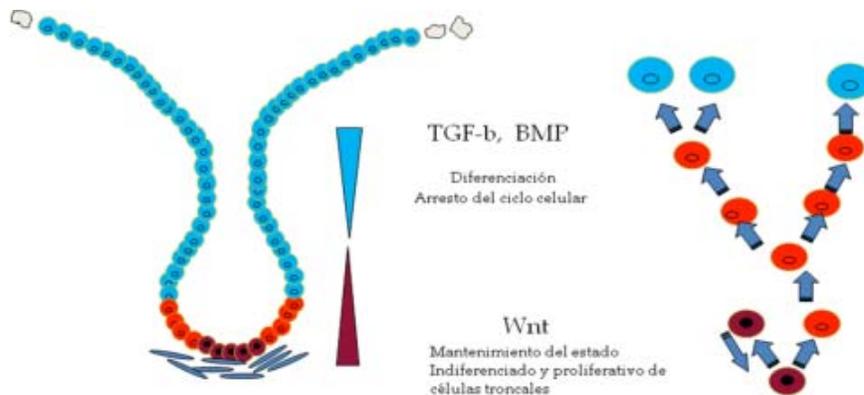


Fig.1. Estructura del tracto intestinal A) Estructura del intestino grueso en donde se ve que las células troncales residen en el fondo de las criptas. Las células progenitoras surgen por divisiones mitóticas y después de experimentar dos o tres ciclos de proliferación, van siendo empujadas hacia la parte superior de la cripta en donde se diferencian en dos linajes principales: secretor y absortivo. B) Las principales rutas de señalización que regulan el mantenimiento del estado indiferenciado (Wnt) y la diferenciación (TGF- β y BMP) se muestran a la izquierda y a la derecha se muestra cómo por división asimétrica se generan dos células hijas distintas: una célula troncal y otra progenitora que después de proliferar se diferencia [22].

1.2 CÁNCER DE COLON

Los tumores de tipo colorectal se encuentran entre las formas de neoplasias más frecuentes [3] probablemente debido a que la tasa de renovación del epitelio intestinal, a expensas de las células troncales, es extraordinariamente alta haciéndolo susceptible a la transformación maligna. Diversos estudios han demostrado que en un número abrumador de casos de cáncer colorectal se presentan mutaciones en proteínas que forman parte de la vía Wnt [3, 4], generalmente en la proteína supresora tumoral APC (Adenomatous Poliposis coli).

El cáncer colorectal (CRC) es el tercer tipo de cáncer más común. Está fuertemente asociado a componentes sociales y geográficos y en los países desarrollados llega a representar el 11% de todos los casos. Este tipo de cáncer se divide en dos categorías: el derivado de pólipos, con un componente hereditario (los pacientes con historia de poliposis adenomatosa familiar representan el 20% de los casos, en donde aproximadamente un 5-10% es una herencia autosómica dominante), y el cáncer colo-rectal espontáneo, nopoliposo [22].

1.3 FACTORES INDUCIBLES POR HIPOXIA (HIF's)

Los factores inducibles por hipoxia (HIF's) son mediadores esenciales de las rutas de señalización sensibles a oxígeno de la célula, que regulan múltiples fases de la tumorigénesis. Las rutas de señalización mediadas por HIF's tienen influencia en la adaptación metabólica, eritropoiesis, angiogénesis, tono vascular, crecimiento, diferenciación celular, sobrevivencia y apoptosis. Todos estos factores son críticos tanto

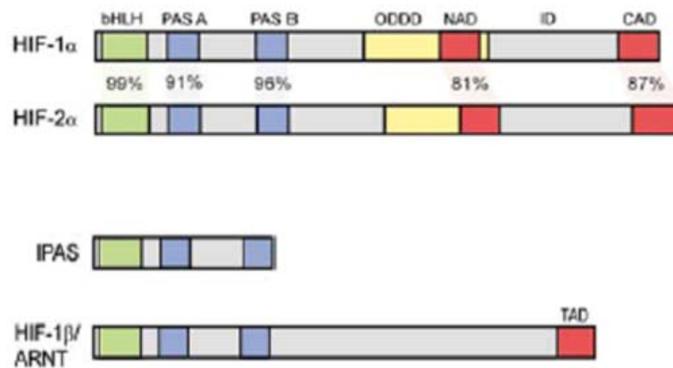
en el desarrollo como en la fisiología de tumores malignos [5, 6]. HIF se identificó originalmente como un regulador crucial de la expresión de la eritropoietina en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno [7]. Desde entonces, se ha encontrado que se asocia a un gran número de promotores de genes que regulan la respuesta al estrés de deficiencia de oxígeno.

HIF es un factor de transcripción heterodimérico compuesto de dos proteínas (subunidad alfa y subunidad beta) de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS (homólogo a Per-Arnt-Sim). Las subunidades HIF- α son reguladas por hipoxia. La hipoxia ocurre cuando las concentraciones de oxígeno disponibles en la sangre son menores del 5%. En mamíferos existen tres genes que codifican subunidades HIF α : HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α (Fig. 2A). Las tres subunidades alfa están codificadas en diferentes *locus* y bajo la regulación de diferentes promotores. Se sabe que HIF-1 α y HIF-2 α son funcionales y se regulan de manera similar, mientras que el papel fisiológico de HIF-3 α no se conoce del todo [8]. Un “splicing” alternativo de HIF-3 α genera la proteína IPAS (proteína con dominio inhibitorio PAS). La expresión de ésta es inducida por hipoxia y funciona como una asa de retroalimentación negativa de la ruta ya que se une a HIF- α impidiendo de esta manera que se forme el dímero HIF α / β funcional [9]. Las subunidades alfa se transcriben y se traducen de manera constitutiva, pero su vida media y su estabilidad dependen de la disponibilidad de oxígeno en la célula. Las subunidades α contienen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) único, que controla su estabilidad y degradación, al igual que dos dominios de trans-activación CAD (dominio trans-activacional C-terminal) y NAD (dominio trans-activacional N-terminal) [10].

La subunidad HIF-β (ARNT) también cuenta con tres isoformas funcionales las cuales son proteínas nucleares de expresión constitutiva no inducibles por cambios en las concentraciones de oxígeno. Mientras que ARNT1 y ARNT3 se expresan en todos los tejidos, ARNT2 es de expresión específica y está restringida a tejidos adultos del cerebro y los riñones [11 y 12] (Fig. 2A).

Las proteínas HIF cuentan con un dominio bHLH de unión al DNA y un dominio PAS de dimerización. Bajo hipoxia, el heterodímero α/β se une a una secuencia pentanucleica central [5'-(A/G)CGT(G/C)-3'] de los genes blanco, que se encuentra dentro de los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) de estos genes [11] (Fig. 2B)

A)



B)

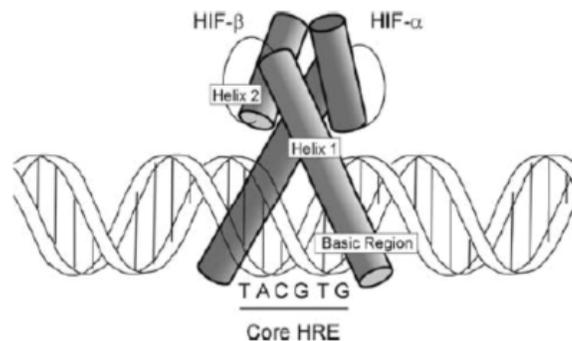


Figura 2. Estructura de los factores transcripcionales HIF. A) Se señalan los dominios y en algunos casos el porcentaje de identidad entre ellos: dominio de unión al DNA (bHLH), dominio de dimerización (PAS), dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), dominio de transactivación N-terminal (N-TAD) y el dominio de transactivación C-terminal (C-CAD). B) Dimerización de HIF y su unión a los elementos de respuesta a hipoxia en el DNA [21].

1.3.1 Regulación dependiente de oxígeno

Bajo condiciones de normoxia (la concentración fisiológica de oxígeno es de 4 – 40 μM), las subunidades HIF α se expresan constitutivamente, al igual que HIF β , pero a diferencia de esta HIF α tienen una vida media muy corta, ya que son degradadas rápidamente vía ubiquitinación y actividad proteosómica mediada por el factor pVHL (proteína von Hippel-Lindau), que es un supresor de tumores componente del complejo ubiquitina ligasa E3 [10]. El reconocimiento de HIF α por pVHL durante condiciones de normoxia, está mediado por la hidroxilación de dos residuos de prolina en HIF α catalizada por tres prolil hidroxilasas parálogas: PHD 1-3. Estas enzimas son dioxigenasas no-heme-Fe(II) que utilizan oxígeno y 2-oxoglutarato como co-sustratos y hierro y ascorbato como co-factores para romper moléculas de oxígeno. Un átomo de oxígeno es insertado en el péptido HIF- α en el residuo de prolina, mientras que el otro reacciona con 2-oxoglutarato dando lugar a succinato y CO₂ como productos [13]. Los residuos de prolina que se hidroxilan bajo condiciones de normoxia se encuentran dentro del dominio ODD de las subunidades alfa (prolina 402 y 564 en HIF-1 α humano y prolina 405 y 531 en HIF-2 α humano) [14] (Fig 3).

Bajo condiciones de hipoxia, la hidroxilación de prolina es suspendida, por lo tanto la proteína HIF- α logra escapar de la lisis por proteosomas lo cual permite su acumulación y translocación al núcleo en donde se dimeriza con HIF-1 β . La subunidad alfa cuenta con dos señales de localización nuclear: aminoácidos 17 – 33 dentro del dominio bHLH y aminoácidos 718 – 721 dentro del dominio CAD (para HIF-1 α), las cuales le permiten translocarse al núcleo y ahí formar el dímero funcional con HIF β [15]. El heterodímero HIF se une a la región HRE de las secuencias promotoras o de los “enhancers” de los genes blanco [6]. El heterodímero HIF activa la expresión de genes mediante el reclutamiento de cofactores (p300/CBP) (Fig 3).

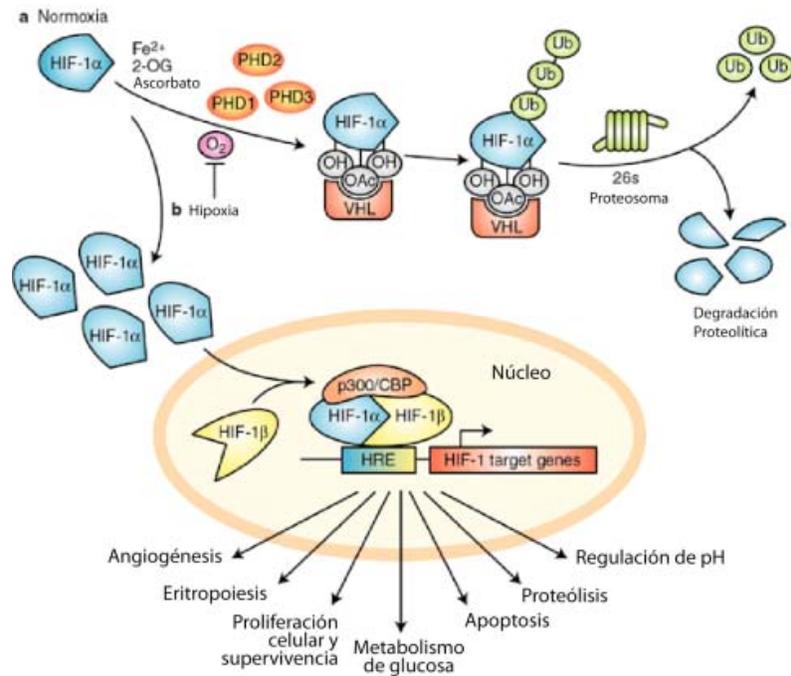


Figura 3. Regulación dependiente de oxígeno de HIF- α . En condiciones de normoxia la proteína HIF α es hidroxilada por la enzima PHD, lo cual señala su ubiquitinación y posterior degradación. Bajo condiciones de hipoxia las enzimas PHD se inactivan, HIF α se acumula y transloca al núcleo en donde se une con HIF β para formar el factor de transcripción activo. El factor de transcripción HIF regula la expresión de genes involucrados en: angiogénesis, eritropoiesis, metabolismo de glucosa, regulación de pH, metástasis e invasión entre otras.

Las interacciones entre HIF y los cofactores de transcripción también es regulada de manera dependiente de oxígeno, por una asparagil-hidroxilasa FIH. FIH usa oxígeno para hidroxilar la asparagina (Asn 803 en HIF-1 α y Asn 851 en HIF-2 α humano) dentro del dominio transcripcional C-terminal (CAD), impidiendo de esta manera la unión de p300. En contraste con la hidroxilación de prolina que inhabilita la interacción proteína-proteína, la hidroxilación de asparagina evita el reclutamiento de proteínas co-activadoras de la transcripción [16] (Fig 4).

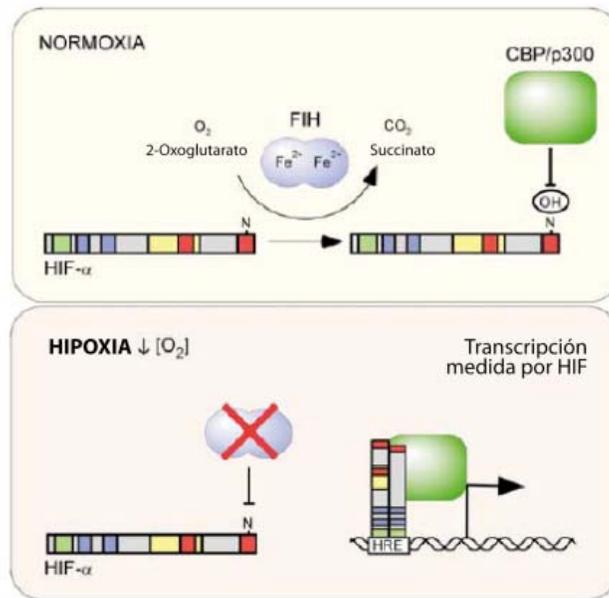


Figura 4. Regulación de HIF por proteína inhibidora de HIF (FIH). La enzima FIH en presencia de oxígeno hidroxila un residuo de asparagina dentro del dominio CAD lo cual impide la unión de co-activadores de transcripción como p300/CBP. En condiciones de hipoxia esta enzima es inactivada lo cual permite el reclutamiento de co-activadores y por ende la activación completa del factor transcripcional HIF [21].

Las dos enzimas sensoras de oxígeno, PDH y FIH, cuentan con Km diferentes; FIH tiene una afinidad más alta por el oxígeno ($K_m = 90 \mu\text{M}$) mientras que las PHD tienen una afinidad más baja ($K_m = 250 \mu\text{M}$). Debido a esto, las PHD se van a inactivar como una primera respuesta a hipoxia permitiendo la estabilización de la proteína HIF α , mientras que la enzima FIH va a seguir funcionando limitando la actividad transcripcional de HIF. A medida que las condiciones de hipoxia aumenten, y las concentraciones de oxígeno disponible disminuyan, FIH también se inactivará, permitiendo de esta manera una completa activación de HIF como factor transcripcional [17]. Tomado en cuenta esto y resaltando que FIH hidroxila un residuo de asparagina dentro del dominio CAD y no del TAD, se ha sugerido que los dos dominios de transactivación tienen diferentes funciones. En apoyo a esto, se ha visto que el dominio TAD es el que define la especificidad de los genes blanco de HIF-1 α y HIF-2 α [18] (Fig5).

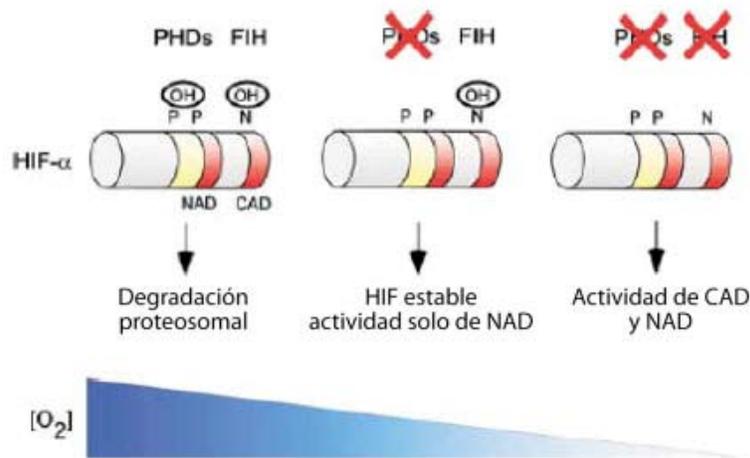


Figura 5. Activación secuencial de los dominios de transactivación de HIF α en respuesta a las concentraciones de oxígeno. A medida que las concentraciones de oxígeno disminuyen, las enzimas PHD del citosol pierden primero su actividad catalítica, pero FIH sigue hidroxilando e inhibiendo el dominio CAD en el núcleo. Esto lleva a la estabilización de la proteína HIF α y a la activación de solo uno de sus dominios de transactivación, TAD. Cuando las concentraciones de oxígeno disminuyen aún más, FIH es inactivado lo cual permite la activación del dominio CAD y la completa activación del factor de transcripción HIF [21].

1.3.2 Regulación independiente de oxígeno

Además de la ruta dependiente de oxígeno, la estabilidad y degradación de HIF α también se regula de manera independiente de oxígeno. Con respecto a esto, se ha visto que las proteínas HIF α pueden ser estabilizadas de manera dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS). La inhibición de la producción de ROS por parte de la mitocondria bloquea la estabilización de las proteínas HIF α . Aunque todavía no se sabe de manera concreta cómo se da esta inhibición, se ha visto que elevados niveles de H₂O₂ inhiben a las PHD ya que disminuyen la disponibilidad de Fe²⁺, que es necesario para la hidroxilación. [19]. Estudios genéticos muestran que la perturbación del complejo III (citocromo c) de la cadenas transportadora de electrones, también bloquea la estabilización de HIF α , pero que la perturbación del complejo IV de esta cadena no tiene el mismo efecto. Estos datos sugieren que la respiración no es requerida para la

estabilización de HIF α pero que el paso de electrones al citocromo c sí lo es. Esto vuelve a señalar la importancia de ROS y no tanto del consumo de oxígeno [20].

Existe evidencia de que la vía PI3K/Akt regula la actividad de HIF de una manera dependiente de mTOR, y que mTOR regula la traducción del mRNA de HIF α [23]. Muchos factores de crecimiento tienen efectos positivos en el sistema HIF. La síntesis de la proteína HIF α puede ser inducida por diferentes hormonas, factores de crecimiento y citocinas, como la insulina, factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) y PDGF. P42/44 (Erk1/2) son cinasas activada por mitógenos (MAPK) que han sido implicadas en la fosforilación de HIF α dentro de los dominios de transactivación, lo que permite que los coactivadores CBP y p300 se unan con mayor afinidad a HIF [24 y 25] (Fig. 6).

Además de la vía de ubiquitinación mediada por pVHL, se ha visto que existe otra manera, independiente de pVHL, de ubiquitinación de la subunidad α y su consecuente degradación. El supresor tumoral p53 es capaz de unirse a HIF α , esta unión recluta a MDM2, una ubiquitin ligasa, lo cual resulta en su degradación proteosomal. Congruente con esto se ha visto que la pérdida de p53 en células tumorales aumenta los niveles de HIF α [26] (Fig. 6).

En el citoplasma, HIF α está unido a la proteína de choque-térmico 90 (heat shock protein 90, Hsp90) y esta asociación promueve la estabilidad de la subunidad alfa. Cuando la proteína Hsp90 es desplazada por sus inhibidores, el receptor de la proteína cinasa C activado (RACK1) se puede unir a HIF α lo cual promueve la unión de la maquinaria de ubiquitinación y potencia de esta manera la degradación de HIF α [27].

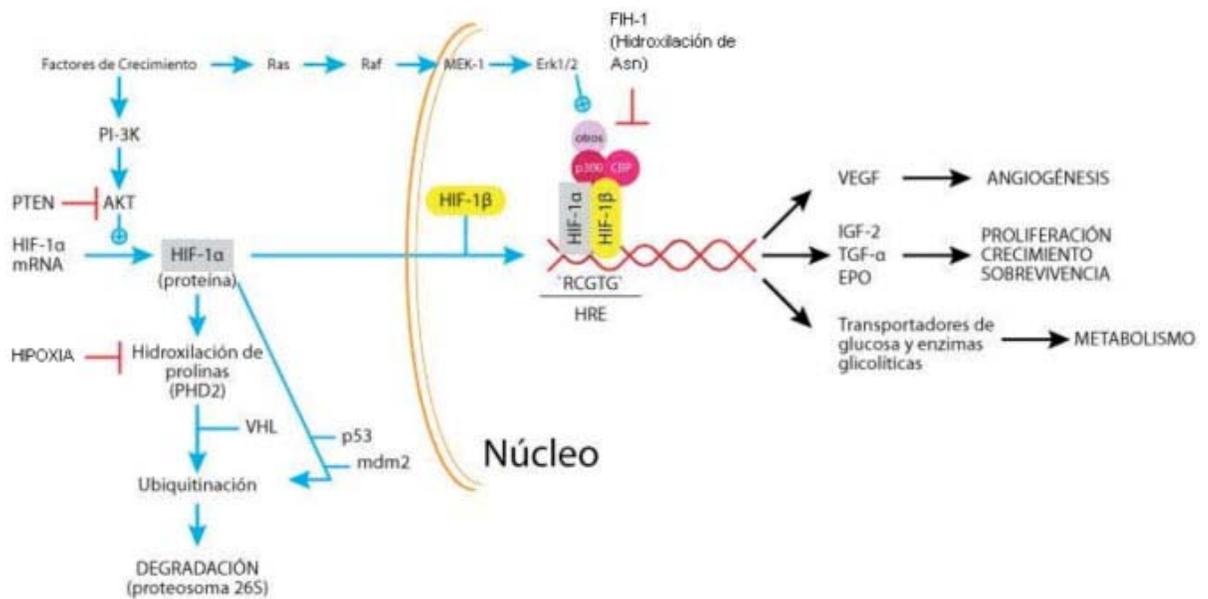


Figura 6. Diferentes niveles de regulación de HIF. Además de la regulación dependiente de oxígeno se muestra como esta proteína se puede regular de manera independiente de oxígeno.

1.4 HIF Y CÁNCER

Varios eventos característicos del desarrollo y la supervivencia tumoral como es la angiogénesis, la metástasis, la proliferación y el metabolismo glicolítico, están controlados por genes blanco que a su vez responden a la activación dependiente de HIF [28]. La adaptación a hipoxia parece ser un paso importante en la progresión tumoral. Una importante adaptación a hipoxia es el efecto Warburg: reducida oxidación mitocondrial, una glucólisis aumentada y producción excesiva de ácido láctico, aún bajo condiciones aeróbicas (Fig. 7). Esto favorece la supervivencia en los microambientes con hipoxias frecuentes encontrados en los tumores, e impacta directamente en la progresión maligna. El efecto Warburg representa una de las características más universales de los tumores sólidos [5]. De hecho, esta característica se ha aprovechado

para el diagnóstico de pacientes con cáncer mediante el PET (Tomógrafo por emisión de positrones) al incorporar las células malignas ávidamente [^3H]-2-D-glucosa.

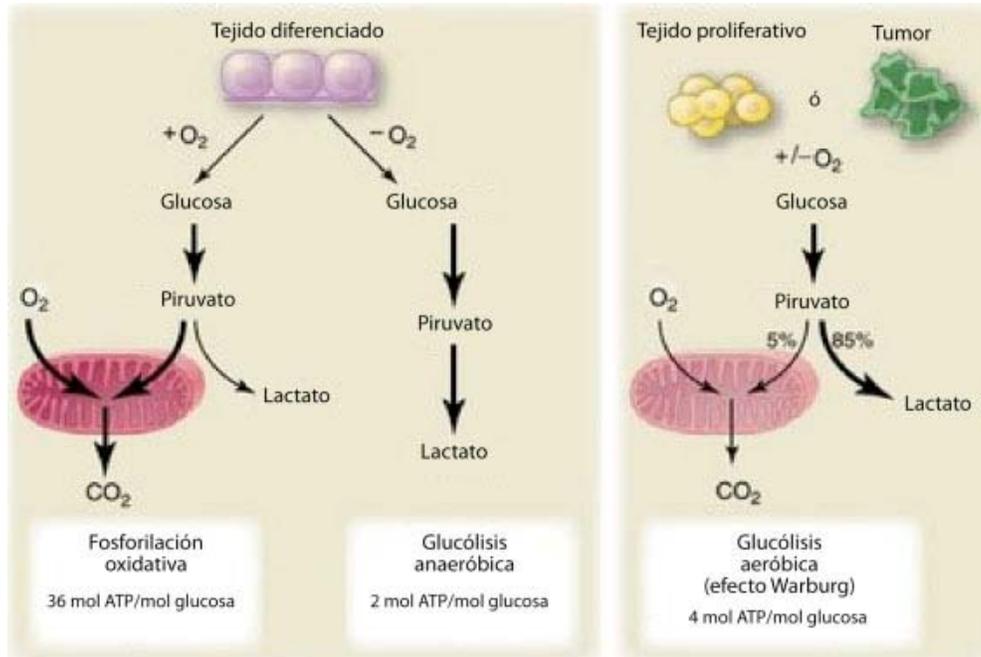


Figura 7. El efecto Warburg. Característico, prácticamente, de todos los tumores sólidos. Consiste en una reducida oxidación mitocondrial, una glucólisis aumentada y producción excesiva de ácido láctico, aún bajo condiciones aeróbicas [5].

La metástasis es una característica decisiva del cáncer y también es promovida por la hipoxia tumoral. Es un proceso coordinado en donde las quimiocinas dirigen la migración celular, las moléculas de adhesión promueven el anclaje en diferentes órganos y las proteasas y otras enzimas secretadas, degradan o alteran la matriz extracelular. Estudios en cáncer de mama, riñón y colon muestran que el receptor de quimiocinas CXCR4, un mediador de metástasis, es inducido por HIF [29]. Por otro lado, también se ha observado en tejidos epiteliales de pulmón que las metaloproteinas de matriz (MMP) 2 y 9 también son reguladas por hipoxia [30]. Otro mediador de la metástasis es la lisil oxidasa; esta enzima altera los componentes de la matriz extracelular como la elastina y el colágeno, y su inhibición bloquea *in vitro* la migración

e *in vivo* la metástasis desde el xenógrafo subcutáneo o después de la inyección en la vena de la cola en ratón. Esta enzima también es inducida por HIF [31].

La sobre expresión de HIF- α ocurre en el cáncer como una respuesta a estímulos tanto fisiológicos (hipoxia) como patológicos (mutaciones). La actividad de HIF puede ser inducida en células tumorales mediante la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt o la pérdida de pVHL [21]. Las alteraciones en las rutas metabólicas que afectan la actividad de las PHD también puede promover la estabilización de HIF α en normoxia. Como ya se mencionó anteriormente, las enzimas PHD requieren de 2-oxoglutarato como sustrato y ácido ascórbico como co-factor para catalizar la hidroxilación de HIF α , y como producto de esta reacción obtenemos succinato y bióxido de carbono además de la hidroxilación de los residuos de prolina. La inactivación de la fumarato hidratasa promueve la estabilización de HIF α debido a la inhibición de las PHD por el fumarato, el cual compite con el 2-oxoglutarato por la unión al sitio activo. Esto se ha visto en cánceres renales hereditarios. De manera similar, la inactivación de la succinato deshidrogenasa, que ocurre en algunos cánceres renales, de tiroides y de colon, conlleva a la acumulación de succinato y a la inhibición de las PHD [32].

La traducción de RNAm de HIF α es mediada por mTOR, como ya se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, la expresión de HIF α en normoxia puede ser promovida por fallas en la regulación de mTOR; un aumento en la traducción de esta proteína sin sufrir cambios en su degradación, da como resultado un aumento neto en la cantidad de proteínas HIF α presentes en la célula. Esto ocurre de manera frecuente en todos los tumores que presentan una hiperactivación de los receptores tirosina-cinasa, y por ende de la traducción, al igual que en tumores que presentan otras mutaciones que afecten la vía mTOR [33].

Además de sus genes blancos directos, HIF puede regular a los factores transcripcionales Notch y c-Myc. Se ha visto que HIF-1 α necesita a Notch y a sus genes blanco en modelos de diferenciación inducida por hipoxia en músculo y en células neuronales. HIF-1 α interactúa de manera directa con el dominio intracelular de Notch1, aumentando su vida media y su actividad transcripcional [34]. Por otro lado, y como se va explicar con más detenimiento posteriormente, HIF-1 α inhibe directamente a c-Myc causando la activación de p21 y p27. Los blancos de c-Myc involucrados en la reparación “mismatch” del DNA (mal apareamiento del DNA) también son modulados por HIF-1 α , sugiriendo de esta manera que HIF está involucrado en la inestabilidad genética inducida por hipoxia. HIF-2 α , por otro lado, parece tener un efecto totalmente diferente en c-Myc. Se ha visto que HIF-2 α promueve la actividad transcripcional de c-Myc [35 y 36].

La sobre expresión de HIF se ha detectado en más del 90% de cánceres de colon, pulmón y próstata analizados, mientras que no se detecta expresión en los tejidos normales correspondientes. HIF parece ser esencial para la vascularización y otros aspectos de la progresión tumoral [37].

1.5 HIF-1 α VERSUS HIF-2 α

Los dímeros HIF1 α /ARNT y HIF2 α /ARNT son los principales factores que regulan la respuesta a hipoxia. Las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α tienen muchas similitudes tales como la estructura funcional de sus dominios, ya que ambas contienen el dominio de unión a DNA, el de dimerización en su extremo N-terminal y el dominio de transactivación C-terminal. El extremo C-terminal también es similar entre estas dos

proteínas y está subdividido en un dominio de activación N-terminal (NAD), que se sobrepone con el dominio ODD, y un dominio de trans-activación C-terminal (CAD). [38]

HIF-1 α y HIF-2 α exhiben homologías significativas en varias regiones: comparten un 85 y 70% de identidad en sus dominios de unión a DNA y dominio de dimerización, respectivamente. Los aminoácidos que rodean los dos residuos de prolina sensibles a oxígeno (30 aa) son altamente conservados entre las dos subunidades α (70% de similitud). El dominio CAD comparte un 69% de identidad mientras el dominio TAD un 40%. [39] (Fig. 2A). Estas homologías proporcionan la base molecular para explicar varias propiedades comunes de HIF-1 α y HIF-2 α . Los dos usan a ARNT (HIF β) como compañero de dimerización, la estabilidad de las dos proteínas se regula de manera similar dependiente de oxígeno, y la actividad transcripcional del dominio CAD en los dos casos es regulada por FIH. En estudios recientes se ha demostrado que HIF-1 α y HIF-2 α regulan la expresión de genes tanto comunes como específicos de cada subunidad. Los genes que codifican para las enzimas glicolíticas como la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), fosfoglicerato cinasa (PGK), lactato deshidrogenasa A (LDA), entre otros, son regulados de manera específica por HIF-1 α . Mientras que otros genes son específicos de HIF-2 α , como Oct4, ciclina D1 (CycD1), el factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β), entre otros. Pero la mayoría de los genes blanco de HIF son regulados tanto por HIF-1 α como por HIF-2 α , incluyendo al gen que codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el transportador de glucosa 1 (GLUT1) [40] (Fig. 8).

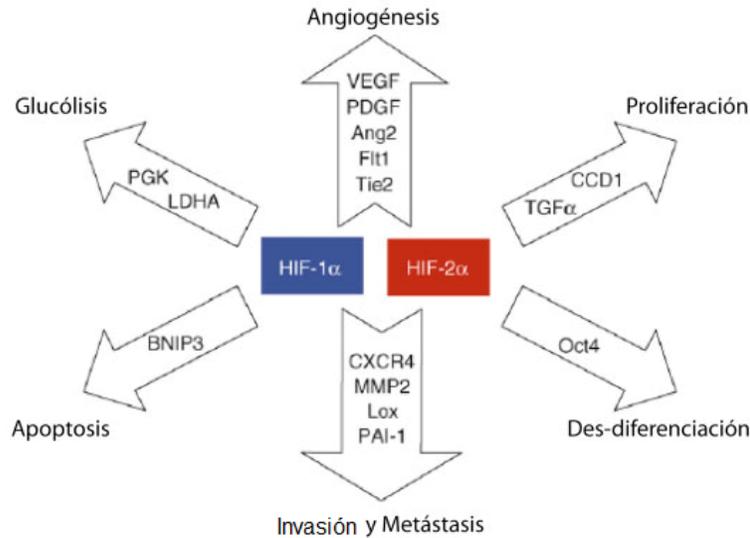


Figura 8. HIF-1α vs HIF-2α. Los genes específicos HIF-1α están involucrados en la glicólisis y apoptosis, mientras que los genes específicos de HIF-2α regulan la proliferación y la diferenciación. Las dos proteínas regulan la transcripción de genes involucrados en angiogénesis, invasión y metástasis.

Se ha reportado que el dominio TAD es el que confiere la especificidad de genes blanco mientras que el dominio CAD promueve la expresión de genes comunes para HIF-1α y HIF-2α. [38]. También se ha visto que la expresión de las dos subunidades es dependiente de tejido al igual que la regulación de la transcripción de genes blanco. Mientras que HIF-1α se expresa de manera más frecuente en todos los tejidos, la expresión de HIF-2α es tejido específica. La expresión de HIF-2α se limita al endotelio, riñón, corazón, pulmón, epitelio gastrointestinal y a algunas células del sistema nervioso central [41]. En algunos tejidos, HIF-1α puede regular de manera preferencial la expresión de unos genes, mientras que en otros tejidos esos mismos genes son regulados de manera preferencial por HIF-2α. Por ejemplo, la expresión de Glut-1 en las células Hep3B (células de hepatoma humano) y en las células troncales embrionarias de ratón, está regulado por HIF-2α, mientras que en las células 786-O (células de carcinoma de hígado) y en las células WT8 (células de carcinoma renal) es regulado por HIF-1α. [38 y 42]

Los estudios “knockout” de HIF-1 α en ratón, muestran un mal desarrollo cardiovascular y letalidad en E10.5 [43 y 44]. Mientras que la pérdida de HIF-2 α conlleva a una serie de fenotipos, dependientes del contexto genético del ratón, incluyendo la letalidad embrionaria debida a defectos vasculares y de bradicardia, letalidad perinatal debida a la incorrecta maduración de pulmones, y la letalidad embrionaria y postnatal causada por un falla de órganos múltiple y disfunción mitocondrial [45 y 46].

Las diferencias de los genes blanco y de los fenotipos de ratones “knockout” sugieren que HIF-2 α promueve un fenotipo distinto en los tumores que lo expresan que en los tumores que expresan solo HIF-1 α . Esto ha sido observado en tumores del sistema nervioso central, colo-rectales, de pulmón y de cabeza y cuello, en donde la expresión de HIF-2 α está más fuertemente asociada al mal pronóstico en pacientes que la expresión de HIF-1 α . También se ha visto que HIF-2 α de manera preferente promueve la tumorigénesis debido a un aumento en la proliferación; probablemente por una aumentada expresión de TCF α y CycD1 (ciclina D1) [47]. Además de que HIF-2 α , como se describe posteriormente colabora con c-Myc.

1.6 c-MYC

Como se mencionó en la introducción, la ruta de señalización Wnt es la fuerza principal en el control de la homeostasis del epitelio intestinal, y cuando está alterada se produce cáncer. Los programas de expresión génica generados por los ligandos Wnt están involucrados en proliferación, al promover la transcripción de genes tales como c-

Myc y CycD1. c-Myc es un proto-oncogene que fue identificado como blanco de la vía Wnt en estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer de colon y en el epitelio de las criptas intestinales tras la delección de APC *in vivo* [48 y 49]. En la homeostasis intestinal, Myc es esencial en la formación de las criptas intestinales y al ser un gen bajo el control Wnt (TCF4-βcatenina) en intestino, se asocia con el mantenimiento de las células troncales madre [50]. Myc es un factor transcripcional que regula más del 15% de los genes en el genoma, actúa como un regulador global de transcripción para grupos de genes involucrados en apoptosis, regulación del ciclo celular, metabolismo, biogénesis ribosomal, síntesis de proteínas, función mitocondrial, adhesión celular, reparación de DNA y angiogénesis.

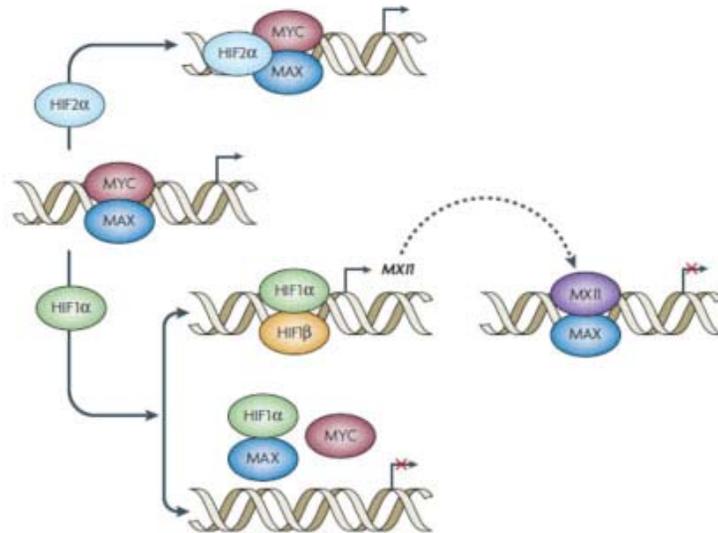
Myc es un factor transcripcional con una estructura hélice-giro-hélice zipper de leucina, que forma un heterodímero con otra proteína, proteína X de asociación a Myc (MAX), que a su vez está bajo una regulación rigurosa por una serie de interacciones proteína-proteína con MAD (MXD1; proteína de dimerización con MAX y MAD2 (MXII; interactor MAX 1). Después de su dimerización, Myc-MAX se unen a sitios específicos del DNA, cajas E, para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco [51]. Myc está implicado en el control de la proliferación celular, muerte celular programada, diferenciación y activa todos los genes involucrados en la glucólisis. Responde a señales de crecimiento en fase G1 activando la transcripción de genes que inducen la progresión del ciclo celular como: Cdc25A, Ciclinas D1, D2, E, A, cinasas dependientes de ciclinas tales como Cdk1, Cdk2, Cdk4 y además E2F. La expresión de c-Myc está ausente en células quiescentes pero se induce rápidamente al adicionar factores de crecimiento. Muchos estudios han mostrado un papel de c-Myc en el aumento de la expresión de CycE y A, al igual que en el mantenimiento de la actividad de cinasa de CycE/Cdk2 por la inducción de una proteína no identificada que secuestra

a p27 (CKI) lo que permite que el complejo CycE/Cdk2 permanezca activo y por ende la progresión del ciclo celular (G1 a S) [52].

1.7 EJE HIF – cMYC

En años recientes se ha reportado que HIF-1 α y HIF-2 α interaccionan de varias maneras con el factor transcripcional c-Myc. Por un lado, en estado celular normal (no maligno), en el que existe una expresión baja de c-Myc, HIF-1 α antagoniza las funciones de c-Myc y promueve arresto celular. HIF-1 α compite con c-MYC por la unión a MAX, impidiendo de esta manera la formación del complejo activo MAX/MYC. En células cancerosas, en donde c-Myc se sobre-expresa, HIF-1 α no logra inhibir su función por la cantidad elevada de c-MYC que existe, y estos dos factores transcripcionales cooperan dándole muchas ventajas adaptativas de supervivencia a las células cancerígenas. En contraste, se ha reportado que HIF-2 α siempre favorece las acciones mediadas por c-Myc tanto en condiciones normales como oncogénicas (Fig. 9) [51].

A) Condiciones fisiológicas



B) Condiciones oncogénicas

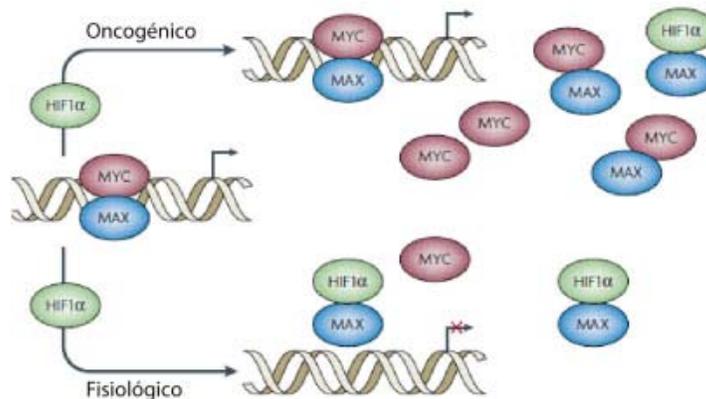


Figura 8. Interacción proteína-proteína de c-Myc, HIF1 α y HIF2 α ; sistema transcripcional. A) *Condiciones Fisiológicas:* Mientras que HIF-2 α estabiliza y promueve la formación del complejo MYC-MAX, promoviendo de esta manera la activación de genes regulados por c-Myc, HIF-1 α antagoniza las acciones mediadas por MYC al unirse a MAX impidiendo la formación del complejo activo MYC-MAX. Además, HIF-1 α induce la expresión de MAX11, un antagonista de c-MYC. B) *Condiciones oncogénicas:* cuando c-MYC está sobre expresado, el antagonismo ejercido por HIF-1 α queda anulado por la ley de acción de masas, ya que los niveles altos de la proteína MYC mantienen el heterodimero MYC-MAX activo en mayor proporción [51]. En estas condiciones, HIF-2 α continúa favoreciendo las acciones mediadas por el complejo MYC-MAX.

La expresión desregulada del oncogén Myc ocurre en un 30% de los cánceres humanos como es el de colon, próstata y mama. A pesar de que la respuesta fisiológica a HIF-1 α puede inhibir la actividad de MYC normal, la sobre-expresión del oncogén MYC colabora con HIF para establecer el efecto Warburg. Cuando MYC es sobre expresado, la estequiometría normal en juego entre los niveles de MYC y HIF normales ya no es relevante; HIF-1 α ya no logra impedir la unión de c-MYC con MAX y por ende no logra inhibir su función. Por otro lado también se ha encontrado que los niveles altos de MYC se unen a una nueva serie de genes blanco, sugiriendo que el comportamiento de MYC depende de sus niveles. [51]

De manera similar a Myc, HIF-1 α activa virtualmente a todos los genes involucrados en la glucólisis. Tanto HIF-1 α como c-Myc inhiben activamente la respiración mitocondrial. Esto lo hacen induciendo a la piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDK1), que fosforila e inactiva al complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA (Fig, 10) [51].

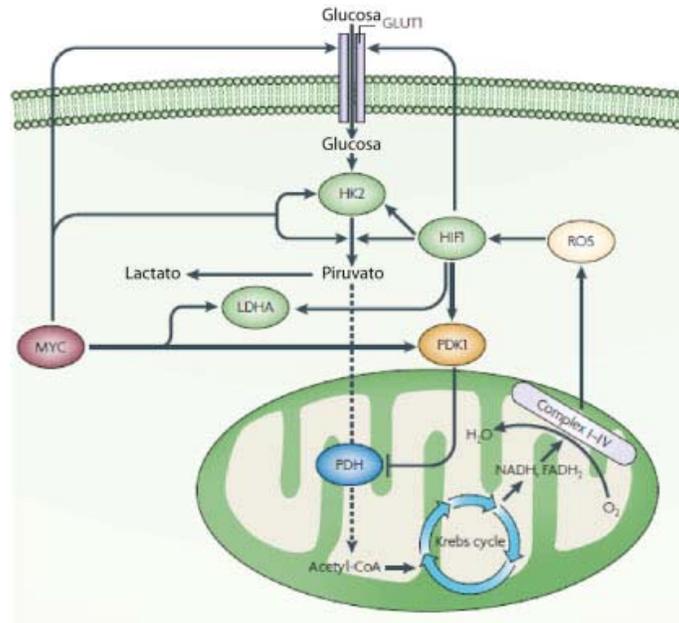


Figura 10. Aspectos moleculares de las interacciones de MYC-HIF-1 α . HIF-1 α y MYC colaboran para establecer el efecto Warburg; aumentan el consumo de glucosa induciendo la expresión del transportador de glucosa GLUT1, inducen la expresión de hexocinasa 2 (HK2) lo que aumenta la tasa de la glucólisis, se inhibe la conversión de piruvato a acetil-coA por la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa y es inducida la conversión de glucosa a lactato por la expresión de la lactato deshidrogenasa A (LDHA) [51].

En condiciones hipóxicas, la glucólisis reemplaza a la fosforilación oxidativa, y la proliferación celular se detiene a través de la inducción de inhibidores de los complejos Cyc/Cdks (CKIs). HIF1 α es requerido para el arresto celular a través de la inducción de p21 por una interacción directa entre HIF-1 α y Myc. La interacción HIF-Myc libera a MIZ1, un miembro de la familia POZI/dedos de Zn de factores de transcripción, de la inhibición por Myc para estimular la expresión de p21 [36 y 52].

Además de los efectos en el ciclo celular, se ha reportado que HIF-1 α libera al factor transcripcional Sp1, que es requerido para la activación del promotor por el complejo MYC/MAX, y esto inhibe a los genes blanco estimulados por c-Myc; MSH2, MSH6 y síndrome de ruptura Nijmegen 1 (NBN), que están involucrados en la

respuesta al daño en el DNA. La inhibición de estos genes blanco de c-Myc a través de la unión de HIF-1 α a Sp1 está implicada en la estimulación de la inestabilidad genómica inducida por hipoxia [35, 36 y 53] (Fig. 11).

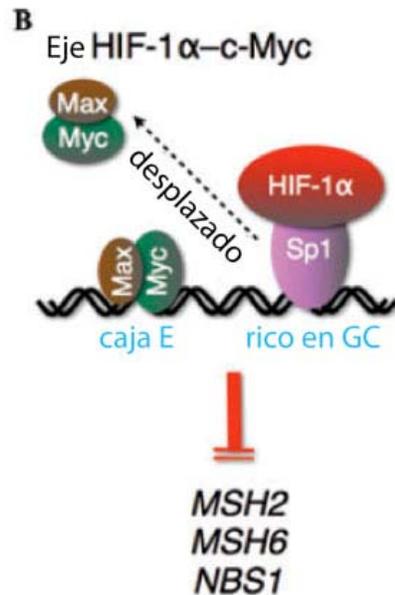


Figura 11. Inhibición de genes involucrados en la reparación del DNA. HIF-1 α compete con el complejo MYC-MAX por la unión a Sp1. La unión de HIF-1 α a Sp1 inhibe la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA como MSH2, MSH6 y NBS1.

La sustitución de los residuos V317, A321 y T327 del dominio PAS-B de HIF-1 α por los residuos correspondientes de HIF-2 α involucrados en suprimir la actividad dependiente de la unión a Sp1, provee una explicación a la inhabilidad de HIF-2 α para reprimir los genes de reparación de DNA. Las mutantes VAT de HIF-1 α pierden la habilidad de inhibir la expresión de Msh2 y Nbs1, y las mutaciones recíprocas en HIF-2 α resultan en una ganancia de función para la represión de genes [53].

Msh2 y msh2 son subunidades de MutS α , que reconoce mal apareamiento en el DNA. Forman un componente esencial del sistema humano de reparación de mal apareamiento (mismatch) de bases, que cuida la integridad genómica corrigiendo los

errores en la replicación de DNA y bloqueando los eventos de recombinación entre secuencias de DNA divergentes. NSB1/nibrina es parte de un complejo muy conservado de MRE11A-RAD50-NSB1 que interacciona con las rupturas en las dos cadenas de DNA en las etapas tempranas de respuesta a daños. Muchas evidencias señalan que las mutaciones de estos genes en las líneas germinales son el factor causal asociado con el cáncer de colon no-poliposo y con el síndrome de Nijmegen causante de cáncer [36]. HIF-1 α también induce de manera directa a MAD2 (MXI1), que compite y se une a MAX, antagonizando la función de MYC. Un estudio reciente sugirió otro mecanismo por el cual HIF-1 α inhibe la función de MYC por la unión a MAX y por lo tanto desplazando a MYC. [51]

A diferencia de HIF-1 α , HIF-2 α colabora con Myc uniéndose y estabilizando el heterodímero MYC-MAX. Este modelo requiere validación por estudios biofísicos más precisos del complejo MYC-MAX-HIF2 α . Parece ser razonable que HIF-2 α tenga efectos estimulatorios sobre MYC, ya que las células endotheliales, donde HIF-2 α se descubrió por primera vez, pueden proliferar bajo hipoxia. Es más difícil de entender el significado fisiológico de la colaboración de HIF-2 α y MYC en otros tejidos que expresan HIF-2 α . Debido a efectos aparentes opuestos de HIF-1 α y HIF-2 α en MYC, cómo MYC es modulado en células que expresan tanto HIF-1 α como HIF-2 α no se sabe todavía. [51]

La cooperación de MYC-HIF en cáncer, bien podría ser explotada con fines terapéuticos inhibiendo genes blanco que son comunes para c-Myc y para HIF.

Capítulo 2. Justificación y Objetivos

2.1 JUSTIFICACIÓN E IMPACTO

Existe evidencia experimental que indica que durante la tumorigénesis se induce la expresión de genes modulados por HIF. Uno de los sellos característicos de las células cancerosas es el de tener una actividad metabólica caracterizada por una alta tasa glucolítica y reducida oxidación mitocondrial que favorecen su supervivencia en los microambientes con hipoxias frecuentes encontrados en los tumores. Dado que se ha visto que este fenotipo no sólo confiere ventajas de supervivencia a las células malignas sino que impacta directamente a la progresión maligna, puede ser “el tendón de Aquiles” de las células cancerosas. Por tanto, conocer los mecanismos moleculares por los cuales el HIF controla las ventajas fenotípicas malignas, nos permitiría utilizar esta información como herramienta para eliminar selectivamente a las células cancerosas.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel que juega el factor inducible por hipoxia en el establecimiento del fenotipo maligno de líneas celulares cancerosas de colon en cultivo.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Examinar la expresión de HIF1 α y HIF2 α y c-Myc tanto en las células normales (no malignas) como en las cancerosas.
- 2.** Examinar el tipo de metabolismo de glucosa presente en las células normales en comparación con las células cancerosas.
- 3.** Bloquear la expresión de HIF1 α y de HIF2 α mediante knockdown con siRNA.
- 4.** Examinar los efectos del bloqueo de la expresión de HIFs en el metabolismo celular, en la capacidad de invasión de las células, y en la resistencia a apoptosis.

Capítulo 3. Hipótesis

Si HIF es esencial para mantener el fenotipo maligno de las células cancerosas de colon, entonces el bloqueo de su expresión producirá efectos negativos en éste tales como disminución de la proliferación celular, cambios en la resistencia a apoptosis, cambios en el metabolismo de glucosa y cambios en la capacidad invasiva de las células cancerosas.

Capítulo 4. Materiales y Métodos

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron las líneas celulares no malignas, tanto de colon humano normal (112 CoN) como de intestino de rata (IEC-18), y las líneas de carcinoma de colon humano (RKO, HT-29 y SW480) adquiridas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, E.U.). Estas líneas se cultivan en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina, con excepción de las células HT-29, que se mantienen en medio McKoy con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina.

4.2 ANTICUERPOS

Para los estudios de Western blot y tinción intracelular, los anticuerpos primarios dirigidos contra HIF-1 α y HIF-2 α utilizados fueron obtenidos de Millipore (HIF-1 α Q16665 y HIF-2 α Q99814) los dos son anticuerpos monoclonales de ratón y se utilizaron en una dilución 1:1000. Para la detección de c-Myc se utilizó un anticuerpo monoclonal (Santa Cruz c-Myc (C-33): sc-42) a una dilución también de 1:1000. Para actina se utilizó un anticuerpo monoclonal, obtenido por el Dr. Manuel Hernandez del CINVESTAV, a una dilución de 1:500.

4.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

Los extractos celulares se obtuvieron a través del siguiente procedimiento: la monocapa de células se lavó dos veces con PBS (1mL), después se le agregó 1 mL de buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150mM, a pH 7.5 adicionado con 0.5% Triton X-100, leupeptina 1 μ M, PMSF 1mM e inhibidor de tripsina 0.1mg/mL) y se incubaron en agitación por 30 min a 4°C. Se colectaron los lisados en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se tomó una alícuota para la cuantificación de proteína por el método de Bradford (BioRad). Al sobrenadante se le agregó buffer de muestra de electroforesis (Leammli 2x). La extracción de proteínas nucleares se realizó mediante el kit comercial adquirido de Sigma siguiendo el protocolo sugerido. Cantidades iguales de proteína (50-75 μ g) se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 75 min a 160 mA.

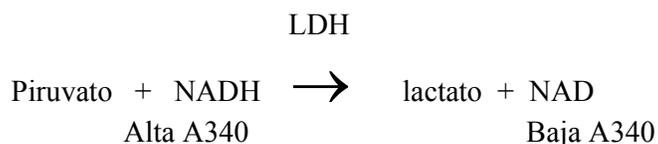
4.4 ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se hizo el bloqueo de la membrana con 5% de leche (libre de grasa adquirida de Bio-Rad) en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente; la incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C o durante 2 horas a

temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TBS-Tween dos veces por 5 min y se incubaron con un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron por quimioluminiscencia mediante el kit comercial de Supersignal de Pierce. La intensidad de las señales se analizó por densitometría mediante un programa adquirido de Bio-Rad (Quantity one). Los datos de por lo menos tres experimentos independientes se compararon estadísticamente mediante una *t* de student tomando como valores significativos una $p < 0.05$.

4.5 DETECCIÓN DE LACTATO EN EL CULTIVO CELULAR.

La cantidad de lactato liberado al medio de cultivo por las células se determinó mediante la siguiente reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH):



Para medir lactato, la reacción se lleva a cabo de derecha a izquierda con un exceso de NAD, de tal modo que en presencia de LDH, el aumento de absorbancia a 340 nm resulta en una medida del lactato presente originalmente en la muestra de reacción.

Las células indicadas se cultivaron por 24 horas hasta obtener un 80% de confluencia. Se recolectaron 200 μL de medio de cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Al medio le fueron agregados 400 μL de ácido tricloroacético frío al 8%. La mezcla se mezcló vigorosamente en vortex por 30 segundos y se dejó reposar en hielo

por 5 min, para asegurar la precipitación de las proteínas, y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se recolectó el sobrenadante y para asegurar la desproteinización del medio, se volvió a centrifugar. Se preparó una mezcla usando 656 μL de Buffer de glicina (Cat. No. 826-3 Sigma diagnostics), 1.67 mg de NAD (Cat. No. 260-110), 1311 μL de agua y 33 μL de lactato deshidrogenasa (Cat. No. 826-6; Sigma diagnostics), por cada muestra que se analizó y el blanco. Se mezcló por inversión y a cada tubo marcado, ya sea blanco o medio problema, se le agregaron 966.7 μL de esta mezcla. La reacción se inicia agregando a cada tubo 33 μL de la muestra de medio desproteinizado o 33 μL de ácido tricloroacético al 8% en el caso del blanco. Las muestras se incubaron por 30 min a 37°C y se leyó la absorbancia a 340 nm. La concentración de lactato se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Lactato (mmol/L)} = (\text{Abs } 340)(1)/(6.22)(1)(0.033)$$

En donde: 1 representa el volumen final de la muestra, 6.22 el coeficiente de absorción de NADH, 1 el área de la celda y 0.033 es el factor de dilución.

4.6 ENSAYOS DE KNOCKDOWN DE HIF MEDIANTE siRNA

Estos experimentos se realizaron utilizando los siguientes plásmidos donados generosamente por el Dr. Daniel Chung, de Massachusetts General Hospital en Boston, EUA y reportados con una efectividad mayor al 85% para abatir la expresión de los HIF [31]: pSUPER GFPneo-siHIF2 α , pSUPER-PURO-si HIF1 α #1470 y pSUPER-PURO-si HIF1 α #2192. Estos plásmidos se transfectaron a las células malignas SW480 las cuales tienen una eficiencia de transfección del 60% (determinada previamente por citometría de flujo).

Se sembraron 1.5×10^5 células SW480 y 24 horas después las células se transfectaron con 1 o 2 μg del plásmido de interés (siHIF2 α o siHIF1 α) o plásmido control pSUPER que carece de la secuencia de RNAi. En todos los pozos se mantuvo constante la cantidad de DNA en 2 μg complementando con el plásmido control. Para lograr una transfección estable, se seleccionaron diferentes clonas y se sembraron en un medio con antibiótico específico (purimicina para células transfectadas con el plásmido de siRNA HIF-1 α y neomicina para HIF-2 α) durante tres semanas. Las clonas obtenidas fueron analizadas para verificar la eficiencia del knockdown del HIF mediante Western blot y/o citometría de flujo.

4.7 ANÁLISI DE EXPRESIÓN DE HIF POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

Las células se tripsinizan, se lavan con PBS y se centrifugan a 2600 rpm por 2 min. El pellet obtenido se resuspende en buffer de FACS (PBS con 4% de SFB) y se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS incubando durante 10 min a 37°C. Se vuelven a centrifugar (a 2000rpm X 2min) para quitar el exceso de PFA y se agrega 1mL de metanol absoluto frío (-20°C) incubandose en hielo por 30 min. Las células se centrifugan a 2000 rpm por 2 min para quitar el metanol y se lavan con buffer de FACS. Se procede a incubarlas con el anticuerpo primario (1:80 en buffer de FACS) por 15 min. Se vuelven a lavar las células con buffer de FACS y se incuban con el anticuerpo secundario: HIF-1 α -anti-mouse-FITC y HIF-2 α -antimouse-PE (Jacks Immuno Research) a una concentración 1:100 por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células son lavadas con buffer de FACS para quitar el exceso del

anticuerpo secundario y son resuspendidas en 50 μ L de PBS y 100 μ L de PFA al 4%. Las células se pasan en el FACS.

4.8 ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR ANEXINA V

En las etapas tempranas de apoptosis, ocurren cambios en la superficie celular. Uno de estos cambios es la alteración en la translocación de la fosfatidil serina (PS) desde la parte interna de la membrana plasmática a la parte externa de ésta, exponiendo de este modo la PS en la superficie celular. Los macrófagos reconocen de manera específica la PS expuesta en la membrana plasmática de los linfocitos durante el desarrollo de la apoptosis. El reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas protegen a los organismos de la exposición a compuestos que inducen procesos inflamatorios, que usualmente acompañan a la necrosis. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} con una alta afinidad por PS, por lo que es un agente de detección de células apoptóticas muy eficiente.

Se sembraron 150,000 células en placas de 24 pozos y 24h después llegaron a una confluencia del 70%. Las células se incubaron en ausencia (H_2O) o en presencia de H_2O_2 [1mM] para inducir apoptosis, ya que en trabajos anteriores en este mismo laboratorio se vio que con esta concentración se obtiene una respuesta óptima sin inducir necrosis celular. Se dejaron incubar por 12 horas y se recolectaron. Las células fueron incubadas con Anexin-V-FLUOS siguiendo las instrucciones del estuche comercial de Roche (Anexin-V-FLUOS Staining Kit, cat. 11858777001) y se analizaron por FACS.

4.9 ENSAYO DE INVASION (WOUND HEALING)

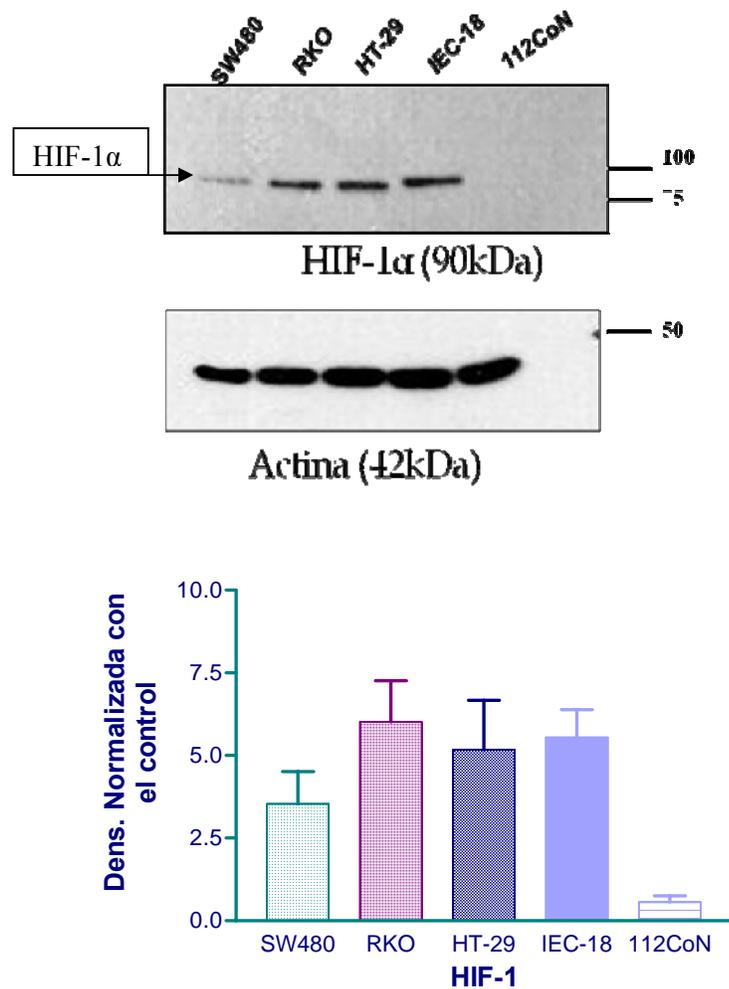
Se sembraron 200,000 células en cubre-objetos de 1 x 1 cm colocados en placas de 24 pozos, en medio de cultivo DMEM con 5% de SFB. Una vez alcanzada la confluencia (24h después), se hizo una herida en la porción media de cada cubre-objetos utilizando una punta estéril de 200 μ L y se lavaron con PBS para quitar las células que se desprendieron en este proceso. Se incubaron nuevamente los cubre-objetos en medio fresco reducido en suero (DMEM con 0.5% de SFB) durante 24 h. La razón de reducir el suero a la décima parte es porque se ha reportado que al quitarle el suero a las células éstas se arrestan y en vez de proliferar se induce la migración. Las fotos fueron tomadas al tiempo cero, que es justo después de cuando se hizo la herida y 24 y 48 horas después. Este experimento nos ayuda a observar la capacidad de invasión que tienen estas células; las células que logran cubrir, “sanar” la herida en menos tiempo son las células más invasivas.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

5.1. Mediante Western Blot se detectó la proteína HIF-1 α y HIF-2 α y se vio que están sobre-expresadas en las líneas celulares cancerígenas de colon (SW 480, HT-29, RKO) en comparación con la línea celular de colon no maligna (112CoN).

Con el propósito de conocer la expresión de HIF-1 α y de HIF-2 α en líneas celulares cancerígenas de colon (SW480, HT29, RKO) y compararla con la expresión presente en células no malignas (112Con y IEC18), se realizaron análisis de Western blot en los extractos celulares correspondientes a estas líneas celulares (Fig. 12).

A)



B)

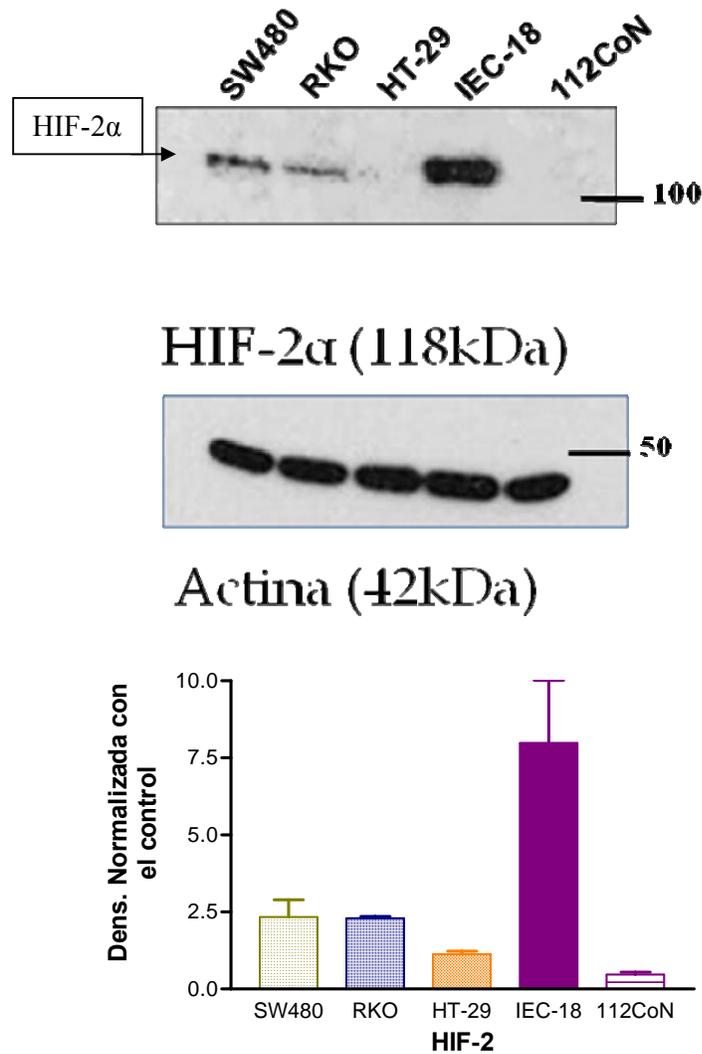


Figura 12. Expresión de HIF-1 α y HIF-2 α en líneas celulares cancerosas (RKO, SW480 y HT-29) y normales (112Con y IEC18). A) Inmunoblot representativo y cuantificación de la expresión de HIF-1 α en líneas celulares malignas de colon: RKO, SW480 y HT-29 con respecto a líneas celulares de colon no malignas: 112Con y IEC18. B) Inmunoblot representativo y cuantificación de la expresión de HIF-2 α en líneas celulares malignas de colon: RKO, SW480 y HT-29 con respecto a líneas celulares de colon no malignas: 112Con y IEC18.

Como podemos observar en la figura 12, la expresión tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α es mucho mayor en las células cancerosas en comparación con las células normales humanas 112CoN. Sin embargo, la mayor expresión de estas proteínas se encontró en las células IEC-18 que no son tumorales. La explicación de este hallazgo puede deberse a varios factores, uno de los cuales es el hecho de que estas células

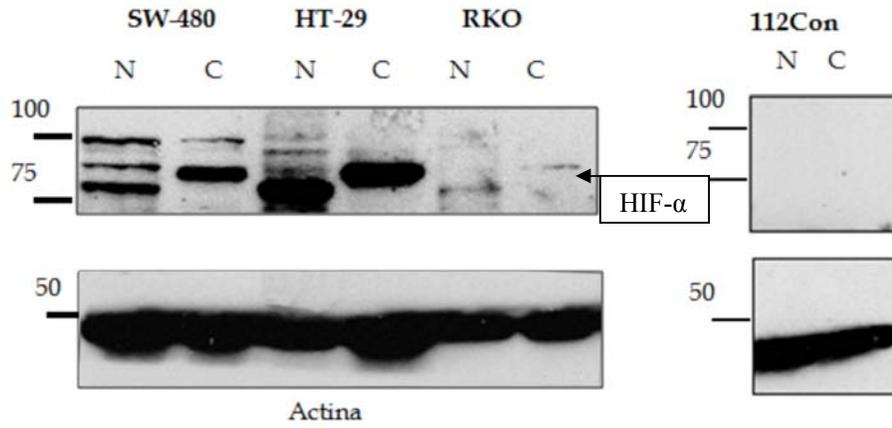
requieren insulina para crecer, lo cual podría estar activando la expresión de HIF α mediante la ruta de las MAPK. Por otro lado, en otros trabajos en este mismo laboratorio se ha visto que las células IEC-18, que no son de colon humano sino de intestino delgado (íleon) de rata, no se comportan del todo como células no malignas, ya que presentan una expresión elevada de β -catenina y expresan isoformas de PKC presentes sólo en células malignas. Por esta razón, en adelante se decidió utilizar como control de células normales humanas no malignas a las 112 CoN.

La elevada expresión de los factores HIF que encontramos en células cancerígenas aún bajo condiciones de normoxia es consistente con los reportes de que las células cancerosas expresan los factores HIF para establecer un programa genético que promueva el metabolismo de glucólisis aeróbica aún en presencia de oxígeno (efecto Warburg) y que favorezca la proliferación y supervivencia del tumor.

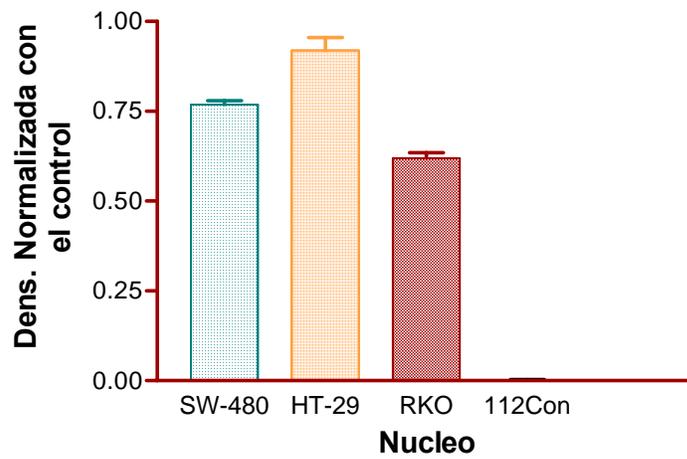
5.2 Se examinó la localización subcelular de la proteínas HIF-1 α y HIF-2 α en las líneas celulares estudiadas; se vio que estas proteínas se encuentran en el núcleo de las líneas celulares cancerígenas de colon (SW480, RKO y HT-29) lo cual sugiere que están activas.

Lo siguiente que se hizo fue investigar si en nuestras células estaban activos los factores HIF. Para ello se analizó la localización intracelular de estos factores, ya que su presencia en el núcleo nos indicaría que pueden activar la transcripción. Se realizó un fraccionamiento celular separando las fracciones citoplásmica y nuclear de cada línea celular, y se analizó la presencia de los factores HIF en estas fracciones por Western blot (Fig. 13).

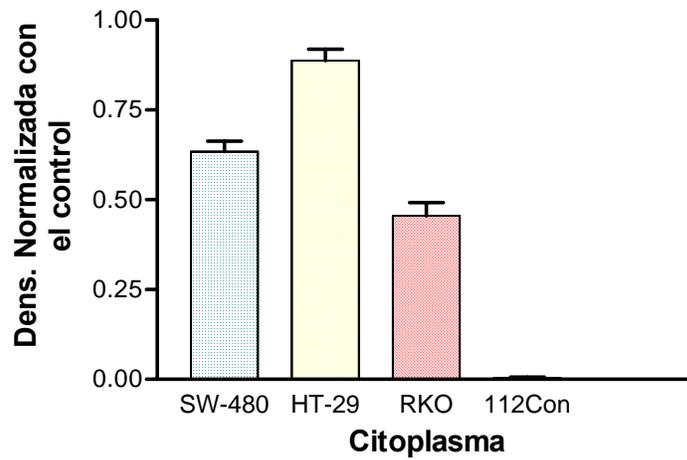
A) HIF-1 α

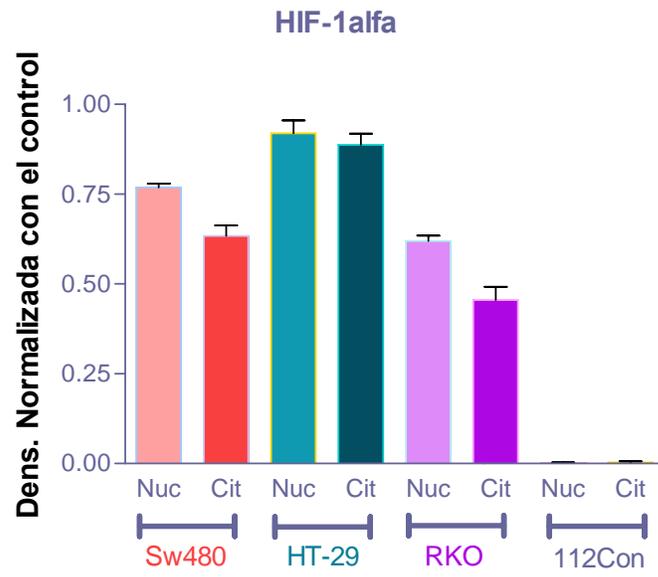


HIF-1alfa

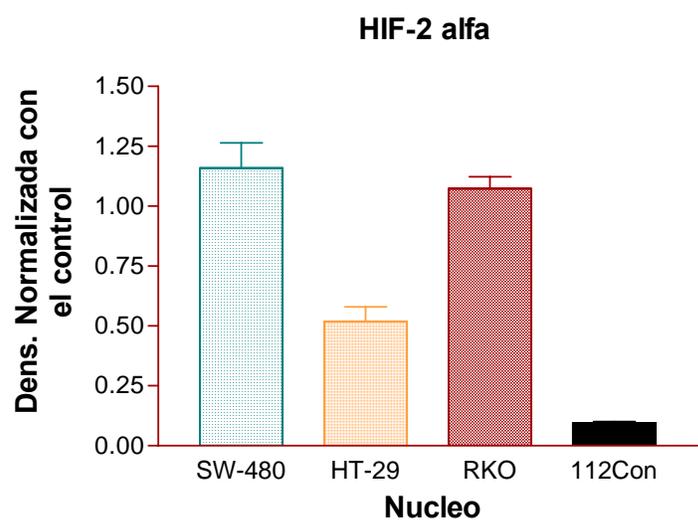
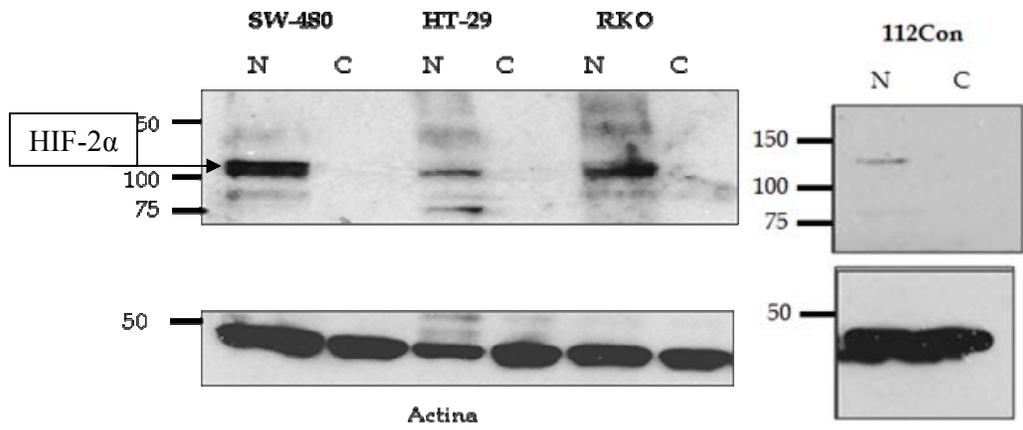


HIF-1alfa





B) HIF-2 α



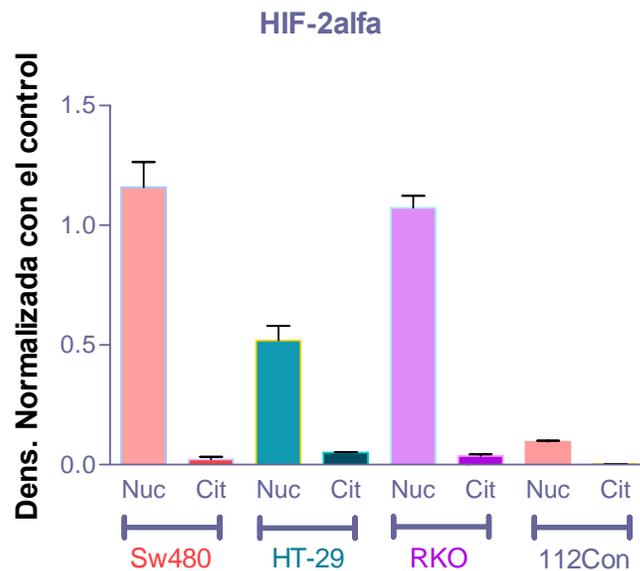
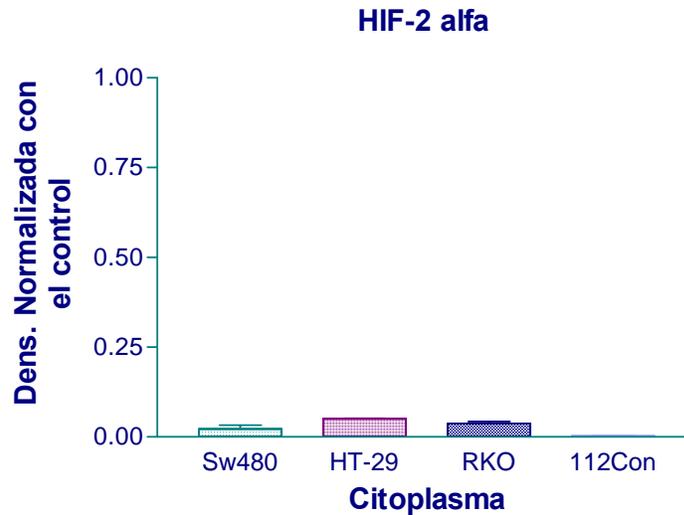


Figura 13. Presencia de HIF-1 α y de HIF-2 α en el citoplasma y núcleo de líneas celulares malignas de colon y no malignas. A) Inmunoblot representativo y cuantificación de la expresión de HIF-1 α en el núcleo y citoplasmas de células de colon malignas (RKO, SW480 y HT-29) y en células de colon no malignas (112Con). B) Inmunoblot representativo y cuantificación de la expresión de HIF-2 α en el núcleo y citoplasmas de células de colon malignas (RKO, SW480 y HT-29) y en células de colon no malignas (112Con).

En estos experimentos pudimos observar claramente la presencia tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α , mayoritariamente en el núcleo de las células cancerosas y por tanto nos sugiere que están activas transcripcionalmente (Fig 13). En las células no

cancerígenas 112CoN, la presencia de esta proteína en el núcleo es nula en el caso de HIF-1 α (Fig 2 A), o muy poca como es el caso de HIF-2 α . La presencia de HIF-2 α en el tejido epitelial intestinal ya ha sido reportada previamente [41] y por lo tanto su presencia en las células 112CoN no es tan extraña. Se sabe que HIF-2 α en condiciones fisiológicas, a diferencia de HIF-1 α , está involucrado en la proliferación celular, por lo que su presencia en el tejido epitelial no maligno es de esperarse. Además, debe tomarse en cuenta que el epitelio intestinal es el que tiene la tasa de recambio más alta en el cuerpo humano, por lo que la actividad de HIF-2 α , que regula la proliferación, sería normal. Hay que notar por otro lado que en epitelio normal de colon, 112CoN, aunque sí podemos ver a HIF-2 α en el núcleo de las células, la cantidad de éste es mucho menor que en líneas celulares cancerígenas, que tienen una tasa de proliferación mucho mayor (Fig 13B)

En los western blots también observamos no solo una banda sino varias sobre todo cuando se trata de extracto proveniente del núcleo. Una de las posibles explicaciones podría ser la complejidad del método; para poder extraer los núcleos de las células se rompen muchos organelos y hay mayor exposición al medio lo cual hizo a las proteínas mas sensibles a proteólisis, esto es congruente con el hecho de que las otras bandas que se ven son de menor peso molecular. Por otro lado esto también podría deberse a una inespecificidad del anticuerpo, pero en este caso se utilizo el mismo anticuerpo que cuando se trabajo con el extracto celular total y en el extracto celular total no observamos estas bandas inespecíficas. Para poder ver si realmente estas son bandas inespecíficas del anticuerpo se podría realizar un experimento muy sencillo utilizando el epitope para el cual fue diseñado el anticuerpo. El epitope en ese caso, competiría con el anticuerpo por la unión a lugares específicos de la proteína, de esta

manera impidiendo que este se una de manera específica a la proteína y solo se una a sus blancos inespecíficos.

5.3 Se examinó la presencia de la proteína c-MYC en las líneas celulares estudiadas; se vio que esta proteína se encuentra sobre-expresada en las líneas celulares cancerígenas de colon (SW480, RKO y HT-29) en comparación con su contraparte no maligna (112CoN).

Como se mencionó en la introducción, c-MYC y HIF interactúan de diferentes maneras en las células cancerígenas promoviendo la proliferación tumoral y el efecto Warburg, entre otras cosas. Por ende, a continuación se analizó la expresión de c-MYC en las líneas celulares malignas (RKO, SW480 y HT-29) y en su contraparte no maligna (112CoN) mediante Western blot (Figura 14).

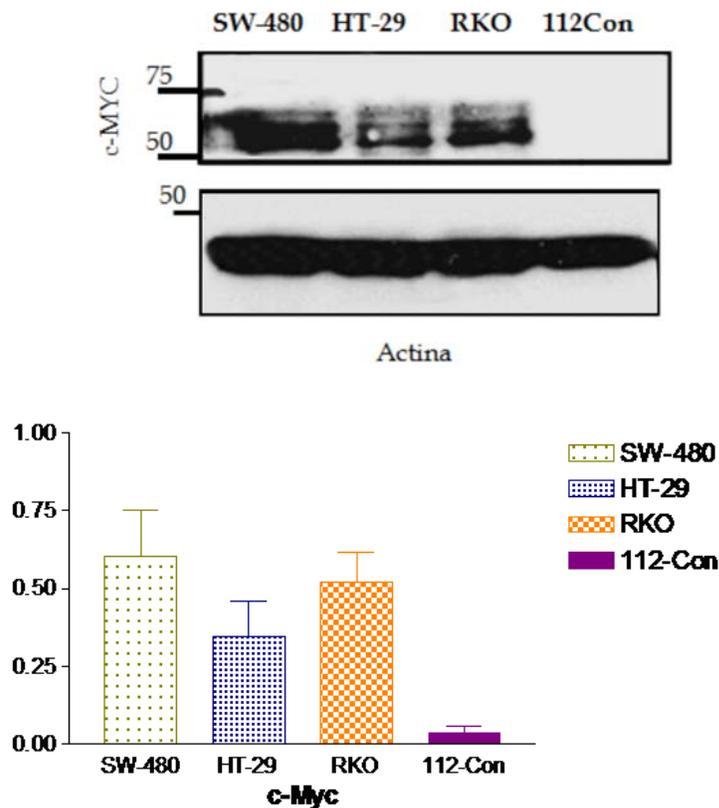


Figura 14. Expresión de c-MYC en células cancerosas de colon y en células no malignas de colon. Inmunoblot representativo y cuantificación de la expresión de c-MYC en células malignas (RKO, SW480 y HT-29) y en células no malignas (112Con).

Como se puede apreciar en la figura 14, se encontró que solamente las células cancerosas expresan a la proteína c-MYC, lo cual es de esperarse en las células cancerosas de colon, ya que las células HT-29 y las SW480 tienen la ruta Wnt activa y el oncogen c-myc es uno de sus principales genes blanco. En las células cancerosas RKO, aunque no tienen constitutivamente activa la ruta Wnt, sí presentan constitutivamente activa una vía de MAPK (tienen mutada c-Raf), que probablemente lleve a la sobreexpresión de c-Myc.

5.4 Se midió la producción de lactato en las líneas celulares estudiadas; se vio que las líneas celulares cancerígenas de colon (SW480, RKO y HT-29) producen mayores cantidades de lactato que su contraparte normal (112CoN) lo cual sugiere la presencia de un metabolismo alterado característico de todos los tumores sólidos.

Se sabe que la presencia de c-MYC conjuntamente con HIF-1 α en las células, promueve el establecimiento de un metabolismo alterado característico de prácticamente todos los tumores sólidos. Para confirmar la presencia de este metabolismo maligno, conocido como el efecto Warburg, se determinó la producción de lactato en el medio de cultivo de las células malignas en comparación con las células no malignas 112 CoN. Como se mencionó en la metodología, esto se hizo midiendo espectrofotométricamente la reducción de NAD por lactato deshidrogenasa a partir del lactato secretado por las células al medio de cultivo. En la figura 15 se presentan los resultados.

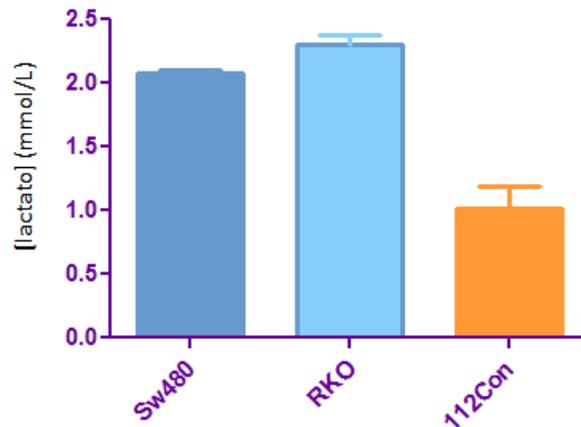
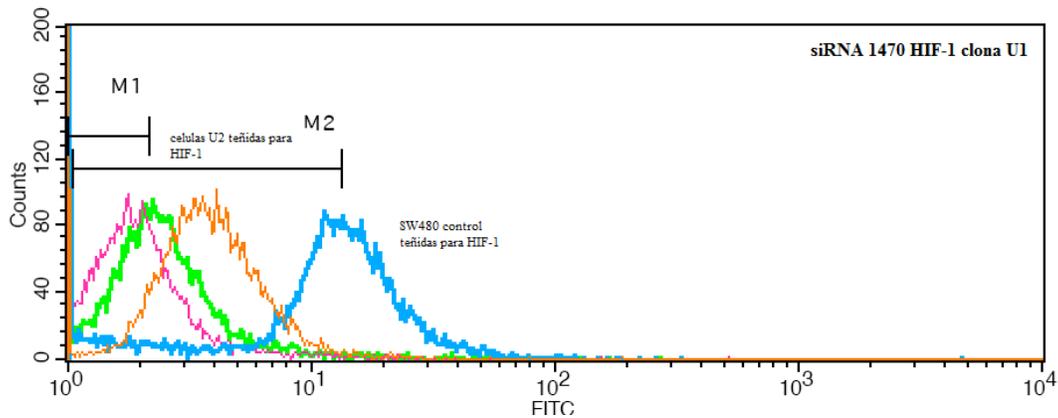


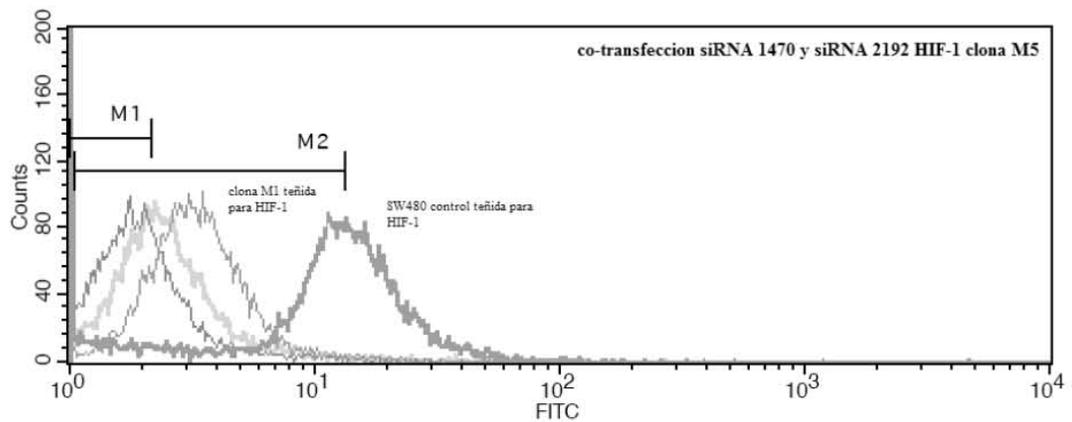
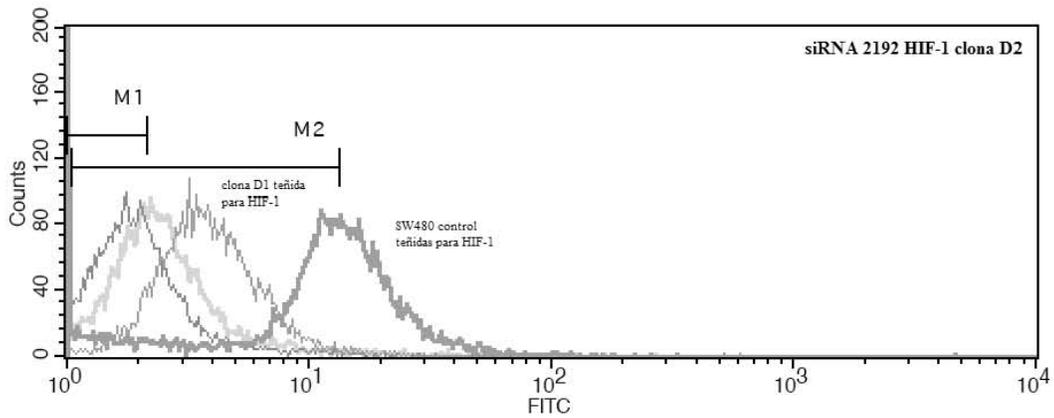
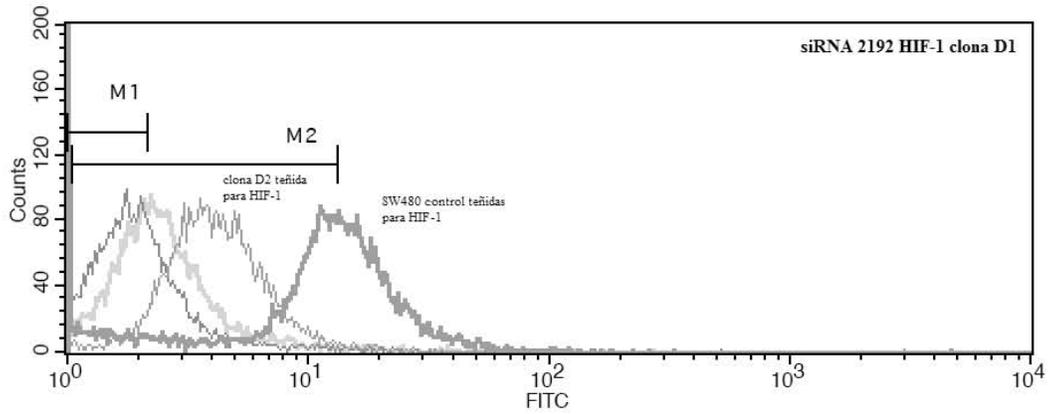
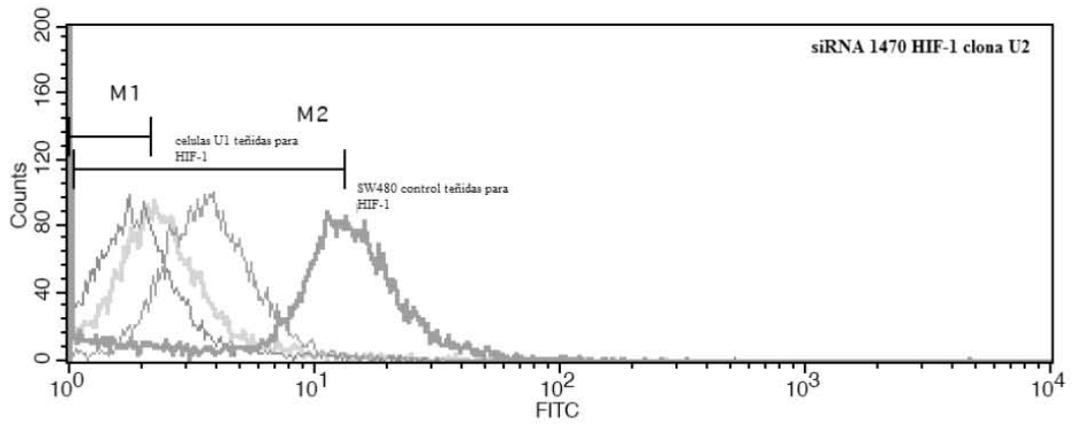
Figura 15. Producción de lactato por parte de células malignas de colon a comparación de células no malignas. Cuantificación de la producción de lactato de las células malignas de colon (SW480 y RKO) a comparación con la contraparte no maligna (112Con).

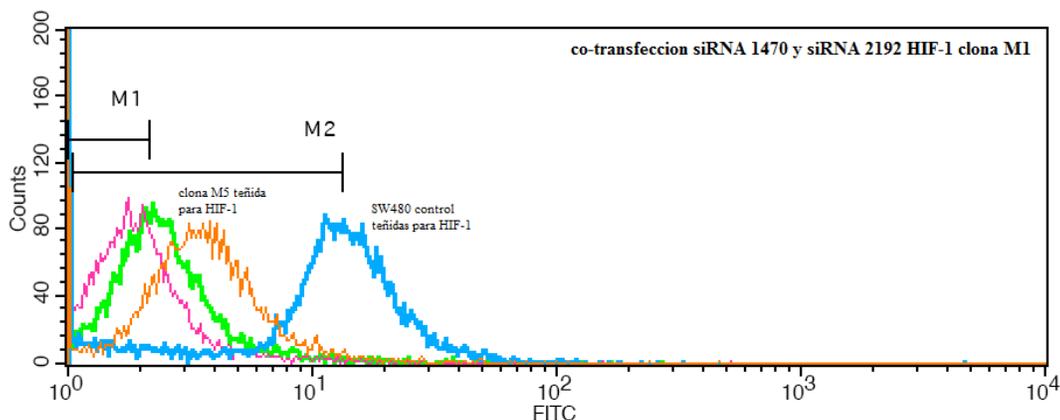
Como se puede observar, las células cancerosas SW480 y RKO producen casi el doble de lactato de su contraparte no maligna, las células 112CoN (Fig 15). Como ya se mencionó, los tumores sólidos, incluyendo el de colon, en su mayoría presentan un metabolismo alterado que consiste en una tasa de glicólisis elevada dando como producto final lactato mediante la fermentación láctica. El lactato es exportado de la célula mediante un mecanismo antiporter; para sacar lactato también se transportan protones H^+ , acidificando de esta manera el medio. La acidificación del medio extracelular entre otras cosas, ayuda a la degradación de la matriz extracelular promoviendo de esta manera la invasión. Esta característica de las células cancerígenas le ofrece muchas ventajas a éstas, descritas en la Introducción. Como se mencionó con anterioridad, HIF-1 α conjuntamente con c-MYC son los responsables entre otras cosas del establecimiento de este tipo de metabolismo en las células cancerígenas. Como vimos, tanto las células SW480 como las RKO sobre-expresan a HIF-1 α al igual que a c-MYC lo cual es consistente con la presencia de este tipo de metabolismo.

5.5 Se realizó un knock down estable de la proteína HIF-1 α y de HIF-2 α mediante siRNA en la línea celular cancerígena de colon RKO. Se obtuvieron varias clonas con una eficiencia del knockdown buena del más del 80% en el caso de HIF-1 α y mayor del 70% en el caso de HIF-2 α .

A continuación se realizó el knockdown de las proteínas HIF, utilizando siRNA de la manera que se describió en la metodología. Para verificar la eficiencia del knockdown, las células fueron teñidas con los anticuerpos pertinentes y analizadas en el FACS. Se obtuvieron en total 6 clonas de células con el knock down de HIF-1 α (clonas U1 y U2 transfectadas con el plásmido pSUPER-PURO-si HIF1 α #1470; clonas D1 y D2 transfectadas con pSUPER-PURO-si HIF1 α #2192; clonas M1 y M5 co-transfectadas con los dos plásmidos de siRNA para HIF-1 α) y 2 clonas con el knockdown para HIF-2 α (clonas E2 y E3 transfectadas con pSUPER GFPneo-siHIF2 α). Las células SW480 control fueron transfectadas con el plásmido vacío pSUPER. Las tinciones se hicieron por triplicado y aquí se muestra un resultado representativo de una de las tinciones para cada clona.







Clonas	Eficiencia de Knock-down HIF-1 α (%)
U1	89.25
U2	87.74
D1	82.21
D2	85.41
M1	89.45
M5	81.77

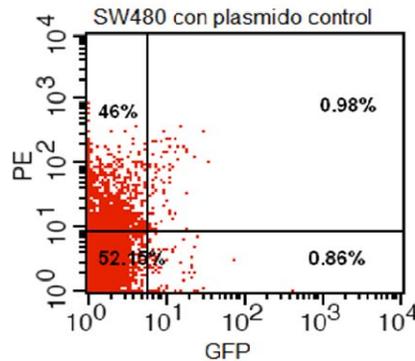
Figura 16. Células teñidas para HIF-1 α . Las células transfectadas con el plásmido vacío (control) teñidas están representadas con azul mientras que las células transfectadas con los plasmidos con siRNA están representadas en naranja.

Como puede observarse en la figura 16, aunque la caída de la proteína HIF-1 α no fue absoluta en nuestras clonas (como era de esperarse), se obtuvo una muy buena eficiencia de knockdown, ya que la expresión de HIF-1 α se abatió más del 80% en la cantidad de la proteína HIF-1 α .

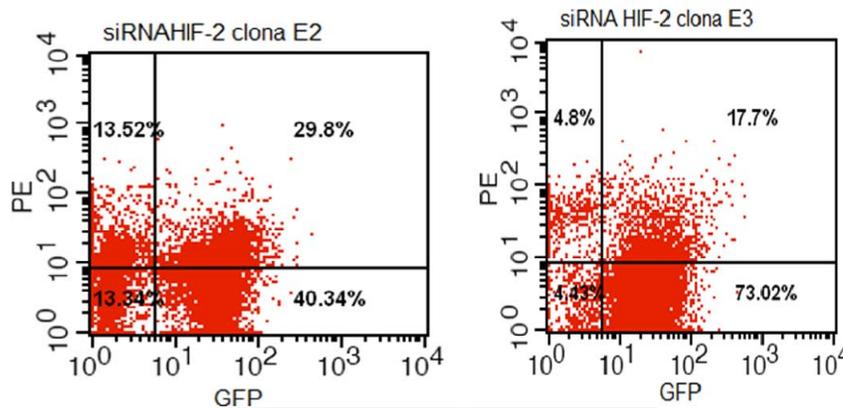
Con respecto a las células SW-480 transfectadas con el plásmido pSUPER GFPneo-siHIF-2 α , este plásmido tiene la proteína verde fluorescente (GFP), por lo tanto a la hora de teñir las células para HIF-2 α se utilizó un anticuerpo secundario asociado a PE (ficoeritrina) y no a FITC (fluoreceína-5-isotiocianina) que fluoresce en verde igual que GFP. Teniendo en cuenta estos dos parámetros, se pudo observar tanto la presencia de GFP que indicaba que estas células fueron exitosamente transfectadas, como la presencia de HIF-2 α mediante el anticuerpo secundario asociado al fluoróforo

PE. Esta tinción también se realizó por triplicado para poder seleccionar las clonas que sí presentan un knockdown de la proteína HIF-2 α y aquí sólo se muestran las imágenes de un experimento representativo.

A) Células transfectadas con plásmido control



B) siRNA HIF-2 α



Clonas	Eficiencia de Knock-down HIF-2 α (%)
E2	40.34
E3	73.02

Figura 17. Células teñidas para HIF-2 α . Las células transfectadas fueron teñidas con PE para ver la expresión de HIF-2 α . El plásmido con siRNA HIF-2 α contiene la proteína GFP mientras que el plásmido vacío no. A) Células transfectadas con el plásmido vacío (control). B) Células transfectadas con el plásmido pSUPER GFPneo-siHIF2 α . C) El 40.34% de la clona E2 fue exitosamente transfectada y es negativa para HIF-2 α . El 73.02% de la clona E3 fue exitosamente transfectada y negativa para HIF-2 α .

El siRNA de HIF-2 α no fue igual de eficiente que el de HIF-1 α , pero a pesar de eso logramos ver que el 73% de la clona E3 fue exitosamente transfectada y negativa para HIF-2 α mientras que en la clona E2 solo el 40% logro ser transfectado de manera exitosa y no presentar la proteína HIF-2 α . Tuvimos varias dificultades para obtener estas clonas ya que las células proliferaban de manera muy lenta y tenía una mortalidad muy alta.

5.6 Se analizaron los cambios metabólicos que presentan las células con knockdown de proteínas HIF-1 α y HIF-2 α , mediante la producción de lactato. Se encontró que las células con knockdown de la proteína HIF-1 α pero no HIF-2 α presentan una disminución considerable en la producción de lactato al compararlas con las células control.

A continuación se analizaron los cambios fenotípicos que presentan las células con knockdown de HIF-1 α y de HIF-2 α en comparación con las células control transfectadas con el plásmido vacío. En primera instancia se analizó el efecto del knockdown en el metabolismo de estas células mediante la producción de lactato. La cantidad de lactato fue medida como se explica en los métodos y estos valores fueron normalizados con respecto a la proteína. El valor obtenido para las células transfectadas con el plásmido vacío (control) se tomó como 1, y todas las clonas analizadas fueron comparadas con las células control. Los resultados mostrados en la gráfica 18 muestran el promedio \pm el SEM de tres experimentos realizados con diferentes preparaciones celulares.

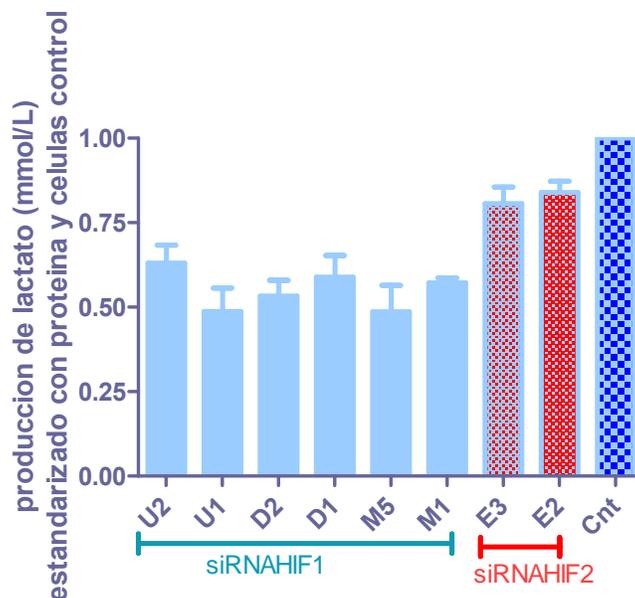


Figura 18. Producción de lactato de células con siRNA a comparación con las células control. Las clonas U, D y M fueron transfectadas con siRNA para HIF-1 α (azul claro). Las clonas E fueron transfectadas con siRNA para HIF-2 α (rojo). Las células control (Cnt) fueron transfectadas con el plásmido vacío. Los datos obtenidos de producción de lactato fueron estandarizados contra la cantidad de proteína; el valor obtenido para las células control fue considerado igual a 1 y los valores obtenidos para las otras clonas fueron comparadas con respecto a ese valor y esa relación es la que se muestra en la gráfica.

Como se puede observar en la gráfica anterior, las células que fueron transfectadas con siRNA-HIF1 α presentan una disminución promedio de un 50% en la producción de lactato en comparación con las células control. Estos resultados son congruentes con la idea de que HIF-1 α está involucrado en la regulación del metabolismo de las células cancerígenas. HIF-1 α regula la expresión de genes involucrados en el transporte de glucosa y enzimas glucolíticas. Como se mencionó anteriormente, HIF-1 α induce la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDK1), que fosforila e inactiva a la piruvato deshidrogenasa. Esta última, es un enzima mitocondrial que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA, mientras que la enzima PDK1 la fosforila inhibiendo su función; favoreciendo de esta manera la glucólisis e inhibiendo la respiración mitocondrial. También HIF-1 α promueve la

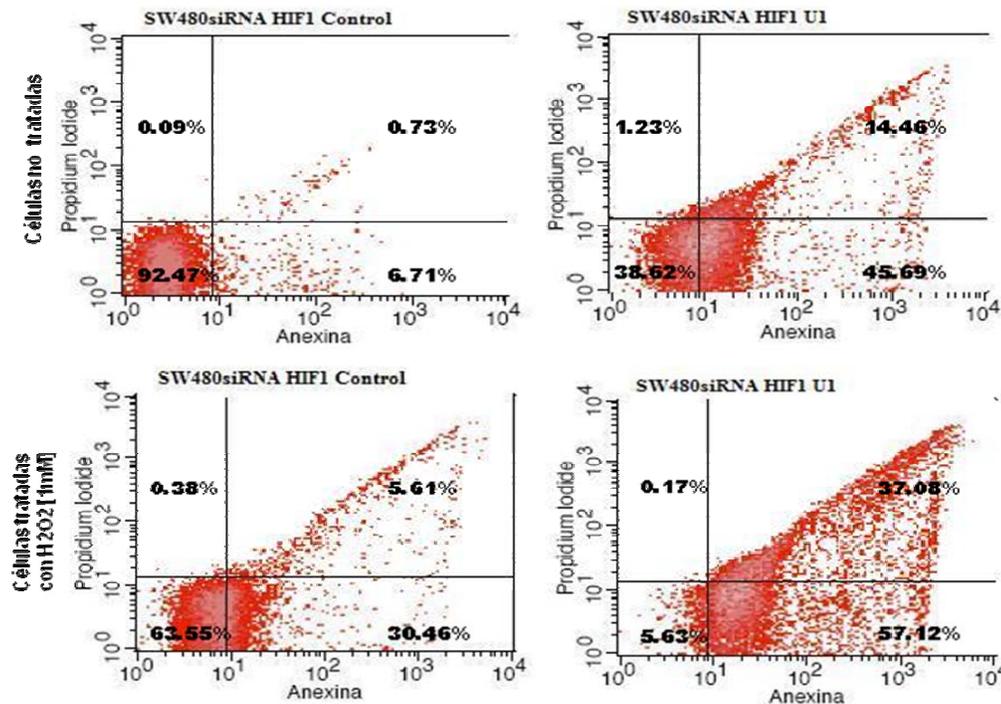
expresión del transportador de glucosas GLUT1, aumentando de esta manera el consumo de glucosa por parte de la célula. El aumento en la glucólisis tiene como resultado final la fermentación láctica. El lactato producido es exportado al espacio extracelular. Las células que tienen un knockdown de HIF-1 α tienen una significativa disminución en este tipo de metabolismo, conocido como el efecto Warburg, y esto es lo que vemos reflejado como una disminución en la producción de lactato por parte de las células transfectadas con siRNHA-HIF1 α al compararlas con las células control. Hay que recordar que estas células también sobre-expresan a c-MYC, proteína que también está involucrada en establecimiento del efecto Warburg; ya que, como se explicó en la introducción, está involucrado en la activación de prácticamente todos los genes involucrados en la glucólisis. Probablemente debido a esto no podemos ver una baja total en la producción de lactato solamente al tener knockdown de HIF-1 α ya que también está activo y sobre expresado c-MYC. Por otro lado, el efecto tan modesto en la producción de lactato observado con el knockdown de HIF-2 α puede explicarse porque este factor no está involucrado en el metabolismo celular aunque también uno de sus genes blanco es Glut1 [40], por lo que tal vez por esto se puede observar una ligera disminución en la producción de lactato, pero el tener un knockdown de esta proteína no influye en el metabolismo celular de una manera tan significativa como en el caso de HIF-1 α .

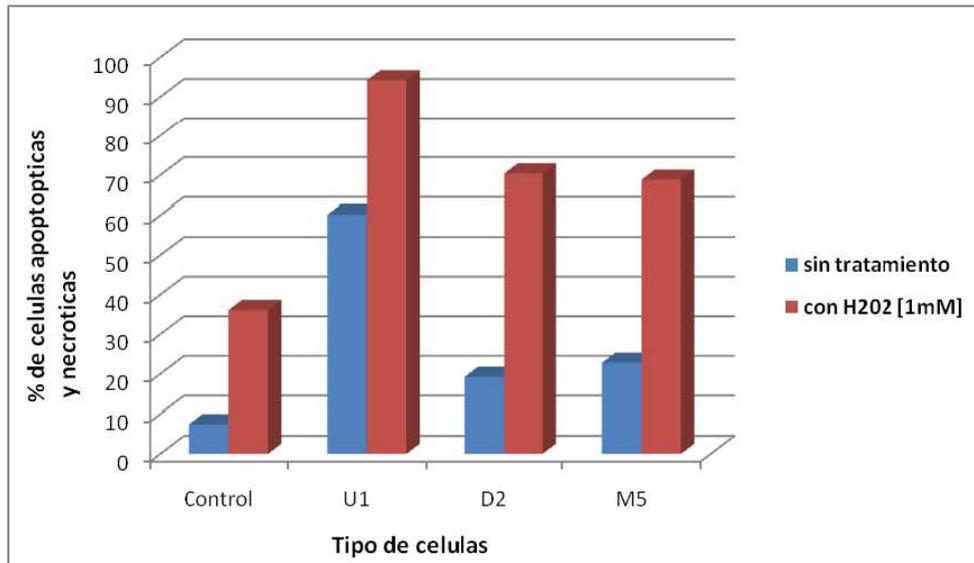
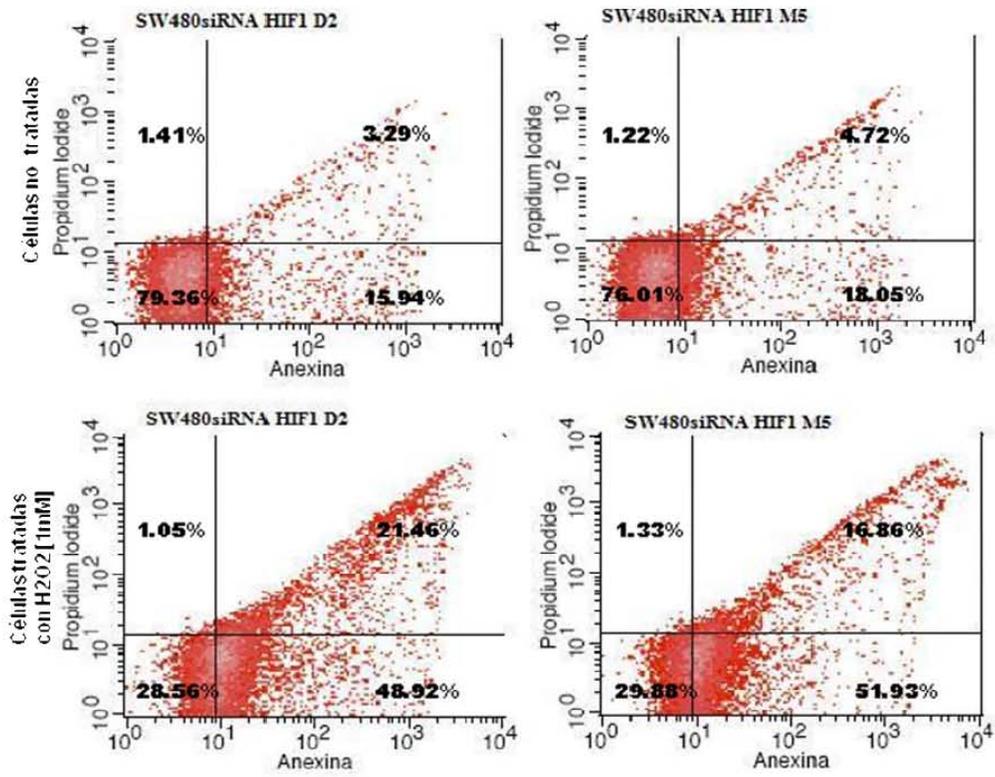
Interesantemente, las células transfectadas con siRNA mostraron cambios fenotípicos significativos; no viraban el medio con tanta rapidez como las células control, lo cual vimos reflejado por la disminución en la producción de lactato, y también proliferaban de manera más lenta.

5.7 Se analizó el efecto del knockdown de las proteínas HIF en la resistencia a apoptosis inducida con H₂O₂. Se vio que las células transfectadas con siRNA para HIF-1 α presentan un aumento en apoptosis de hasta el 40% con respecto al control aún en ausencia del tratamiento con H₂O₂. Mientras que las células con siRNA para HIF-2 α presentan un aumento mayor al 50% aún sin el tratamiento con H₂O₂.

Las células transfectadas con siRNA proliferaban de manera mucho más lenta que su contraparte control. Para ver si la baja proliferación de estas células se debía a un aumento en apoptosis, a continuación se realizó el experimento de determinación de apoptosis por la aparición de fosfatidilserina en la cara extracelular de la membrana plasmática utilizando Anexina V de la manera que se indicó en el método. Este experimento se realizó por duplicado obteniendo resultados muy similares entre sí. En la figura 19 se muestra un ejemplo representativo así como la gráfica que resume los resultados obtenidos para cada factor HIF.

A) siRNA HIF-1 α





B) siRNA HIF-2 α

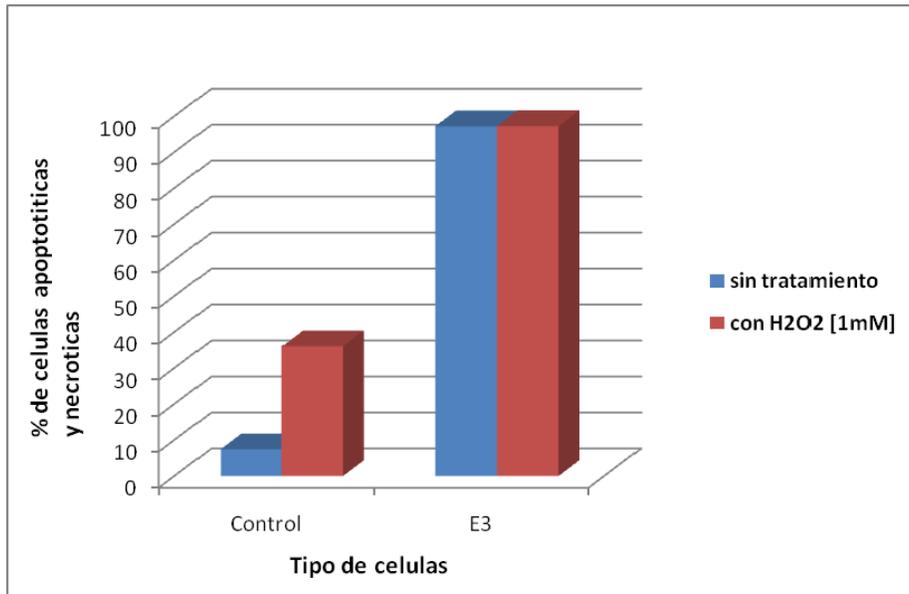
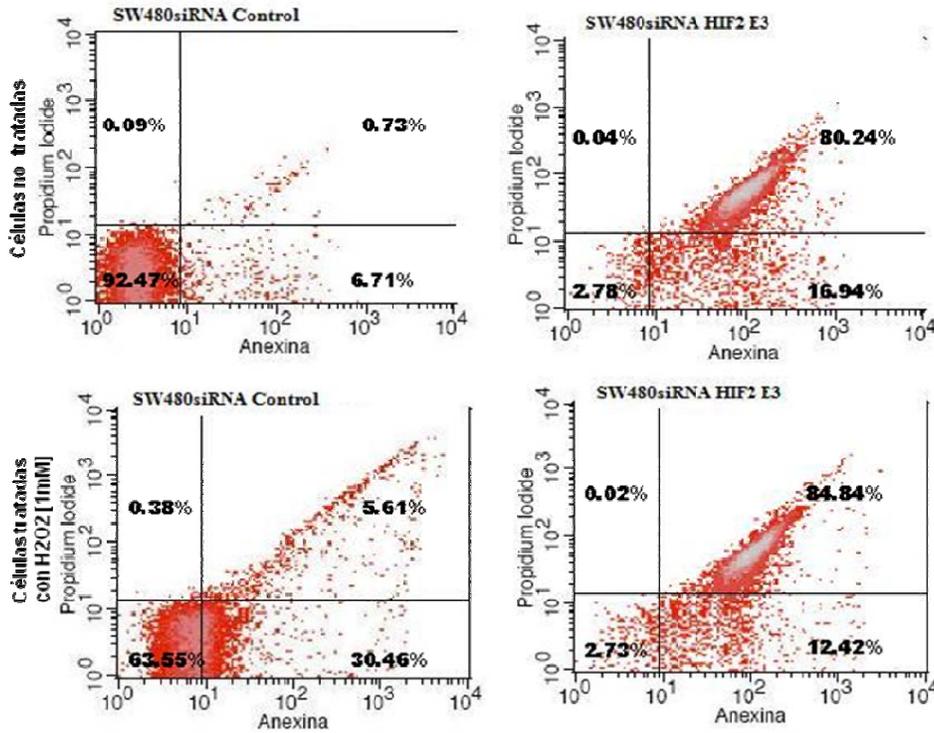


Figura 19. Efecto del knockdown de los factores HIF1 α (A) y HIF2 α (B) en la resistencia a apoptosis de las células SW480. Se determinó la tasa de apoptosis celular utilizando el kit de Anexina V en las células SW480 control con respecto a las células tratadas con H₂O₂ 1mM. En el eje de las “x” está graficada Anexina V que indica apoptosis y sobre el eje de las “y” ioduro de propidio que indica necrosis. A) células SW480 transfectadas con siRNA-HIF-1 α en comparación con las células SW480 transfectadas con plásmido vacío. B) células SW480 transfectadas con siRNA-HIF-2 α en comparación con las células SW480 transfectadas con plásmido vacío.

Como se puede observar en las gráficas anteriores (fig. 19), la cantidad de células apoptóticas, aún sin el tratamiento de peróxido, es mayor en las células transfectadas con siRNA-HIF α que en las células control. Este resultado sugiere que en estas células HIF tiene un papel anti-apoptótico. En estudios anteriores se ha visto que HIF tiene un papel complejo en la apoptosis, que depende del tipo celular, ya que puede regular la expresión de genes tanto pro- como anti-apoptóticos. Consistente con nuestros resultados, se ha encontrado que el siRNA de HIF-1 α promueve apoptosis en células cancerígenas de mama aumentando la expresión de genes pro-apoptóticos como BAK, CASP3, CASP8 y CASP10 [54]. Al igual que en otros tipos de cánceres, se ha visto que el siRNA de HIF-1 α aumenta la respuesta a quimioterapia [55 y 56]. En nuestros resultados podemos observar un aumento en la cantidad de células apoptóticas de hasta un 40% en células D1 y M5 con siRNA-HIF-1 α , aún en ausencia de peróxido, a comparación de las células control (Fig. 19A). Este aumento puede deberse ya sea a la regulación de los genes involucrados de manera directa en la apoptosis o de manera indirecta mediante la regulación de genes implicados en la supervivencia y en el estado celular. No se sabe con exactitud cuáles son los mecanismos involucrados en la resistencia a apoptosis que les confiere la presencia del factor HIF a las células cancerígenas, pero es evidente en nuestros datos la presencia de tal mecanismo en las células SW480. Tenemos que tomar en cuenta que las células SW480 cuentan con una p53 mutada lo cual ayuda a que estas células sean resistentes a procesos de apoptosis, por ende, al someter las células control a tratamiento con peróxido no observamos gran aumento en la cantidad de células apoptóticas (Fig 19A).

Según nuestros resultados, las células que se ven más afectadas por procesos de necrosis y apoptosis son las que tienen un siRNA-HIF2 α (Fig. 19B). Aún sin el

tratamiento de peróxido hay un 90% de células con knockdown de HIF-2 α apoptóticas y necróticas. Ya se ha propuesto que la disminución en la expresión de HIF-2 α promueve la fosforilación de p53, y por ende, su activación para promover la apoptosis [57]. Las células SW480 cuentan con una p53 mutada y por lo tanto el aumento en la cantidad de las células muertas no puede deberse en este caso a las acciones de p53. Se ha visto que en células de carcinoma renal el knockdown de HIF-2 α aumenta la muerte celular ya que desregula el balance redox promoviendo de esta manera daño al DNA. Se ha visto que HIF-2 α regula la expresión de muchas enzimas antioxidantes como HMOX1, XIAP, PRDX3, entre otros, regulando de esta manera los niveles de ROS en la célula [58]. Los aumentos de ROS inducen daños en el DNA lo cual puede ser la causa del aumento tan intenso en la apoptosis en las células con knockdown de HIF2 α .

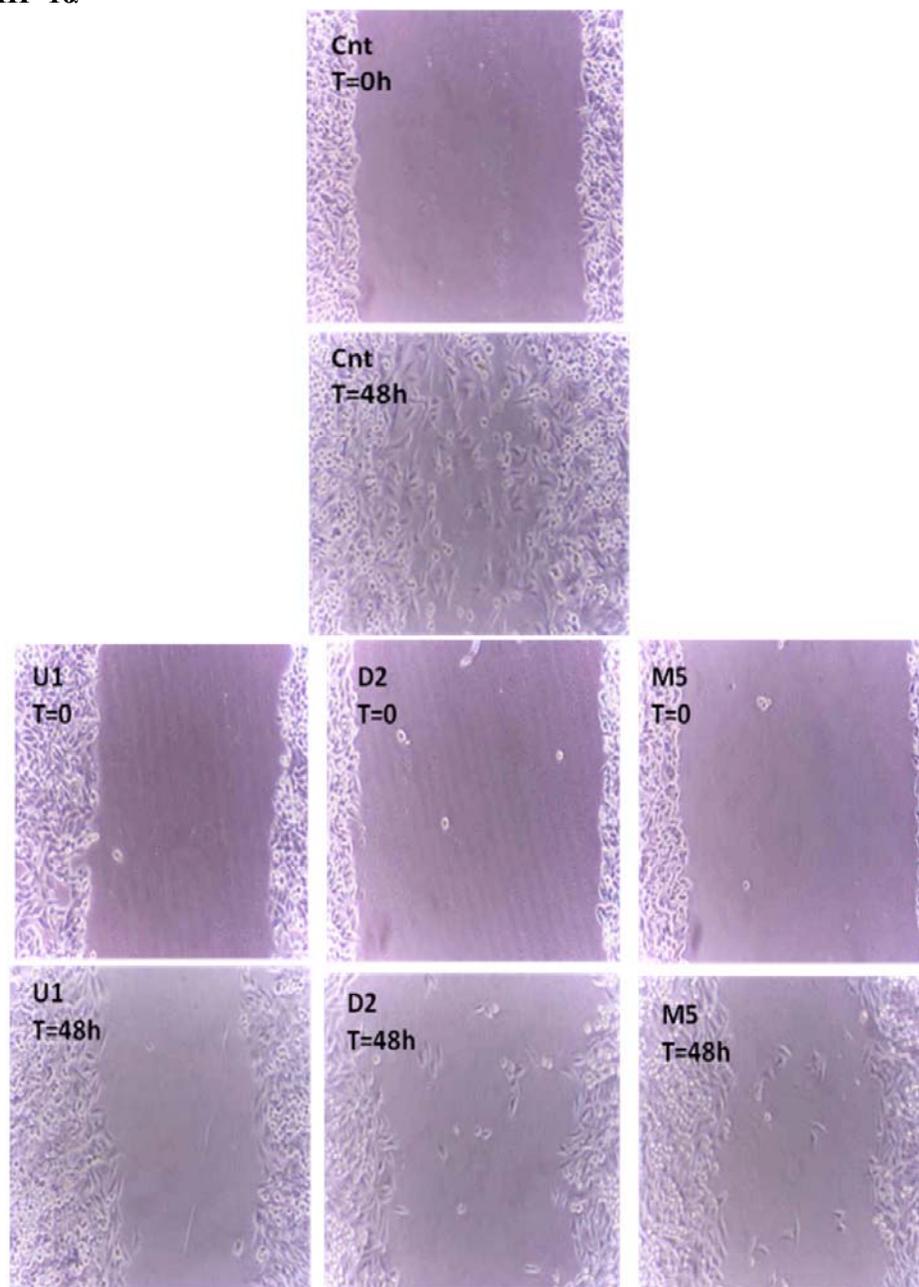
En resumen, aunque no se conocen cuáles son las causas del aumento tanto en apoptosis como en necrosis en las células SW480 transfectadas con siRNA-HIF, es muy claro que tanto HIF-2 α como HIF-1 α , en menor proporción, presentan un mecanismo de protección a las células que favorece su supervivencia.

5.8 Se analizó el efecto del knockdown de HIF en la capacidad de invasión de las células cancerosas mediante la técnica de “wound healing”. Las células con knockdown tanto para HIF-1 α como para HIF-2 α mostraron menor capacidad invasiva en comparación con las células control.

A continuación se analizó la capacidad de invasión de las células cancerosas que tenían knockdown de HIF α con respecto al control. Para esto se llevó a cabo el ensayo de “wound healing”, descrito en la metodología. Las fotos fueron tomadas al tiempo cero, que es justo después de cuando se hizo la herida y 24 y 48 horas después. Como se observa en la figura 20, a las 24 horas posteriores a la herida ya se veían diferencias entre las células control y las células con siRNA, pero las diferencias más significativas

y evidentes se pudieron observar 48 horas después, los resultados se muestran a continuación:

A) HIF-1 α



B) HIF2 α

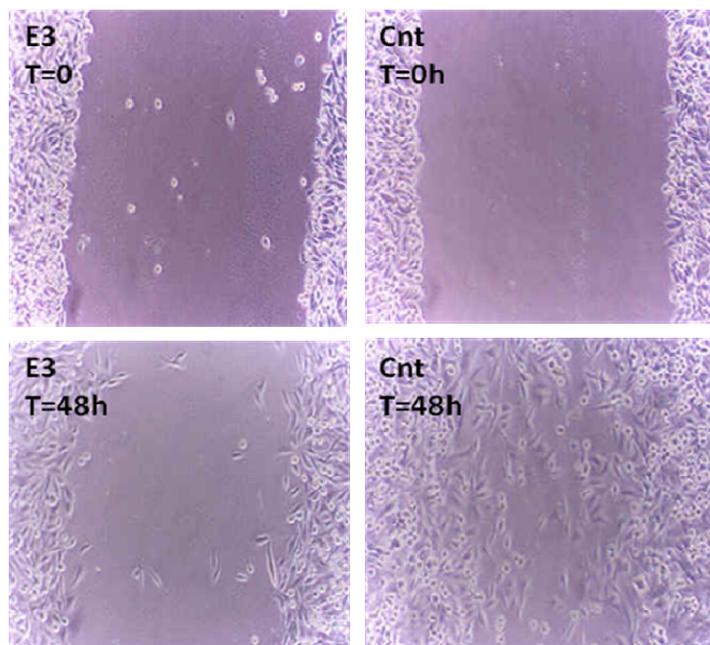


Figura 20. Migración (wound healing). 48 horas después de que se hizo la “herida” se ve cómo las células empiezan a migrar; su aspecto morfológico cambia pues se vuelven tipo fibroblastos (fenotipo alargado) pero es evidente que las células control tienen capacidad de migración mucho mayor que las células con knockdown de A) HIF1 α y B) HIF2 α .

Estos resultados muestran que tanto HIF-1 α como HIF-2 α están involucrados en la capacidad de migración de las células pues al disminuir la expresión de estas proteínas de las células podemos observar una disminución considerable en la capacidad de invasión y migración de las células cancerígenas. Tenemos que recordar que el factor de transcripción HIF está involucrado en muchas rutas de señalización, y ya se ha reportado, en cáncer de colon, que uno de sus genes blanco es el receptor de quimiocinas CXCR4 que es un mediador de metástasis y regula la migración celular [41]. Al disminuir la presencia de las subunidades α del factor de transcripción HIF en las células con el knockdown, éstas presentan una disminución en la expresión de los genes regulados por HIF, como los CXCR4, lo cual puede conllevar a una disminución en la capacidad de migración. Por otro lado la enzima lisil oxidasa también es inducida

por HIF y ya se ha reportado que la inhibición o la disminución en la expresión de esta enzima bloquea la migración celular *in vitro* y la metástasis *in vivo* [31]. Estas pueden ser alguna de las causas de la disminución en la capacidad de migración de las células inducida con siRNA-HIF que pudimos observar en estos experimentos en comparación con las células control.

Capítulo 6. Conclusiones

Primero observamos que la proteína HIF, tanto HIF-1 α como HIF-2 α están presentes y sobre-expresadas en las líneas celulares cancerígenas de colon: HT-29, SW-480 y RKO en comparación con su contraparte no maligna humana, 112-Con. La línea celular IEC-18 que son células no malignas del illo de rata también presentan altos niveles de estas proteínas, pero estas células son inmortalizadas y ya se ha encontrado en otros trabajos dentro de este laboratorio que tienen varias características de células malignas como la ruta Wnt activa, además de que son crecidas en condiciones diferentes como la presencia de insulina, que como otros factores de crecimiento, puede activar la ruta HIF. Por estas razones esta línea celular no puede ser considerada un buen control de células no cancerígenas por lo que ya no se siguió trabajando con ella.

Se analizó la presencia de HIF-1 α y HIF-2 α en el núcleo tanto de las células cancerígenas (HT-29, RKO y SW-480) como en las células normales de colon (112-Con). Se vió que las células malignas, a diferencia de las células no malignas, tienen elevados niveles de HIF-1 α como de HIF-2 α en el núcleo. La presencia de estas

proteínas dentro del núcleo celular sugiere que éstas están formando factores transcripcionales activos al unirse a HIF-1 β que es una proteína nuclear de expresión constitutiva.

Como se explica en la introducción, c-MYC interacciona con HIF-1 α y HIF-2 α para establecer el fenotipo maligno de la célula. Por lo tanto también se realizó Western-blot para ver la expresión de esta proteína en estas células. Las células malignas de colon estudiadas mostraron tener una expresión oncogénica de c-MYC mientras que su contraparte no maligna no tiene expresada esta proteína.

El efecto Warburg como se explicó anteriormente, es uno de los sellos característicos más importantes de todos los tumores sólidos. Tanto HIF como c-MYC ayudan al establecimiento de este fenotipo en las células cancerígenas. Una de las consecuencias del efecto Warburg es el aumento en la producción de lactato por parte de las células cancerígenas. Por esto se analizó la producción de lactato por parte de las células de colon malignas (HT-29, SW-480 y RKO) en comparación con las células de colon no malignas (112-CoN). Como se esperaba, las células cancerígenas producen mucho mayores cantidades de lactato que las células no malignas.

Para ver la contribución real que tiene HIF en el fenotipo maligno de las células cancerígenas, se bloqueó de manera estable su expresión mediante siRNA tanto para HIF-1 α como para HIF-2 α en las células cancerígenas de colon SW480. El knockdown de HIF-1 α afectó la producción de lactato significativamente en comparación con las células control, pero el knockdown de HIF-2 α no parece tener el mismo efecto lo cual

es congruente con la literatura consultada ya que HIF-1 α conjuntamente con c-MYC es el que está involucrado en la regulación de genes involucrados en la glucólisis.

Las células a las que se les bloqueó de manera estable la expresión de los factores HIF mediante siRNA también mostraron tener una tasa de apoptosis mayor que las células control aún de manera basal, es decir, sin exponer a las células a algún agente inductor de apoptosis. HIF-2 α mostró tener un mayor efecto negativo en la viabilidad celular aunque las células con siRNA para HIF-1 α también son mucho más sensibles a apoptosis que las células control. Se encontró que HIF tiene un efecto anti-apoptótico en las células cancerosas de colon aunque la vía de acción no se conoce.

Por último, se realizó un experimento de Wound-healing para ver el efecto que tiene el knockdown de las proteínas HIF en la capacidad invasiva de estas células. Se encontró que las células con siRNA tanto para HIF-1 α como para HIF-2 α son mucho menos invasivas que las células control.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que HIF es muy importante para el mantenimiento del fenotipo maligno de las células cancerígenas. Esta proteína está involucrada en el metabolismo, resistencia a apoptosis, invasión y proliferación de las células cancerígenas de colon. Al bloquear de manera estable la expresión de HIFs en las células malignas, se observa una reversión de características importantes del estado maligno, y por lo tanto HIF puede ser un blanco terapéutico muy importante en los tratamientos para combatir el cáncer.

Referencias:

1. Radtke, F. and Clevers, H. Self-Renewal and cancer of the gut: two sides of a coin". *Science* 307 : 1904-1909.
2. Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Development* 19: 877-890.
3. Bienz, M., Clevers, H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320.
4. Logan, C., Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781-810.
5. Semenza, L. G. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochemical Pharmacology*, 59:47-53.
6. Weidemann, A. and Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1 α . *Nature Publishing Group.* 15:621-22.
7. Clarke, M. F., [et...]. 2006. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: (19).
8. Wiesener, M. S., [et...al]. 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*, 17:271-273.
9. Wang, G. L. y Semenza, G. L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230 – 1237.
10. Makino, Y., [et...al]. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414:550-554.
11. Gordan, J. D. y Simon, M. C. 2007. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Current Opinion in Genetics & Development* 17:71-77.
12. Maltepe, E., [et...al]. 2000. The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and neural responses to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 273:231-238.
13. Gu, Y. Z., [et...al]. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 519-561.
14. Bruick, R. K. y McKnight, S. L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294:1337-1340.
15. Kalio, P. J., [et...al]. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia inducible factor-1. *EMBO J*, 17:6573-6586.
16. Jaakkola, P., [et...al]. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-472.
17. Koivunen, P., [et...al]. 2004. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase FIH in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases *J Bio Chem*, 279:9899-9904.
18. Hu, C. J., [et...al]. 2007. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia inducible factor HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell*, 18:4528-4542.
19. Lando, D., [et...al]. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16:1466-1471.
20. Blow, B., [et...al]. 2003. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4:133-146.

21. Lisy, K. and Peet D. J. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Nature Publishing Group*. 15:642-49.
22. Sancho, E., Batlle, E. and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Bio.* 20:695-723.
23. Majumder, P. K., [et...al]. 2004. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1 dependent pathways. *Nat Med*, 10:594-601.
24. Zelzer, E., [et...al]. 1998. Insulina induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 alpha/ARNT. *EMBO J*; 17:5085-5094.
25. Richard, D. E., [et...al]. 1999. P42/P44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 alpha and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Bio Chem* 274:32631-32637.
26. Ravi, R., [et...al]. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev*; 14:34-44.
27. Liu, Y. V. y Semenza, G. L. 2007. RAC1 vs HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs stabilization. *Cell Cycle*; 6:656-659.
28. Brunel, J. K., [et...al]. 2005. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 1:409-414.
29. Chi, J. T., [et...al]. 2006. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med*, 3:e47.
30. Staller, P., [et...al]. 2003. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumor suppressor pVHL. *Nature*, 425:307-311.
31. Leufgen, H., [et...al]. 2005. Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol* 204:146-154.
32. Erler, J. T., [et...al]. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440:1222-1226.
33. Selak, M. A., [et...al]. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7:77-85.
34. 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* 60:1541-1545.
35. Gustafsson, M. V., [et...al]. 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9:617-628.
36. Koshiji, M., [et...al]. 2004. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 23:1949-1956.
37. Koshi, M. [et...al]. 2005. HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. *Mol Cell*, 17:793-803.
38. Hu, C. J., Satuar, A., Wang, L., Chen, H. and Simon M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol. Bio. Cell*. 18: 4528-4542.
39. Koh, M. Y. and Powis, G. 2009. HIF: the new player in oxygen-independent HIF-1 α degradation. *Cell Cycle* 8:(9), 1359-1366.
40. Raval, R.R., Lau, K.W., [et...al]. 2005. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25:5675-5686.
41. Talks, K. L., [et...al]. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, 157:411-421.

42. Ashcroft, M. and Carroll, V. A. 2006. Role of hypoxia-inducible factor HIF-1 α versus HIF-2 α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or Loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res.* 66:(12) 6264-6270.
43. Wiessener, M. S., [et...al]. 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*, 17:271-273.
44. Iyer, N. V., [et...al]. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev*, 12:149-162.
45. Ryan, H. E. y Johnson, R. S. 1998. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17:3005-30015.
46. Compernelle, V., [et...al]. 2002. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8:702-710.
47. Scortegagna, M., [et...]. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1^{-/-}* mice. *Nat Genet*, 35:331-340.
48. Dale, T.C. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329: 209-223.
49. He, T.C et al. 1998. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 4 September 1998: 1509-1512.
50. Price, M.A., 2006. CKI, Theres more than one: Casein Kinase I family members in Wnt and Hedgehod signaling. *Genes and Dev.* 20:399-410.
51. Yustein, J. [et...al]. 2008. *Nat. Rev. Cancer.* 8(1): 51-56.
52. Neganova, I. and Lako, M. 2008. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J. Anat.* 213: 30-44.
53. Yoo, Y., Hayashi, M., Christensen, J. and Huang, E. L. (2009). An essential role of the HIF-1 α -c-Myc axis in malignant progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1177: 198-204.
54. Michiels, C., [et...al]. 2010. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Molecular Cancer* 9:191.
55. Liu XH, Yu EZ, Li YY, Kagan E. 2006. HIF-1 α has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J Cell Biochem*, 97:755-765.
56. Hussein D, Estlin EJ, Dive C, Makin GW. 2006. Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1 α -dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*, 5:2241-2250.
57. Simone, C. M., [et...al]. 2009. HIF-2 inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death and radiation responses. *PNAS* 106:14391-14396.
58. Scartegagna, M., [et...al]. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaored homeostasis of reactive oxygen species in *Epas^{-/-}* mice. *Nat. Gene* 35:331-340.
59. Yang C., Yan Y., Gupta N., Liu X., He A., Liu L., Zou J., Chang Y. and Fang F. (2007). Pentaspan membrana glycoprotein, prominin 1, is envolved in glucosa metabolism and cytoskeleton alteration. *Biochem.* 72:854-62.
60. Zhao Y., Altman B., Coloff J., Herman C., Jacobs S., Wieman H., Wofford J., Dimascio L., Ilkayeva O., Kelekar A., Reya T. and Ratchmell J. (2007). Glycogen synthase kinase 3 α and 3 β mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol. Cell. Biol.* 27:4328.
61. Blazek ER, Foutch JL, Maki G. (2007) Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133⁻ cells, and the CD133⁺ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jan 1;67(1):1-5.

62. Zhao, et al, (2007), Glycogen Synthase Kinase 3 α and 3 β Mediate a Glucose-Sensitive Antiapoptotic Signaling Pathway To Stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol* 27:4328.
63. Rajasekhara, V. K., Dalerba, P. Passegue, E., Lagasse, E. and Najbauer, J. (2007). Stem Cells, and context dependence. *Stem Cells: Meeting Reports*.
64. Imamura, T., Kikuchi, H., Herraiz, M. T., Park, D., Mizukami, Y., Kenduson, M., Lynch, M. P., Rueda, R. B., Benita, Y., Xavier, R. J. and Chung, D. C. (2009) HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer. *Int. J. Cancer*: 124; 763-71.
65. Peet, J. D., Whitelaw, M. L., Lisy, K., Balrak, W., Fedele, A. O., and Bracken, C. P. 2006. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor HIF-1 α and HIF-2 α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J. Bio. Chem.* 281:(32) 22575-22585.
66. Yoshimura, H., Dhar, K. D., Kohno, H., Kubota, H., Fujii, T., Shudei, U., Kinugasa, S., Tachibana, M. and Nagasue, N. 2004. Prognosis impact of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin. Can. Res.* 10: 8554-8560.
67. Chung, D. C. [et...al]. 2009. HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer. *Int. J. Cancer*. 124: 763-771.
68. Krishnamachary, B. [et...al] Regulation of colon carcinoma cells invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer. Res.* 63: 1138-1143.
69. Covelto, K. L., Simon, M. C., y Keith, B. 2005. Targeted replacement of HIF-1 α by HIF-2 α knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res*, 65:2277-2286.