



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Estandarización de un modelo de hipoxia química en células PC12 con
cloruro de cobalto a través de la estabilización del factor
inducible por hipoxia (HIF-1 α)*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARTÍN EDUARDO ZAVALA MEDINA



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: José Pedraza Chaverri**

VOCAL: **Profesor: María Elena Ibarra Rubio**

SECRETARIO: **Profesor: María Elena Chánez Cárdenas**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Euclides Ávila Chávez**

2do. SUPLENTE: **Profesor: Laura Carmona Salazar**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”, EN COLABORACIÓN CON LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ BAJO EL APOYO DE LA BECA DE PREGRADO OTORGADA POR LA FUNDACIÓN “ARMSTRONG”

Asesor: Dra. María Elena Chánez Cárdenas

Supervisor técnico: Dra. Marisol Orozco Ibarra

Sustentante: Martín Eduardo Zavala Medina

Dedicatorias

A mi único y verdadero amor Anne

A mí mismo...

A mi familia...

Este trabajo se lo dedico a los seres más importantes de mi vida, mis papás Martín Zavala y María de Jesús Medina, a mi hermana Karen y a mi corazón Anne Nurmi.

Gracias por todo.

"Oh, please don't only live in dreams, you have to concentrate in continuing giving your best, to go on with the best life you can get for yourself, don't waste time and energy in vain. I will always be there, if you need me"

Anne Nurmi

Agradecimientos

A toda mi familia por ayudarme a crecer, por acompañarme desde mis primeros instantes, por ser uno de los motivos principales para vivir, por todas las enseñanzas que me han brindado aunque me falta mucho por aprender y por poner en práctica, por los valores que han sido inculcados y las responsabilidades adquiridas gracias a los consejos y el amor

A mi papá Martín por ser alguien responsable, fuerte, cariñoso y quien me ha sabido llevar por un camino lleno de éxitos, por su amor y sabiduría

A mi mamá Ma. de Jesús por el apoyo incansable, los ánimos, los consejos y la motivación total para nunca detenerme y tratar de dar siempre lo mejor en la vida. Por su amor y sabiduría

A mi hermana Karen por ser un apoyo incondicional, y una persona que me brinda todo su amor y sobre todo comprensión ante cualquier problema que se presenta en mi camino

Al amor de mi vida Anne, por ser mi mayor motivación en el mundo (al hacerme ver que no debo nunca gastar el tiempo en vano sino aprovecharlo al máximo para obtener lo mejor de mi ser) y la única razón por seguir adelante, por el tiempo compartido, por sus palabras y amor, por ser la mujer que ha sido mi inspiración en todos y cada uno de los proyectos que hasta ahora he enfrentado, y que gracias a su existencia soy completamente feliz y me hace sentirme totalmente vivo

Al resto de mi familia, que me han dado sus palabras de motivación y me han apoyado moralmente para nunca derrotarme y continuar dando lo mejor de mí

La Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa de estudios que me ha brindado la oportunidad de tener una educación de un nivel excelente, que me llevará a cumplir mis deberes como persona

A la Facultad de Química, la mejor escuela que pude haber elegido para llevar a cabo mis estudios de licenciatura en QFB, y a todos y cada uno de los profesores que hicieron y que han hecho posible cumplir mis metas como estudiante, gracias por todo el apoyo que ahí recibí

A mi tutora por su gran ayuda, su paciencia, su dedicación, sus consejos y todo el trabajo realizado en el laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral para llevar a cabo el presente escrito, por todo el apoyo flexibilidad mostrados durante todo este periodo de mi vida, por ser también excelente persona y ejemplo de vida profesional

A los doctores Marisol y José Pedraza, por el apoyo enorme al hacer posible la realización de todo el proyecto ya que gracias a su trabajo pude lograr de una manera adecuada mi desarrollo experimental

Al doctor Benjamín Pineda por su gran colaboración y aportación al trabajo experimental de casi la mitad del contenido del proyecto realizado

A todas las personas que apoyaron en este proyecto, y aportaron sus valiosas experiencias e ideas para poder lograr mejores resultados y concluir este trabajo

A mis amigos que han estado conmigo en todas esas experiencias agradables en mi vida, por su confianza, apoyo, cariño, comprensión y diversión

ÍNDICE

Abreviaturas	8
RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
• Hipoxia celular	
• Hipoxia química	
• HIF como factor fundamental en eventos de hipoxia	
• Estructura y regulación de HIF	
• Prolil-hidroxilasas	
• Modelos de hipoxia <i>in vitro</i>	
• Modelos de hipoxia química	
• El CoCl ₂ como generador de hipoxia química	
• Células PC12	
II. JUSTIFICACIÓN.....	29
III. OBJETIVOS.....	30
Objetivo general	
Objetivos Particulares	
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
• Cultivo celular	
• Determinación de la viabilidad celular por reducción de MTT a formazán	

- Determinación de HIF-1 α por *western blot*
- Sobreexpresión de un control positivo de HIF-1 α
- Determinación de HIF-1 α por inmuno-detección
- Medición de ROS intracelulares como respuesta a la incubación con CoCl₂
- Determinación del patrón de degradación del ADN por técnica de escalera (DNA laddering)
- Determinación del pico Sub G₀ con IP por citometría de flujo
- Evaluación de apoptosis y necrosis celular en PC12 tratadas con CoCl₂ por tinción diferencial con IP y A (V) por citometría de flujo
- Análisis estadístico

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....37

- Determinación de la viabilidad celular en PC12 tratadas con CoCl₂
- Niveles de expresión del HIF-1 α por *western blot*
- Determinación de HIF-1 α activo
- Niveles de ROS intracelulares por la inducción del evento hipóxico con CoCl₂
- Fragmentación del ADN
- Efecto del CoCl₂ en la muerte celular
- Determinación de la muerte celular por necrosis y/o apoptosis

VI. CONCLUSIONES.....60

VII. PERSPECTIVAS.....62

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

ABREVIATURAS

A (V)	Anexina V (del inglés <i>Annexin V</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
DCF-DA	Diclorofluoresceína diacetato (del inglés <i>dichlorofluorescein diacetate</i>)
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa (del inglés <i>hypoxia inducible factor 1-alpha</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
IP	Yoduro de propidio
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MTT	Bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio
NOS	Síntasa de óxido nítrico (del inglés <i>nitric oxide synthase</i>)
ODDD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno (del inglés <i>oxygen dependent degradation domain</i>)
p53	Proteína supresora de tumores p53
PBS	Buffer salino de fosfatos (del inglés <i>phosphate saline buffer</i>)
PC12	Células del feocromocitoma de rata
pVHL	Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

TAD Dominio de transactivación del HIF-1 α (del inglés *transactivation domain*)

VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés *vascular endothelial growth factor*)

RESUMEN

Actualmente existe una gran cantidad de estudios que evalúan el efecto protector de moléculas o compuestos ante eventos que involucran la disminución de las concentraciones normales de oxígeno. Estos estudios se desarrollan en modelos *in vivo* e *in vitro* generados con la finalidad de reproducir el daño que ocasiona la hipoxia o la anoxia en los organismos vivos así como evaluar compuestos que tengan un efecto neuroprotector.

Los modelos *in vitro* ofrecen ciertas ventajas al diseño experimental por la obtención de resultados más directos y reproducibles en la mayoría de los casos, pero también presentan diversas desventajas que los descartan como primera opción de análisis. Dentro de los modelos de hipoxia *in vitro*, los modelos de hipoxia química inducen una señalización que simula el déficit de oxígeno en cultivos celulares principalmente mediante el uso de agentes o reactivos químicos en concentraciones tóxicas para la célula. En estos modelos pueden medirse diversos marcadores que comprueban el daño provocado por hipoxia en las células, como la respuesta génica y la viabilidad celular, entre otras.

En este proyecto se utilizó un modelo *in vitro* de hipoxia química en células del feocromocitoma de rata (PC12). Con base en los resultados de publicaciones anteriores se utilizó al cloruro de cobalto (CoCl_2) para simular el evento hipóxico en las células a través de la estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), uno de los principales reguladores de la homeostasis de oxígeno en las células.

Se utilizaron dos diferentes concentraciones de CoCl_2 (0.5 y 1.0 mM) a diferentes tiempos de incubación (24 y 48 h) en las células. Se midió la viabilidad celular por reducción de bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán, los niveles de HIF-1 α activo por inmuno-detección y *western blot* y la fragmentación del ADN por patrón de escalera. Se evaluaron también los niveles de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por fluorescencia con diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) y finalmente se midió la muerte celular por tinción con yoduro de propidio (IP) así como una tinción diferencial entre muerte por apoptosis y necrosis con anexina V/IP.

Se observó un incremento en los niveles de HIF-1 α activo con 0.15, 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h. La viabilidad celular se reduce considerablemente a medida que aumenta la concentración de CoCl_2 y el tiempo de incubación. No fue posible observar la fragmentación del ADN bajo ningún tratamiento de CoCl_2 . Los niveles de ROS intracelulares se incrementaron durante la cinética evaluada (10 min) a 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 . La inducción de muerte celular fue evidente para 0.5 y 1.0 mM a 24 y 48 h de tratamiento y fue posible diferenciar el tipo de muerte celular ocurriendo ésta mayoritariamente por apoptosis con 0.5 y 1.0 mM a 24 y 48 h de incubación.

Se logró establecer un modelo simulador del evento hipóxico *in vitro* en el cual se consiguió medir diferentes marcadores de daño celular, desencadenados por el tratamiento con CoCl_2 como son: reducción en la viabilidad celular, estabilización del HIF-1 α y su actividad transcripcional, generación de ROS, daño al ADN y muerte celular.

I. INTRODUCCIÓN

Hipoxia celular

El oxígeno juega un papel fundamental en los seres vivos aerobios ya que participa en procesos bioquímicos que permiten que la célula sobreviva y lleve a cabo sus funciones. El oxígeno es el combustible para la maquinaria celular, además es forma parte del sustrato de enzimas como las monooxigenasas, las hidroxilasas y la superóxido dismutasa y es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria.

Una de las principales consecuencias de la pérdida en la homeostasis del oxígeno recae en la obtención de energía en las células. La oxidación de una molécula de glucosa en CO₂ y agua en condiciones aeróbicas, proporciona suficiente energía, equivalente a 38 moléculas de ATP. Una disminución en la producción de esta molécula de alta energía produce alteraciones en numerosas vías metabólicas como la glucólisis y funciones homeostáticas celulares, promueve la acumulación de lactato y disminución en el pH intracelular, que llevan al desarrollo de ciclos biológicos anormales y muerte celular. Si la presión parcial de oxígeno se altera, se produce una disminución en la síntesis de proteínas por ejemplo la piruvato deshidrogenasa, despolarización membranal e interferencia con el funcionamiento de las bombas iónicas responsables de la homeostasis de sodio y potasio en la célula. El resultado final es inflamación celular y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (*Narita et al., 2009*).

La hipoxia es una reducción en la presión parcial de oxígeno en sangre, células y tejidos de un organismo, alterando su función (*Narita et al., 2009*). En el interior de las células los eventos hipóxicos son muy frecuentes y se deben a una

gran cantidad de sucesos como fallas energéticas, alteraciones al funcionamiento alveolar y fallas de intercambio gaseoso, fallas en el funcionamiento y metabolismo mitocondrial, competitividad de otro gas con el oxígeno y algunas patologías como la diabetes (*Aguilera et al., 2009*).

En términos generales una disminución del aporte normal de oxígeno en las células desencadena una serie de eventos excitotóxicos principalmente por glutamato y aspartato, eventos oxidativos por la generación de ROS, inflamatorios por una inducción excesiva de respuesta inmune y apoptóticos que se extrapolan hasta daño tisular y daño generalizado al organismo (revisado en *Aguilera et al., 2009*).

Los eventos hipóxicos desatan una serie compleja de procesos fisiológicos como son:

- a) Excitotoxicidad y falla energética: la mayoría de las células requieren un alto consumo de oxígeno para obtener energía en forma de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. En la hipoxia hay una disminución en la síntesis de ATP, lo que inhibe la acción de las ATPasas de Na^+ y K^+ y por lo tanto las membranas celulares se despolarizan debido a una pérdida en el potencial basal. Como consecuencia, se pierde la homeostasis de diversos iones como el K^+ , el Na^+ y principalmente el Ca^{2+} . Esto genera una liberación excesiva de aminoácidos excitadores al espacio extracelular. Por otro lado, su recaptura está impedida por ser un proceso dependiente de energía, lo que provoca una acumulación de glutamato en el espacio extracelular, la activación de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y metabotrópicos a glutamato generando una sobrecarga de Ca^{2+} y edema celular. El incremento de Ca^{2+} , por su parte, desata diversas cascadas de señalización como la activación de enzimas proteolíticas que degradan proteínas de citoesqueleto como actina y espectrina, la activación de fosfolipasa A_2 y ciclooxygenasa

(que inducen a la formación de ROS). También se genera el óxido nítrico, sintetizado por una enzima calcio dependiente conocida como sintasa de óxido nítrico (NOS), que reacciona posteriormente con un átomo de anión superóxido para formar peroxinitrito, promoviendo un fuerte daño celular (Agani et al., 2000; Dirnagl et al., 1999).

La mitocondria es la principal fuente de ROS cuando ocurre un evento hipóxico. Esto inicia cuando se aceleran las reacciones enzimáticas como el metabolismo oxidativo del ácido araquidónico y la producción de anión superóxido proveniente de la cadena respiratoria, entre otras (Margaill et al., 2005). La mitocondria es afectada a nivel de membrana, como consecuencia de la pérdida de la función de las proteínas que la componen, provocando que desarrollen poros e incrementen notablemente su permeabilidad. Esto genera una disminución en la producción de ATP, una producción masiva de ROS y liberación de citocromo C para promover la muerte por apoptosis (Agani et al., 2000). La falla energética total y la consiguiente ruptura de la homeostasis iónica intracelular son seguidas por muerte celular desatada por mecanismos como: proteólisis, lipólisis y desagregación de microtúbulos.

- b) Inflamación y respuesta inmunológica: la activación de segundos mensajeros, la generación de ROS, así como la regulación génica desencadenan la expresión de numerosos genes pro-inflamatorios por medio de la inducción de factores de transcripción como NF- κ B (de *nuclear factor κ B*), HIF-1 α , IRF-1 (de *interferon regulatory factor-1*) y STAT3. Algunos mediadores de inflamación, como el factor activador de plaquetas, el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 1- β , son producidos en el interior de las células hipóxicas y como consecuencia se induce la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular incluyendo ICAM-1 (de *intercellular adhesion molecule 1*), P-selectinas y E-selectinas (Dirnagl et al., 1999; Ziello et al., 2007). Estas moléculas de respuesta inflamatoria

interactúan con elementos y células del sistema inmune mayormente macrófagos, monocitos y neutrófilos para contrarrestar el daño hipóxico. Esta etapa ocurre de manera inmediata *in vitro* tras la generación de ROS (Ziello *et al.*, 2007).

- c) Apoptosis y muerte celular: las células dañadas por un evento hipóxico, y que están comprometidas por la excitotoxicidad, la generación abundante de ROS, la acumulación de Ca^{2+} , el daño a la mitocondria y al ADN, pueden morir por apoptosis o necrosis (Dirnagl *et al.*, 1999). La respuesta celular a hipoxia juega un papel central en la regulación de procesos biológicos como la apoptosis, modulándose la expresión de genes que codifican para caspasas, así como genes que suprimen o promueven la muerte celular y se expresan en altos niveles cuando la célula se encuentra en hipoxia.

Las caspasas 1 y 3 son las que juegan un papel central en el control de la apoptosis. La vía apoptótica mediada por caspasas está asociada a la liberación del citocromo C de la mitocondria, al activar al complejo apoptosómico APAF-1 + caspasa 9 en presencia de ATP, la formación de este complejo activa la caspasa 3. Adicionalmente, al disminuirse el pH intracelular causado por la aceleración en las vías metabólicas, provoca una acidosis por acumulación de lactato que desencadena apoptosis (Luo *et al.*, 2006).

- d) Regulación génica: existe una gran variedad de respuestas de regulación génica que actúan ante un cuadro de hipoxia en las células. Este tipo de respuestas son las más estudiadas en la investigación del daño hipóxico. Una de ellas que involucra la activación o supresión de genes está dada por la acción de p53. En respuesta a hipoxia, p53 puede inducir un arresto al ciclo celular y/o muerte celular por apoptosis. A su vez actúa como factor de transcripción encendiendo diversos genes de respuesta ante el efecto de la

disminución de oxígeno como EPO (gen de eritropoyetina), VEGF (de *vascular endothelial growth factor*) y GLUT-1 (de *glucose transporter 1*). Existe evidencia experimental de la presencia de factores transcripcionales claves en la regulación génica que responden específicamente a cambios en los niveles de oxígeno (Zagórska y Dulak, 2004). Estos factores llamados HIF se encuentran en todas las células de mamíferos (Lisy y Peet, 2008; Osada-Oka et al., 2010; Pappalardi et al., 2011; Zagórska y Dulak, 2004) (Fig. 1).

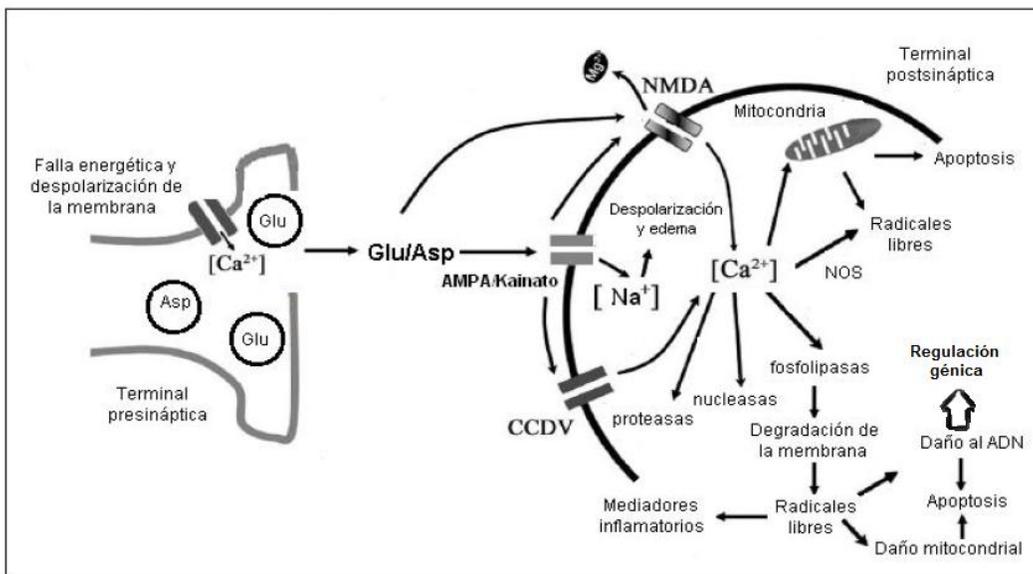


Fig.1.- Principales eventos intracelulares en hipoxia que comprenden excitotoxicidad por glutamato, falla en la homeostasis de calcio, inflamación, daño mitocondrial, apoptosis y/o necrosis, daño al DNA y regulación en el programa de expresión génica. Modificado de Camacho et al. (2006).

Hipoxia química

El término de hipoxia química se refiere a la simulación de la respuesta celular ante los efectos de un evento hipóxico en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Una de estas representaciones se basa en el uso de compuestos químicos que inducen cascadas de señalización semejantes a las que ocurren

en un sistema vivo. Estos agentes actúan como inhibidores o moduladores enzimáticos, modificando las vías de señalización o modulando la expresión de genes de respuesta ante una detección baja de niveles de oxígeno. Los modelos de hipoxia química más utilizados son *in vitro*, y emplean como inductores de la respuesta hipóxica compuestos metálicos como el cloruro de cobalto, de níquel y de cobre, que actúan como moduladores enzimáticos al bloquear el sitio catalítico de las enzimas que se encargan de la regulación de la subunidad alfa de HIF-1 α que forma parte del heterodímero transcripcional que es el principal controlador de la respuesta generalizada a hipoxia (*Bergueron et al.*, 2000; *Bracken et al.*, 2006; *Kallio et al.*, 1997).

HIF como factor fundamental en eventos de hipoxia

La respuesta celular a la hipoxia es un proceso que juega un papel central en diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer, infartos y derrames cerebrales. Al interior de las células, este proceso está coordinado por factores de transcripción que son sensibles a los cambios en las concentraciones de oxígeno y que inducen modificaciones en los patrones de expresión génica celular (*Cabanillas*, 2008). Esta respuesta génica ante el proceso de hipoxia puede esquematizarse en tres sistemas: a) de detección o de sensor de oxígeno, b) de regulación, mediante el control de la expresión de una amplia serie de genes, y c) efector múltiple, que incluye no solo expresión de genes, sino también diversos cambios funcionales, que van desde la estimulación de moléculas vasodilatadoras hasta las variaciones en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (*Caramelo et al.*, 2006).

El factor que juega el papel principal en la detección de los niveles de oxígeno y el que ha sido mayormente estudiado y descrito es el HIF. Este factor de transcripción fue descrito por Semenza y colaboradores (1995) y se activa

específicamente durante la hipoxia. Los demás factores de transcripción involucrados en este tipo de respuestas carecen de esta especificidad.

El HIF regula directamente la transcripción de más de 70 genes involucrados en procesos celulares que actúan disminuyendo la dependencia y el consumo de oxígeno celular e incrementando la eficiencia del transporte del mismo a las células cuando se presenta un evento hipóxico. Dentro de los genes regulados por HIF se encuentran aquellos que participan en procesos como angiogénesis, transporte de oxígeno, metabolismo de hierro, glucólisis, absorción y recaptura de glucosa, señalización de factores de crecimiento, apoptosis, invasión y metástasis entre otros (*Bárdos y Ashcroft, 2005*).

Estructura y regulación de HIF

El HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β con pesos moleculares aparentes de 120-130 kDa y 91-94 kDa en humano, respectivamente. Ambas subunidades son homólogas en sus extremos amino al contener un dominio bHLH (de *basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN. La subunidad alfa es regulada directamente por las condiciones de oxígeno intracelular, mientras que la subunidad β es constitutiva e idéntica al ARNT (de *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). El extremo COOH-terminal de la subunidad alfa contiene dos dominios de transactivación (TAD) y uno de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de este factor (*Caramelo et al., 2006*).

Existen tres parálogos de la subunidad alfa, conocidos como: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . Sólo las isoformas 1 y 2 tienen actividad transcripcional eficiente en la regulación génica, particularmente el HIF-1 α (*Vengellur et al., 2004*). Hasta ahora no se ha determinado la función de HIF-3 α como un factor

transcripcional activo. Sin embargo, se ha descrito que un producto de *splicing* alternativo (ARN) de HIF-3 α es capaz de ejercer una actividad transcripcional inhibitoria ante la respuesta de hipoxia, provocando que el dominio PAS se convierta en una proteína inhibitoria descrita como IPAS (de *Inhibitory PAS domain protein*) (Lisy y Peet, 2008), regulando negativamente a HIF.

La subunidad 1 α de HIF es una proteína de 826 aminoácidos (~120 kDa) y su regulación está dada con base en los niveles de oxígeno disponibles en la célula. En condiciones normóxicas, las subunidades α son rápidamente degradadas vía proteasomal. La degradación se lleva a cabo por un mecanismo que involucra la hidroxilación del HIF-1 α por enzimas prolil-hidroxilasas (PHD1, PHD2 y PHD3) y una asparagin-hidroxilasa (FIH, de *Factor inhibiting HIF*) dependientes de oxígeno (Berra, et al., 2003; Bruick y McKnight, 2001; Hirsilä et al., 2004). Las prolinas 402 y 564, así como la asparagina 803 localizadas en el ODDD de HIF-1 α se hidroxilan en respuesta a niveles normales de oxígeno molecular en las células. La hidroxilación de las prolinas destinan al HIF-1 α a ser reconocido por la proteína von Hippel Lindau (pVHL), una proteína con actividad de E3-ubiquitín-ligasa, que coloca ubiquitinas a HIF-1 α marcándola para degradación proteasomal. Por otro lado, la hidroxilación del residuo de asparagina por el FIH, previene la unión del HIF-1 α / β al coactivador transcripcional p300/CBP inhibiendo su actividad de factor de transcripción.

La importancia de la reacción de hidroxilación en los residuos, radica en que la pVHL sólo reconoce a HIF-1 α cuando las prolinas 402 y 564 se encuentran hidroxiladas (Fig. 2).

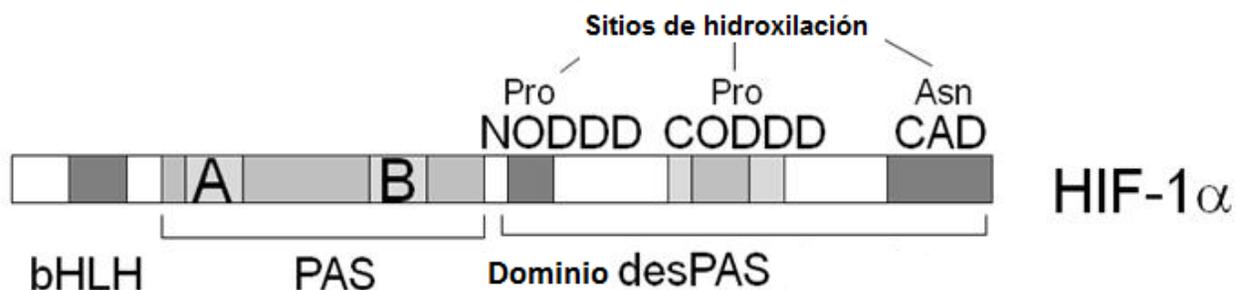


Fig. 2.- Representación del HIF-1 α , donde se observan las regiones de hidroxilación de la proteína en las prolinas 402 y 564, y en la asparagina 803. Donde las regiones son NODDD, amino terminal del dominio desPAS (ODDD), CODDD la región carbono terminal del mismo y CAD la carbono terminal de la proteína. Modificado de *Pappalardi et al.* (2011).

Bajo condiciones hipóxicas la acción de las hidroxilasas se inhibe y el HIF-1 α se estabiliza, se transloca al núcleo para formar el heterodímero con HIF-1 β , se une a los HRE (del inglés *hypoxia response element*) en el ADN (región promotora) y regula la expresión de genes (*Bardós y Ashcroft, 2005; Correia y Moreira, 2010*). Las secuencias HRE poseen dos o más regiones de reconocimiento al HIF-1 α , llamadas HBS (de *HIF Binding Sites*). La unión de HIF-1 α al promotor aumenta por la presencia de dos o más sitios HRE próximos entre sí (*Cabanillas, 2008*). La secuencia consenso de ADN para la unión de HIF-1 α 5'-(A/G)CGTG-3', es común para muchos genes regulados positivamente por concentraciones bajas de oxígeno (*Semenza et al., 1996*). Una vez que HIF-1 α/β reconoce a la secuencia consenso, el HIF-1 β recluta los coactivadores necesarios para la actividad transcripcional en el CAD del HIF-1. Los cofactores transcripcionales p300/CBP, hsp90 y c-JUN funcionan como factores de anclaje y permiten la unión de otros factores transcripcionales al heterodímero para montar la respuesta. El complejo p300/CBP interactúa con el CAD del HIF-1 α a través de su dominio CH1 (de *cysteine-histidine-rich*) (*Gu et al., 2001*) y reúne los coactivadores accesorios, como las histona-acetiltransferasas SRC-1, TIF-2 y el factor redox Ref-1 (*Ema et al., 1999*) (Figs. 3 y 4).

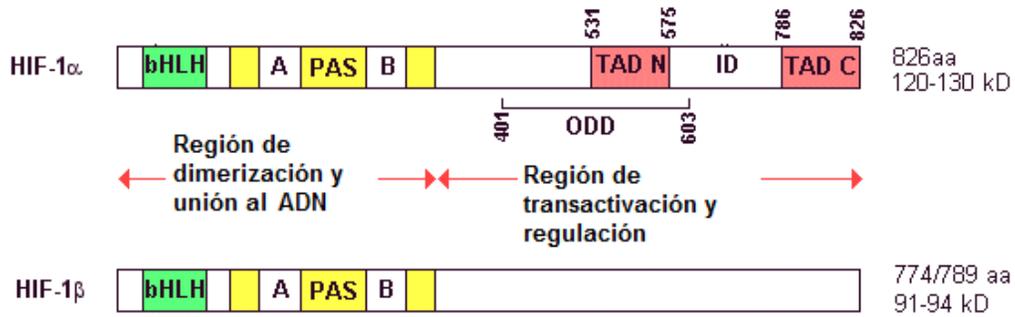


Fig. 3.- Representación de las subunidades α y β del HIF-1. Se observan las regiones de reconocimiento y unión al ADN (HRE) y los dominios principales de cada subunidad.

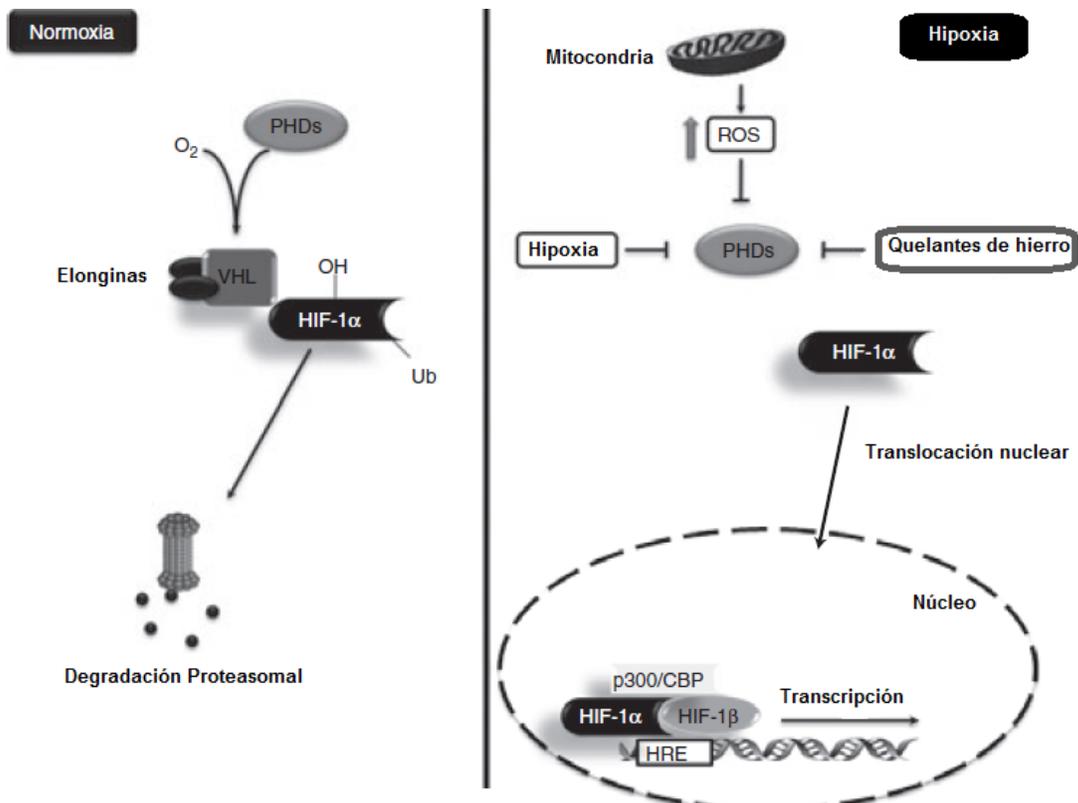


Fig. 4.- Representación de la regulación del HIF-1, en condiciones de normoxia donde es degradado por el proteasoma (izquierda). Regulación del HIF-1 en condiciones de hipoxia o inactivación de las prolihdroxilasas y su actividad transcripcional (derecha). Modificado de *Correia y Moreira*. (2010).

Prolil-hidroxilasas (PHDs)

Las isoenzimas PHDs forman parte de la subfamilia de las dioxigenasas, proteínas conservadas a lo largo de la evolución. Las PHDs utilizan oxígeno y 2-oxoglutarato como co-sustratos, y son dependientes de α -cetoglutarato (α -KG). Sus cofactores son el hierro y el ascorbato. La reacción que llevan a cabo es una descarboxilación desacoplada del 2-oxoglutarato en la posición 4 de las prolinas 402 y 564 del HIF-1 α , localizadas en el ODDD (*Pappalardi et al., 2011*). La reacción ocurre en presencia de hierro, oxígeno y ácido ascórbico. Los productos de reacción que se forman son el ácido succínico y el CO₂. Para las PHDs, el sustrato primario es el HIF-1 α (*Huang et al., 2002; Metzen et al., 2003; Pappalardi et al., 2011; Villar et al., 2007*). Las PHDs que hidroxilan al HIF-1 α son tres y se denominan PHD1, PHD2 y PHD3. Eventos como la hipoxia, la disminución en la disponibilidad del hierro y el incremento en la tasa de oxidación del ascorbato por estrés oxidante, ocasionan que las PHDs pierdan su función de hidroxilación al HIF-1 α (*Vengellur et al., 2004*). Las tres isoformas de las PHDs pueden actuar sobre el HIF-1 α , sin embargo se ha observado que la isoforma 2 es la más efectiva al hidroxilar de forma más eficiente a la prolina 402. La especificidad de la reacción de hidroxilación que llevan a cabo las diferentes isoformas de las PHDs sobre el HIF-1 α se basa en sus niveles de expresión (PHDs), el estado hipóxico y el tipo de célula (*Hirsilä et al., 2004*).

Modelos de hipoxia *in vitro*.

Para estudiar los procesos que se desatan por un evento hipóxico en células y tejidos, se han desarrollado una gran cantidad de modelos que representan o simulan dichos efectos. Éstos son de dos tipos: *in vivo* e *in vitro*. El principal objetivo de estos modelos, es encontrar nuevas opciones de tratamiento y terapias que sean efectivas para dirigirlas a pacientes con patologías que van

desde los eventos hipóxicos hasta infartos cerebrales causados por cuadros isquémicos.

Dentro de las ventajas de utilizar modelos *in vivo* para eventos de hipoxia, se encuentra la similitud fisiológica y anatómica entre los animales de experimentación y el ser humano. Por lo anterior, los resultados obtenidos en estos modelos serán más confiables para extrapolarlos y aplicarlos en tratamientos clínicos. Otras ventajas son el poder medir las alteraciones conductuales en el animal como respuesta al tratamiento, así como la posibilidad de llevar a cabo el análisis histológico en los tejidos íntegros. Los modelos *in vivo* también tienen desventajas, como el control de un mayor número de variables simultáneas (*Traystman, 2003*), la necesidad de una mayor cantidad de personal capacitado para realizar los procedimientos, la variabilidad entre individuos, el tiempo para la obtención de resultados y se consideran métodos invasivos.

Es por eso que a la par de esos modelos se han desarrollado los modelos *in vitro* que utilizan como base los cultivos celulares y/o tejidos extraídos de animales. Existen varios modelos de hipoxia que utilizan diversos linajes celulares, cultivos primarios de neuronas o células gliales de corteza, hipocampo, cerebelo o hipotálamo (regiones que se encuentran en las zonas más afectadas por el daño hipóxico) (*Fang et al., 2008*). Existen modelos donde las líneas celulares no sólo pertenecen a linajes cerebrales sino que la gama de cultivos ya se ha abierto hacia otras líneas que pertenecen a tejidos medulares, tumorales o de comunicación que se localizan en el Sistema Nervioso Periférico y músculo esquelético, así como células embrionarias y células troncales que se utilizan en estadios semidiferenciados o totalmente diferenciados hacia células neuronales.

Se encuentran diversas ventajas al utilizar modelos *in vitro* para estudiar eventos de hipoxia: se puede tener un mejor control de algunas variables como la temperatura de incubación y la presión, el tiempo para la obtención de resultados es generalmente corto y son métodos menos invasivos.

Los modelos *in vitro* para estudios de hipoxia se pueden dividir en: (1) aquellos modelos que se caracterizan por cultivar a las células en condiciones hipóxicas, es decir en cámaras de CO₂ o simplemente incubarlas con una concentración de oxígeno por debajo del 20% y (2) los que emplean agentes químicos que generan vías de señalización similares a las que se desencadenan cuando la concentración de oxígeno es baja en el medio intracelular.

Modelos de hipoxia química

Los modelos de hipoxia química se utilizan frecuentemente *in vitro* para obtener una mayor eficiencia y reproducibilidad en los resultados. Existen varias formas de simular una respuesta ante un cuadro hipóxico con agentes químicos. Actualmente se han utilizado inhibidores de la cadena respiratoria, inhibidores enzimáticos que inhiben la función de las PHDs, inhibidores de proteasoma y compuestos que estabilizan al HIF-1 α .

Entre estos compuestos, los más empleados son la deferoxamina, la mimosina, la o-fenantrolina y la yodo-cloro-hidroxiquinolina que actúan como quelantes de Fe²⁺, el cual funciona como cofactor en el sitio catalítico de las PHDs. Se usan también algunos iones metálicos, los cuales se cree sustituyen al hierro en el sitio catalítico de las PHDs. También hay inhibidores específicos de las isoformas de las PHDs, en particular el fumarato, el oxaloacetato, el citrato y el succinato que actúan sobre la PHD1 al interactuar con el sitio catalítico de ésta, sustituyendo al ascorbato; o inhibidores específicos de FIH como el piruvato. Otros compuestos como la baicaleina que son utilizados en los modelos, son de carácter antioxidante. Este compuesto inhibe la acción de la PHD2 y suprime la hidroxilación de la asparagina 803 del HIF-1 α en cultivos tisulares (revisado en *Aguilera et al., 2009; Hewitson et al., 2007; To y Huang, 2005*).

Dentro de los mecanismos mencionados, uno de los más empleados para generar hipoxia química es la estabilización de HIF-1 α con el uso de compuestos metálicos con la finalidad de desatar una respuesta génica similar a la generada por la disminución de oxígeno.

Existen varios compuestos metálicos que se utilizan como simuladores de hipoxia química como el cobalto, el níquel (*Salnikow et al.*, 1999), el zinc, el cromo (VI) (*Kaczmareck et al.*, 2007), el arsénico (III) y (V), el vanadio (V) y en menor intensidad el cobre (II) (*Kaczmareck et al.*, 2009). Su mecanismo de acción no es totalmente conocido y puede deberse a la estabilización del HIF-1 α al unirse fuertemente a su ODDD en el dominio PAS (*Hirsilä et al.*, 2005), la inhibición de la reacción de hidroxilación de la subunidad alfa sustituyendo al hierro en las PHDs o disminuyendo la disponibilidad del ascorbato que controla la transición del hierro en sus estados de oxidación y lo mantiene como Fe²⁺, evitando así la degradación de HIF-1 α ya que el hierro oxidado no puede unirse al sitio catalítico de las PHDs (*Vengellur et al.*, 2004). Se ha observado que el metal más eficiente para generar la señalización por hipoxia es el cobalto al estabilizar la subunidad alfa del HIF y aparentemente, bloqueando con mayor afinidad y eficiencia el sitio activo de las PHDs. La respuesta génica ante hipoxia regulada por el HIF y que ha sido evaluada tras el uso del cobalto involucra genes relacionados con la eritropoyesis, la angiogénesis y el transporte de glucosa entre otros (*Li et al.*, 2006). Dentro de la simulación de la señalización por hipoxia también se ha visto que el cobalto induce muerte celular mayoritariamente por apoptosis al incrementar la generación de ROS intracelulares principalmente (*Jung et al.*, 2007).

El CoCl₂ como generador de hipoxia química

La generación de condiciones semejantes a la hipoxia en células tratadas con iones metálicos, particularmente cobalto, se describió por primera vez por

Bunn y colaboradores en 1988 (revisado en *Goldberg et al.*, 1988), quienes encontraron un notable incremento en los niveles de EPO un gen altamente regulado por HIF y sobreexpresado en eventos de hipoxia.

El cobalto puede mimetizar la señalización por hipoxia por diversos mecanismos, existen tres hipótesis sobre cómo estabiliza la subunidad alfa del HIF:

La primera hipótesis propone un mecanismo por el cual el cobalto se une fuertemente al dominio PAS del HIF-1 α en diversos sitios de la secuencia en la región N-terminal, implicada en la unión de la subunidad con el HRE. Esta unión permite la ubiquitinación de la subunidad alfa, pero la hace resistente a la degradación vía proteasomal, provocando la acumulación de la subunidad y su estabilización. Dicha hipótesis implica una modulación pVHL-independiente y representa una de las formas de la regulación del HIF-1 α , consiguiendo que se transloque al núcleo y ejerza su acción transcripcional (*Kanaya y Kamitani*, 2003).

La segunda hipótesis plantea que el cobalto (y en general, los iones metálicos divalentes) sustituye al hierro en el sitio catalítico de las PHDs. Dentro de este apartado existen dos mecanismos reportados: a) la hipótesis del reemplazo, donde la semejanza química entre los iones Fe²⁺ y Co²⁺ permite el ensamblaje del cobalto en el sitio activo de las PHDs inhibiendo la hidroxilación de las prolinas y como consecuencia se estabiliza el HIF-1 α (*Davidson et al.*, 2006; *Schotfield y Ratcliffe*, 2004, *Epstein et al.*, 2001) y b) la hipótesis de la oxidación del hierro a Fe³⁺ por la presencia del cobalto. Esta hipótesis se basa en que el ácido ascórbico es necesario para mantener reducido al hierro en las prolil-hidroxilasas. El cobalto oxida al ácido ascórbico directa, catalítica o indirectamente a través de la generación de ROS y el hierro oxidado ya no puede funcionar como cofactor de las PHDs. En ambas hipótesis la acción de las PHDs es considerablemente inhibida (*Kaczmareck et al.*, 2009).

Por último, la tercera hipótesis propone que el ion cobalto genera una gran cantidad de ROS con rapidez, lo que conlleva a una oxidación acelerada del hierro impidiendo que este último se ensamble al sitio activo de las PHDs y que se inhiba la reacción de hidroxilación del HIF-1 α . El ambiente oxidativo que induce el cobalto induce apoptosis celular, y encendiendo la vía de las MAP cinasas, la cual regula gran parte de la señalización intracelular e intramitocondrial encargada de la homeostasis en las células (Guo et al., 2006).

Células PC12

Se han utilizado muchas líneas celulares para estudiar los modelos de hipoxia química, la selección de estos linajes se realiza conforme a las necesidades del protocolo a seguir. Para generar hipoxia química, deben utilizarse células que sean muy susceptibles a los cambios en las concentraciones de oxígeno. Las células PC12 son una línea derivada del feocromocitoma (tumor que afecta a las células cromafines), proveniente de la médula adrenal de la rata o de células endoteliales de la médula adrenal bovina. Las PC12 exhiben las propiedades fenotípicas de los feocromocitomas y las variantes no neoplásicas de las células cromafines (células nombradas así por ser visualizadas mediante tinciones con sales de cromo).

Las células PC12 responden de forma rápida y específica ante las variaciones de los niveles de oxígeno. Muchos de los experimentos relacionados con hipoxia y diferenciación neuronal están ampliamente reportados con estas células (*Green y Tischler, 1976*). También se han utilizado en varios tipos de estudios neurobiológicos, neurotoxicológicos y de señalización como modelo de diferenciación neuronal, de hipoxia o simplemente para evaluar la expresión proteica y de factores de crecimiento ante diversos tratamientos (*Vaudry et al., 2002*).

Entre las características generales de estas células, destacan: ser células secretoras de catecolaminas, adquirir una morfología y características

bioquímicas de células cromafines, detener su división y experimentar una diferenciación terminal cuando son expuestas al factor de crecimiento nervioso (*NGF*) con un notable cambio en su fenotipo y adquirir características bioquímicas de neuronas simpáticas, extendiendo sus neuritas y volviéndose eléctricamente excitables (*Das et al.*, 2004). Las PC12 expresan receptores a GABA (ácido- γ -aminobutírico). Esta línea celular permite un rápido escaneo de diversos mecanismos moleculares con un tiempo mínimo de preparación e incubación. Las PC12 responden de manera inmediata y específica a las disminuciones en la presión parcial de oxígeno del medio en que se encuentren, exhibiendo una despolarización membranal (*Naranjo-Suárez et al.*, 2003). Esto se debe a que los feocromocitomas que surgen de células neuroendócrinas, están involucrados en la respuesta sistémica al sensado del oxígeno.

Adicionalmente, estas células son fácilmente manipulables para su cultivo. Las condiciones de incubación son comunes y sencillas de implementar, requieren de una temperatura constante de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$ para nutrirse y proliferar, con una atmósfera húmeda (95%) y una concentración de CO_2 del 5%. Al ser células adherentes, se siembran en placas recubiertas por colágeno o poli-L-lisina y detienen su proliferación cuando hay contactos célula-célula. Existen dos medios de cultivo de elección para estas células, el RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) y el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementados con sueros y antibióticos. Los cultivos de PC12 mantienen sus características morfológicas cuando son almacenadas, congeladas y/o transferidas de un medio de cultivo a otro.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen muchas enfermedades y desórdenes fisiológicos, que se caracterizan por ser multifactoriales, es decir, involucran numerosos procesos que desencadenan diversas cascadas de señalización en el interior de las células. Una de estas patologías es la hipoxia celular que desarrolla procesos de estrés oxidativo, inflamación y muerte celular. La hipoxia celular es la disminución del aporte de oxígeno tanto en el interior de las células como en el espacio extracelular. En la actualidad no se cuenta con un tratamiento para poder evitar el daño por hipoxia o mejorar la calidad de vida de los pacientes que han presentado un cuadro hipóxico.

Al no existir fármacos o tratamientos para contrarrestar este padecimiento, se siguen realizando estudios utilizando modelos animales y modelos *in vitro* para simular la señalización que ocurre en este fenómeno y poder determinar el mecanismo de acción de compuestos potencialmente protectores. Los modelos de hipoxia química son modelos *in vitro*, que se caracterizan por ser sencillos de manipular y los resultados que se obtienen son la base de la investigación de la hipoxia. Existen varias publicaciones que utilizan CoCl_2 en la generación de señalización de hipoxia química y estabilización del HIF-1 α . Tomando en cuenta los resultados consistentes de trabajos anteriores surgió el interés de estandarizar un modelo en células PC12 con CoCl_2 simulando la señalización por hipoxia en nuestras condiciones, y así poder medir distintos marcadores que nos reflejen la respuesta celular ante un evento hipóxico y la estabilización del HIF-1 α . Esto con la finalidad de utilizar el modelo como base en la investigación de compuestos que ejerzan neuroprotección y/o puedan proteger de los efectos del tratamiento impuesto a las células.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Estandarizar un modelo de hipoxia química *in vitro* utilizando CoCl_2 como agente estabilizador del factor inducible por hipoxia en células PC12.

Objetivos Particulares:

- Evaluar el efecto del CoCl_2 en la viabilidad celular en un curso temporal y concentración-respuesta.
- Determinar el efecto de 0.15, 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 en la estabilización del HIF-1 α a 0.5, 1.0, 24 y 48 h de incubación.
- Evaluar el efecto del CoCl_2 en la generación inmediata de ROS.
- Determinar el efecto del CoCl_2 en la integridad del ADN a concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 durante 24 h y 48 h de incubación.
- Determinar el efecto del CoCl_2 0.5 y 1.0 mM en la muerte celular a 24 y 48 h de incubación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizaron células PC12 fase II (proporcionadas por el Dr. Pedraza Chaverrí, Facultad de Química, UNAM). Se cultivaron a 37°C con una atmósfera húmeda (95%) y 5% de CO₂, en superficies de plástico (placas de 60 y 100 mm) cubiertas con poli-L-lisina. Se usó el medio de cultivo DMEM (GIBCO®) a un pH= 7.4, suplementado con suero fetal bovino al 7.5%, suero de caballo al 7.5%, y 1% de penicilina/estreptomicina. Este medio se cambió cada dos días previo lavado con PBS pH 7.4 (Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, NaCl 137 mM).

La confluencia celular (cantidad de crecimiento celular, medido con base en el contacto célula-célula en la superficie de cultivo) se verificó con un microscopio Nikon®. Cuando las células presentaron una confluencia > 70% se tripsinizaron con 300-1000 µl de *Tryple express* (Invitrogen®) por 5 min a 37°C. Las células tripsinizadas se centrifugaron a 1,570 x g por 3 min, se resuspendieron en medio de cultivo para la nueva siembra o tratamiento. Las células se congelaron con DMSO al 5% en DMEM y se colocaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Todos los procedimientos del cultivo celular se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad.

Determinación de la viabilidad celular por reducción de MTT a formazán

La determinación de la viabilidad celular se realizó a través de un ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán. 1x10⁶ células se incubaron con CoCl₂ a concentraciones entre 0.1 y 1.0 mM durante 24, 48 y 72 h. Las células se incubaron en placas de 96 pozos.

Concluido el tiempo de incubación se agregaron 30 µl de una solución de MTT (1 mg/ml) incubando durante 1 h a 37°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de isopropanol ácido (96% en HCl 1 N) con agitación durante 3 min. Se determinó la absorbencia a 540 nm en un lector de placas *Biotek, Sinergy HT*. Con base en los resultados obtenidos de este experimento (ver resultados y discusión) se eligieron las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ así como 24 y 48 h de incubación para las determinaciones posteriores.

Determinación de HIF-1α por *western blot*:

Las células incubadas a 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 y 48 h, se centrifugaron y el botón se lisó con un amortiguador de lisis (Tris 20 mM pH 7.9, sacarosa 0.5 mM y NaCl 30 mM), inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma). Se corrieron 30 µg de proteína (cuantificada por el método del ácido bicinconínico) en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% (Laemmli SDS-PAGE). Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm durante 2 h a 350 mA. La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS (Tris 20 mM, NaCl 0.5 M pH 7.5). La detección se realizó con un anticuerpo primario (1:500) (*Chemicon, Int*) anti HIF-1α incubado a 4°C toda la noche. Se utilizó un anticuerpo secundario (1:1000) anti-ratón acoplado a HRP (*Jackson Immunoresearch*), incubado 1 h a 37°C. Se reveló con luminol usando placas de autoradiografía.

Este mismo procedimiento se realizó para las células que sobreexpresaron el dominio ODDD (ver más adelante).

Sobreexpresión de un control positivo de HIF-1 α

El plásmido pHLTEV que contiene la región que codifica para los residuos 530-698 del ODDD del HIF-1 α de humano (pHLTEV-ODDD) (Sánchez-Puig *et al.*, 2005) fue donado por la Dra. Sánchez Puig (Instituto de Química, UNAM). El plásmido se amplificó transformando la cepa DH α 5F' de *E. coli* (donada por la Dra. Funes, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y se purificó a partir de un cultivo crecido en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (50 μ g/mL) con un estuche comercial (*Quiaprep, Quiagen*). El plásmido puro se usó para transformar la cepa de expresión BL21DE3pLysS, del *pET system expression kit* (*Novagen*), (donada por el Dr. Pérez-Montfort del Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

El ensayo de inducción se realizó como sigue: Se creció un precultivo de células BL21DE3pLysS transformadas con pHLTEV-ODDD en medio LB a 37°C incubando toda la noche. Este cultivo se centrifugó durante 5 min a 7,850 x g. El botón se resuspendió en 1 ml de LB y se inocularon 100 ml de LB con ampicilina. Se incubó con agitación a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó una OD_{600 nm} = 0.8-1.0 se indujo la expresión con 0.4 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante toda la noche a 37°C. El cultivo se centrifugó y el botón se resuspendió en amortiguador muestra (Tris-HCl 0.5 M, glicerol al 30%, DTT al 1%, SDS al 10% y azul de bromofenol 0.05%) para llevar a cabo la electroforesis y el *western blot*.

Determinación de HIF-1 α por inmuno-detección

Las células se centrifugaron a 25,000 x g por 30 s. El pellet se resuspendió en 100 μ l de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (SIGMA). Se llevó a cabo la extracción de las fracciones nucleares de muestras tratadas con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM con ayuda del estuche comercial NE-

PER[®] (*Nuclear and cytoplasmic extraction reagents- Thermo Scientific Kit*) para purificar el HIF-1 α que está estabilizado y ha sido translocado al núcleo.

El ensayo para cuantificar el HIF-1 α activo se realizó a través de un estuche comercial (Cayman[®]), basado en la unión del HIF-1 α de los extractos nucleares a las secuencias de ADN HRE que se encuentran adheridas a la superficie de la placa de 96 pozos. Se incubó el anticuerpo primario anti HIF-1 α a 4°C toda la noche, seguido de lavados y un anticuerpo secundario acoplado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) que se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después del revelado con una solución de paro de reacción la placa se leyó a 450 nm.

Se utilizó un control positivo de HIF-1 α (extracto nuclear de células HeLa tratado con NiCl₂), un control con ADN de doble cadena que compite por la unión específica al HIF-1 α y un control de unión no específica.

Medición de ROS intracelulares como respuesta a la incubación con CoCl₂

Las células se despegaron con 3 ml de *Tryple Express* incubando 5 min a 37°C. Se agregó diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) a las células resuspendidas en medio DMEM a una concentración final de 0.01 mM, y se incubó durante 1 h a 37°C en condiciones de oscuridad. Se realizaron cinéticas de las muestras durante 20 s (basal) y posteriormente se agregaron los tratamientos (H₂O₂ 0.3 mM, CoCl₂ 0.5 mM y CoCl₂ 1.0 mM). Las cinéticas se siguieron durante 10 min a partir de la adición del tratamiento. Las lecturas se realizaron en un citómetro de flujo *BD FACS Calibur* ajustado a un solo canal.

Determinación del patrón de degradación del ADN por técnica de escalera (DNA laddering)

Las células se incubaron con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM por 24 h y 48 h. Se usó etopósido 50 μM como control positivo. Se purificó el ADN de las células con ayuda del estuche comercial DNazol (Gibco) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADN a 260/ 280 nm.

Se corrieron 7.4 μg de ADN de cada muestra en geles al 2% de agarosa durante 2 h a 50 V. El ADN se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se observó en un transiluminador con luz UV.

Determinación del pico Sub G_0 con IP por citometría de flujo

Después del tratamiento con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM durante 24 y 48 h, 1×10^6 células se resuspendieron en etanol. Se realizó la tinción con yoduro de propidio (IP), utilizando el reactivo de PI/RNasa (*BD Pharmingen*™) preparado en PBS. Las células se centrifugaron a 3,100 x g por 5 min. Se decantó el etanol y se permeabilizaron las membranas celulares con 500 μl de buffer de permeabilización (Na_2HPO_4 0.2 M y ácido acético 0.1 M). Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras con PBS e inmediatamente se agregó la solución de tinción con PI/RNasa (300 μl por tubo). Se incubaron 30 min a temperatura ambiente y se procedió a la lectura en el citómetro de flujo ajustado a dos canales, y se graficó el número de cuentas celulares por área.

Evaluación de apoptosis y necrosis celular en PC12 tratadas con CoCl₂ por tinción diferencial con IP y A (V) por citometría de flujo.

Para la tinción de la anexina V se utilizó el estuche comercial *FITC Annexin V Apoptosis* (BD Pharmingen). Se utilizaron 1×10^6 células por tratamiento. Las células se incubaron con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM durante 24 y 48 h. Se cosecharon las células, despegándolas con tripsina a 37°C por 5 min. Las células se resuspendieron en buffer de unión. Se centrifugaron a 3,100 x g por 5 min y se agregaron 5 µl de anexina V y 5 µl de IP. Las muestras se agitaron en el vortex por 10 s y se incubaron en la oscuridad por 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µl de buffer de unión a cada tubo y se analizaron las muestras por citometría de flujo durante la primera hora. El citómetro se ajustó a dos canales (FL-2H, para el PI; FL-4H, para la anexina V) en la máxima velocidad de resolución 10 ms.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan con el cálculo de la media \pm la desviación estándar (DE). Los datos se graficaron y se analizaron con el programa Prism 5.01, Graph Pad (San Diego, CA), usando como método de análisis una ANOVA de una vía y comparaciones de cada grupo contra el control utilizando un prueba de Dunnett (excepto en las figuras 5, 6 y 7). Un valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la viabilidad celular en PC12 tratadas con CoCl_2

Para los ensayos de viabilidad celular se realizó una prueba de reducción de MTT, la cual mide directamente la función mitocondrial principalmente por la actividad de la succinato deshidrogenasa. Se emplearon tiempos de 24, 48 y 72 h de incubación con concentraciones de CoCl_2 entre 0-1.0 mM. El ensayo consiste en la reducción enzimática de MTT (de color amarillo) hasta formazán (compuesto púrpura), que se revela con una mezcla de disolventes en medio ácido y se detecta espectrofotométricamente a 540 nm.

En la incubación durante 24 h se observó que la viabilidad celular disminuye conforme aumenta la concentración de CoCl_2 . En la figura 5 se presenta un curso concentración-respuesta en el que se observa una disminución de aproximadamente 30% a partir de 0.5 mM. A concentraciones de 0.9 y 1.0 mM de CoCl_2 se obtiene una reducción de 50% en la viabilidad celular en comparación con el 100% que se estableció como grupo control.

A 48 h de incubación con CoCl_2 se encontró una disminución del 50% de viabilidad entre 0.5 y 0.6 mM. A partir de 0.7 mM el porcentaje de viabilidad celular tiende a cero (Fig. 6). Al igual que a 24 h, se observa una dependencia de la concentración. Con 72 h de incubación los niveles de viabilidad se encuentran por debajo del 40% a partir de 0.5 mM e incluso a 1.0 mM la viabilidad es prácticamente cero (Fig. 7).

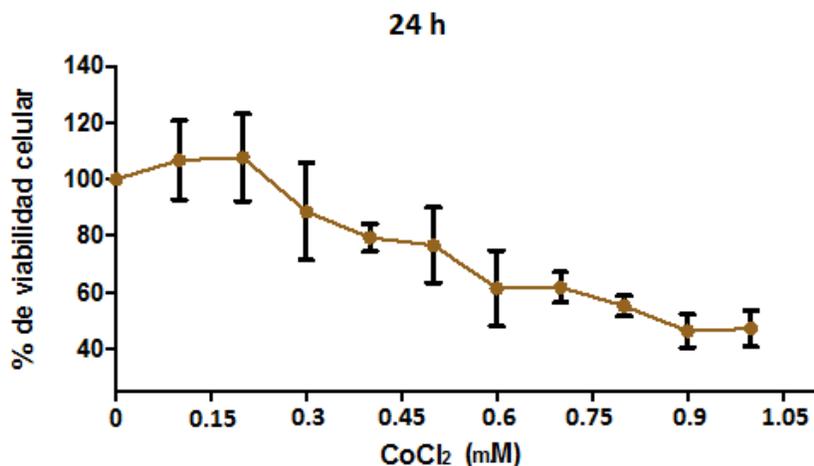


Fig. 5.- Efecto de la concentración de CoCl_2 sobre la viabilidad celular en células PC12 a un tiempo de incubación de 24 h. Los valores se expresan como la media \pm la D.E. El grupo control se estableció como 100% de la viabilidad celular. $n=4$.

A 24, 48 y 72 h de incubación con CoCl_2 se encontró que el porcentaje de viabilidad celular disminuye dependiendo del aumento en la concentración y que la exposición prolongada de las células a este compuesto las hace más sensibles a menores concentraciones en los tres periodos de incubación.

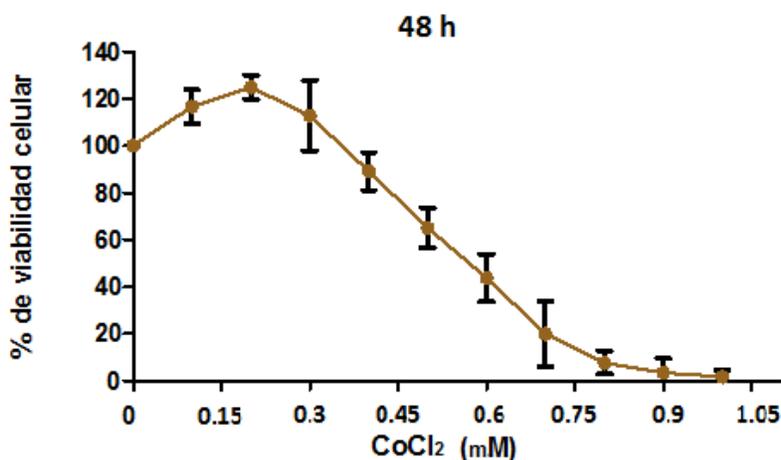


Fig. 6.- Efecto del tratamiento con CoCl_2 sobre las células PC12, con un tiempo de incubación de 48 h. Los valores se expresan como la media \pm la D.E. El grupo control se estableció como el 100% de la viabilidad celular. $n=4$.

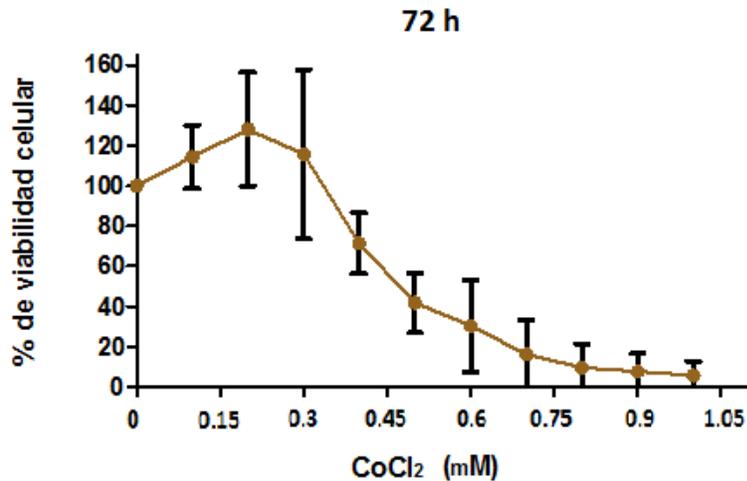


Fig. 7.- Efecto de la incubación con CoCl₂ en concentraciones entre 0 y 1.0 mM a un tiempo de incubación de 72 h. Los valores se expresan como la media ± la D.E. El grupo control se estableció como el 100% de la viabilidad celular. n=4.

En algunos reportes en la literatura se describe una disminución del 50% en la viabilidad celular de las células PC12 incubadas con CoCl₂ 0.1, 0.15 y 0.2 mM con 24 h de incubación (*Jung et al., 2007; Jung et al., 2008; Tan et al., 2008*). Sin embargo, nosotros encontramos que a estas concentraciones el porcentaje de viabilidad no disminuye, sino que incluso está por encima del 100%. En líneas celulares de fibroblastos de ratón se ha observado una disminución en la viabilidad celular similar (50%) cuando las células se incuban con las mismas concentraciones de CoCl₂ (0.1, 0.15 y 0.2 mM) (*Vengellur et al., 2004*). Sin embargo, también se encuentran reportes en los que el 50% de la viabilidad celular en cultivos de astrocitos tratados con CoCl₂ se alcanza con una concentración de hasta 5 mM. En este mismo reporte, los resultados con 0.5, 1.0 y 2.5 inducen un incremento de viabilidad por encima del 100% con respecto al control (*Fang et al., 2008*).

En nuestras condiciones, las concentraciones a las cuales tenemos una disminución del 50% en la viabilidad celular son 0.6, 0.5 y 0.5 mM para 24, 48 y 72 h, respectivamente.

Con el objetivo de utilizar aquellos tiempos y concentraciones que nos permitan evaluar un marcador de daño celular y con base en los resultados anteriores, se decidió utilizar las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h de incubación para las evaluaciones posteriores.

En la figura 8 se presentan los valores de viabilidad celular (obtenidos de los resultados anteriores) para 24 y 48 h con las concentraciones 0.5 y 1.0 mM CoCl_2 comparados contra el grupo control, en donde se observa la disminución en el porcentaje de la viabilidad celular.

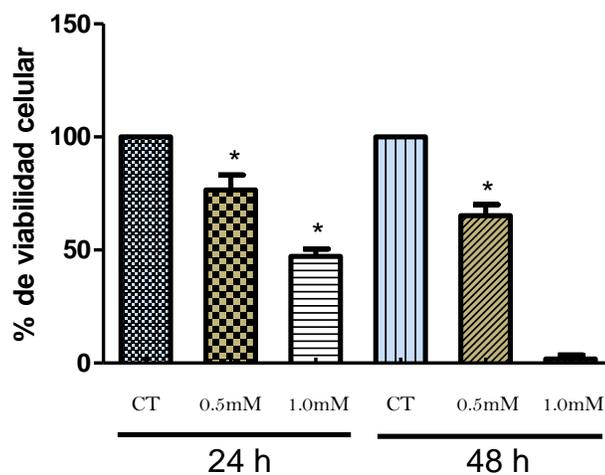


Fig. 8.- Efecto del CoCl_2 0.5 y 1.0 mM a 24 y 48 h de incubación de células PC12, contra el grupo control. Los valores se expresan con la media \pm la DE. Seguido de un post análisis con una prueba de Dunnett. * $P \leq 0.05$ contra el grupo control.

Niveles de expresión del HIF-1 α por *western blot*

Se realizaron ensayos para observar la expresión del HIF-1 α por medio de la técnica de *western blot*. Se obtuvieron los lisados de células tratadas con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM incubadas por 24 y 48 h. Se cargaron 30 μg de proteína en geles de poliacrilamida al 10%. El peso molecular esperado de la subunidad alfa es de aproximadamente 120 kDa. En la literatura se reporta la estabilización del

HIF-1 α en cultivos celulares y se observa una banda en este peso molecular (Kaczmareck *et al.*, 2009; Pacary *et al.*, 2007; Pacary *et al.*, 2008; Torii *et al.*, 2009). Se hicieron múltiples modificaciones a las condiciones de tiempos y temperaturas de incubación de los anticuerpos así como condiciones de exposición y revelado. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado y no fue posible observar ninguna banda que verificara la expresión del HIF-1 α en las muestras tratadas con CoCl₂ a 0.5 y 1.0 mM incubadas por 24 y 48 h.

Para determinar si la imposibilidad en la detección de las bandas se debía a las condiciones utilizadas o a la ausencia de HIF-1 α estable en las muestras, se decidió utilizar un control positivo que sobreexpresara a HIF-1 α . Esto se realizó empleando un plásmido denominado como pHLTEV-ODDD que contiene la secuencia que codifica para el dominio ODDD del HIF-1 α . El plásmido se sobreexpresó en la cepa BL21DE3 pLysS de *E. coli*. Para la inducción, se agregó a un precultivo una concentración final de 0.4 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (inductor de la transcripción de la T7 ARN polimerasa). El gen a expresar está bajo el control del promotor T7. La T7 ARN polimerasa de las células se une a este promotor e inicia la transcripción y la traducción del gen. Para verificar la obtención del producto esperado, con un peso molecular aproximado de 34 kDa, las células se lisaron y se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida que se tiñó con azul de Coomasie. La expresión del dominio ODDD del HIF-1 α se observó claramente con el tamaño esperado (Fig. 9 A). Para verificar que la banda de sobreexpresión correspondía efectivamente a HIF-1 α , se realizó un *western blot* con un anticuerpo específico, la detección se realizó de forma exitosa (Fig. 9 B). Sin embargo, se repitió el procedimiento para asegurar la reproducibilidad de este control positivo y no se logró observar nuevamente la banda a 34 kDa. Las dificultades anteriores en el laboratorio para detectar HIF-1 α por esta técnica, nos hace pensar que la

proteína puede ser sumamente lábil, o bien que los anticuerpos utilizados no tienen una gran eficiencia en el reconocimiento de la proteína.

Sin embargo, era sumamente importante determinar que HIF-1 α se encuentra estabilizado en el núcleo de las células a las concentraciones de CoCl₂ y tiempos que habíamos decidido usar para las determinaciones posteriores, por lo que se decidió utilizar un método más sensible para la determinación de HIF-1 α activo. Los resultados se explican a continuación.

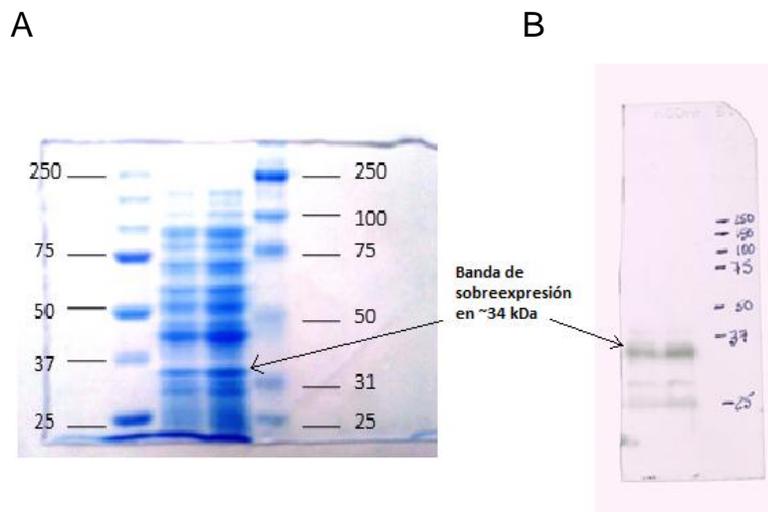


Fig. 9.- Sobreexpresión del dominio ODDD de HIF-1 α . (A) Electroforesis de células inducidas con IPTG en un gel desnaturante teñido con azul de Coomassie. (B) *Western blot* para la detección del dominio ODDD sobreexpresado. Las bandas esperadas (peso molecular de 34 KDa) se encuentran señaladas en ambos casos.

Determinación de HIF-1 α activo

Se realizó con una prueba de detección de HIF-1 α por medio de un ensayo de ELISA (de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Se obtuvieron las fracciones nucleares de las células PC12 tratadas con CoCl₂ 0.15, 0.5 y 1.0 mM incubadas a 0.5, 1, 24 y 48 h. Se utilizó un grupo control para cada tiempo de

incubación. El ensayo se basa en la unión del HIF-1 α de los extractos nucleares con las secuencias de ADN (HRE) localizadas en la superficie de los pozos de la placa de reacción y la posterior detección por anticuerpo primario (anti HIF-1 α) y secundario (acoplado a HRP). La señal se detectó espectrofotométricamente a 450 nm.

Se encontró que a 0.5 y 1 h, no existe ningún cambio con respecto al control para ninguna de las concentraciones evaluadas (datos no mostrados). En la figura 10 se observa que a 24 h de incubación hay un incremento en la detección de HIF-1 α activo a 0.15, 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ de 6, 10 y 7 veces, respectivamente. Sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa a 0.5 mM. A 48 h de incubación el incremento en la detección de HIF-1 α activo es mucho más evidente, siendo de 17 veces para 0.15 mM, de 36 veces para 0.5 mM y de 12 veces para 1.0 mM con respecto al control. En todos los casos se observó una diferencia significativa. Lo anterior refleja que la estabilización de HIF-1 α es mayor a concentraciones altas de CoCl₂ con periodos prolongados de exposición, que son los tiempos y concentraciones que se usan a lo largo de este trabajo.

Como se mencionó, en este ensayo se decidió incluir una baja concentración de CoCl₂ (0.15 mM) y tiempos más cortos de incubación (0.5 y 1 h) con la finalidad de determinar la presencia del HIF-1 α estable a los tiempos y concentraciones que se reportan también en la literatura, donde se ha visto al HIF-1 α estabilizado a 0.1 y 0.2 mM de CoCl₂ con 4 y 12 h de incubación (*Jung et al.*, 2004; *Vengellur et al.*, 2004; *Wang et al.*, 2000). Incluso, el tratamiento de células PC12 con CoCl₂ 0.2 mM se usa en algunos trabajos como control positivo de la detección de HIF-1 α activo (*Kim et al.*, 2008). Sin embargo en nuestras condiciones no se observaron cambios con tiempos de incubación menores a 24 h y concentraciones de CoCl₂ menores a 0.5 mM.

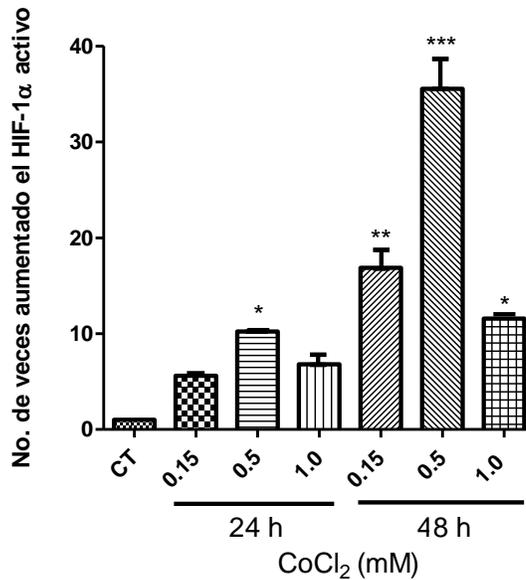


Fig. 10.- Niveles de HIF-1 α activo en núcleo de células incubadas a 0.15, 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 y 48 h, medidos con una prueba de ELISA a partir de los valores obtenidos espectrofotométricamente a 450 nm. Estos valores se expresan como la media \pm la D.E. Se realizó un post análisis con una prueba de Dunnett. *P \leq 0.05 contra el grupo control. n=2.

Niveles de ROS intracelulares por la inducción del evento hipóxico con CoCl₂

Los ensayos de generación de ROS intracelulares se realizaron usando una técnica de citometría de flujo. Se midió la cinética de generación de ROS por 10 min tratando a las células con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ desde el tiempo cero. Se utilizó un control positivo de células incubadas con peróxido de hidrógeno (0.3 mM concentración final) así como un control de células sin generador de especies reactivas, los cuales se incubaron el mismo periodo de tiempo. La técnica empleada utiliza el compuesto no fluorescente y no polar llamado diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), el cual se incuba previamente y atraviesa la membrana celular. Las esterasas intracelulares hidrolizan este compuesto a DCFH (no fluorescente), el cual a su vez es oxidado por moléculas pro-oxidantes a la forma fluorescente diclorofluoresceína (DCF). La fluorescencia

generada es dependiente de la concentración y es un indicador de los niveles de ROS generados intracelularmente (*Kanski et al.*, 2001). En la figura 11 A se observan tres paneles en donde se presenta la intensidad de fluorescencia que detectó el citómetro de flujo para 0.3 mM de H₂O₂ y 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂. En la figura 11 B se observan los niveles de fluorescencia emitidos en las células tratadas con CoCl₂ (0.5 y 1.0 mM) y éstos fueron notablemente mayores (aproximadamente 80 unidades arbitrarias de fluorescencia) con respecto al grupo control que alcanzó un nivel de fluorescencia de 60 unidades arbitrarias y muy semejantes a los niveles inducidos por el peróxido de hidrógeno (nivel de 80 unidades arbitrarias de fluorescencia).

Se utilizó peróxido de hidrógeno como control positivo ya que su efecto oxidante es muy potente. El ambiente oxidativo que genera incrementa las concentraciones de Ca²⁺ dentro del retículo endoplásmico, provocando una pérdida en la homeostasis de este ion e induciendo una falla en el potencial de membrana y otras funciones mitocondriales (*Huang et al.*, 2004).

Se ha descrito que la generación de ROS está relacionada con los niveles de muerte celular por apoptosis en células PC12 tratadas con CoCl₂ (*Fujimura et al.*, 2000; *Jung et al.*, 2004; *Sandner et al.*, 1997; *Zou et al.*, 2001). También se ha encontrado que a partir de la generación intracelular de ROS se inicia el daño al material genético y fallas energéticas, daño a las proteínas de membrana y a los fosfolípidos, alterando su polaridad y descompensando sus potenciales basales (*Kotake-Nara y Saida*, 2007). En el caso del proceso de apoptosis, las ROS son inducidas por un estímulo externo que desencadena la pérdida del potencial membranar mitocondrial activándose la vía de las caspasas (*Jung et al.*, 2004; *Guo et al.*, 2006).

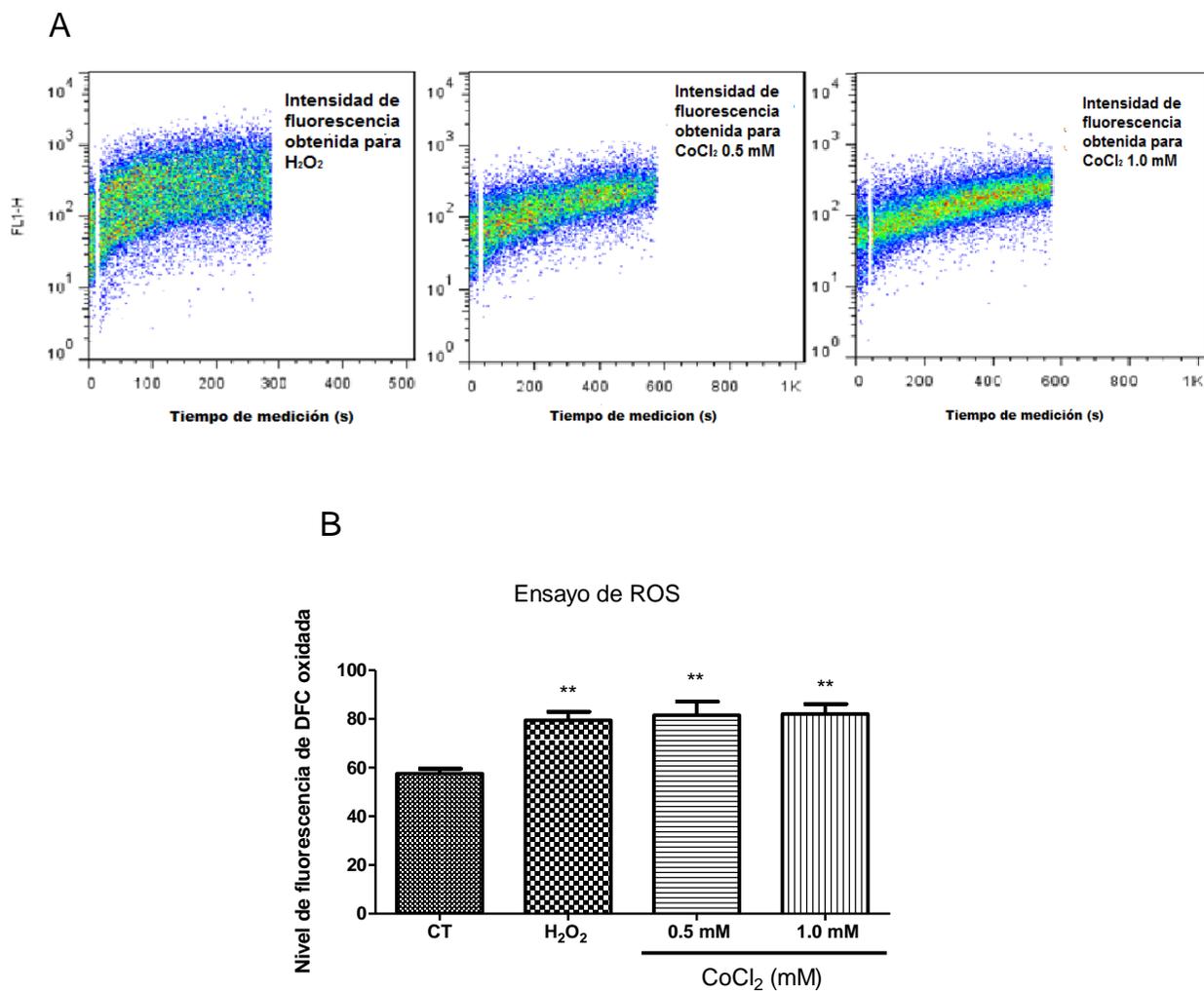


Fig. 11.- (A) Intensidades de fluorescencia obtenidas en el tratamiento de las células con H₂O₂ 0.3 mM, y CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM, (B) niveles de fluorescencia de DCF oxidada en células PC12 tratadas con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM durante una cinética de 10 min. Los niveles de fluorescencia generados fueron comparados contra el grupo control. Los valores se presentan como la media ± la D.E. Se realizó un post análisis con una prueba de Dunnett. *P ≤ 0.05 contra el grupo control. n=4.

Se sabe que el CoCl₂ induce rápidamente la generación de ROS como uno de los mecanismos de acción para ejercer toxicidad en la células y dirigirlas hacia apoptosis (*Stenger et al., 2011*). Las hipótesis reportadas, sugieren que el CoCl₂ genera estrés oxidante en las células, mayoritariamente al inhibir la recaptura del Fe²⁺ y sustituyéndolo en las enzimas que lo utilizan como cofactor

(por ejemplo las PHDs) (*Davidson et al., 2006*). En algunos trabajos reportados se midieron los niveles de ROS generados por el tratamiento con CoCl_2 en las células, simulando la estabilización del HIF-1 α al encontrarse inhibida la acción de las PHDs por la oxidación del hierro a causa de la reacción de Fenton y la oxidación del ácido ascórbico. Estas reacciones se favorecen al estar incrementados los niveles de H_2O_2 en el medio intracelular, provenientes de la falla mitocondrial y de la acción del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH) (*Kotake-Nara y Saida, 2007*).

Fragmentación del ADN

El ensayo se basa en la fragmentación del ADN como consecuencia del daño inducido por el proceso de apoptosis que provoca el CoCl_2 . La apoptosis provoca la activación de las endonucleasas de la familia SNM1 que cortan el ADN de alto peso molecular provocando la fragmentación del ADN de doble cadena. Posteriormente se activan las nucleasas dependientes de caspasas y éstas cortan el ADN de bajo peso molecular en fragmentos pequeños de 180-200 pb llamados cuerpos internucleosomales (*Jung et al., 2007; Kroll y Czyzyk-Krzeska, 1998; Zou et al., 2001; Zou et al., 2002*).

Estos ensayos se realizaron en células tratadas con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM con 6 y 24 h de incubación. Se corrieron en geles de agarosa al 2% 7.4 μg de ADN. Se utilizó al etopósido (agente que daña el ADN al inducir a p53) como control positivo de fragmentación de ADN a una concentración de 0.01 mM (*Bouleau et al., 2007; Lee et al., 2005; Lee et al., 2009; Nakajima et al., 1994*). El ADN se observó en un transiluminador con luz UV. En la figura 12 se observa al ADN íntegro obtenido de las células tratadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 para 6 y 24 h de incubación, así como para aquellos donde se cargó el control positivo en los mismos tiempos de incubación.

En nuestras condiciones no fue posible observar los fragmentos internucleosomales de ADN, debido a que el tamaño de los mismos pudo ser inferior a 180 pb, resultado de la acción de corte al ADN por medio de las endonucleasas que ejercen su acción tras la iniciación de un proceso apoptótico en las células.

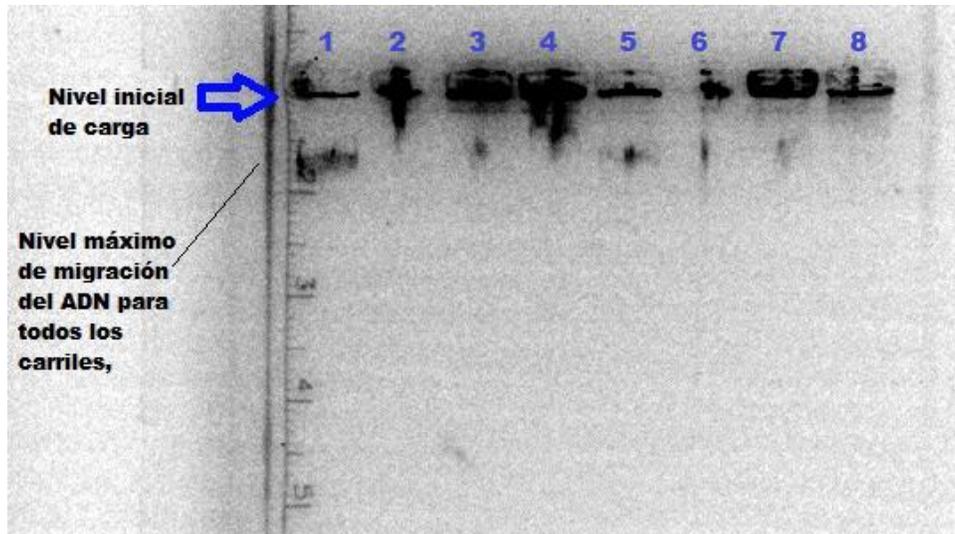


Fig. 12.- Fragmentación del ADN. Gel de agarosa al 2% con 7.4 µg de ADN por carril. Carriles 1 y 2 células control a 24 y 48 h respectivamente, carriles 3 y 4 células con etopósido 0.01 mM a 24 y 48 h, respectivamente, carril 5 CoCl₂ 0.5 mM a 24 h, carril 6 CoCl₂ 0.5 mM a 48 h, carril 7 CoCl₂ 1.0 mM a 24 h y carril 8 CoCl₂ 1.0 mM a 48 h de incubación. Se observa el ADN íntegro en todos los carriles incluyendo los controles positivos (carriles 3 y 4).

En diversos estudios se ha logrado observar la fragmentación del ADN causada por la incubación con CoCl₂, por técnica de escalera de ADN. Se ha reportado que con una incubación de 12 y 24 h con 0.15 mM de CoCl₂ es posible observar esta fragmentación en células PC12 (*Jung et al.*, 2004, 2007, 2008). Lo que han propuesto estos ensayos es que el CoCl₂ induce una muerte por apoptosis, representa todas las características típicas de este proceso principalmente la condensación de los cromosomas y la fragmentación internucleosomal del ADN en la fase sub-G₀. En nuestras condiciones no se logró detectar esta fragmentación bajo ningún tratamiento, sin embargo al inicio

del proyecto se planteó medir la inducción de muerte celular por tratamiento con CoCl_2 como marcador de daño. Por esta razón se decidió utilizar una técnica más sensible para lograr ver la muerte celular tras un daño de hipoxia química, y se realizó una tinción con IP que se basa en el principio de fluorescencia, donde se evidencia la muerte celular.

Efecto del CoCl_2 en la muerte celular

Se realizó una prueba de evaluación de la muerte celular por citometría de flujo en células incubadas con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM por 24 y 48 h, mediante una tinción con IP y los datos se compararon con un grupo control. Se utilizaron células tratadas con etopósido (10 μM) y estaurosporina (100 nM) como control positivo. La tinción con IP nos revela la cantidad de material genético presente en las diferentes fases del ciclo celular, ya que el IP se intercala en el ADN. Este colorante penetra en las células que se encuentran en proceso de muerte celular, al tener dañada la integridad de su membrana plasmática. La fluorescencia del IP por citometría de flujo mide directamente los niveles de proliferación celular, diferenciando aquellas células que se encuentran muertas (SubG_0), las que están en periodo de latencia del ciclo celular y están vivas (G_0), las que están en proceso de síntesis de ADN (S) y aquellas que se están dividiendo (M).

La figura 13 presenta el porcentaje de células muertas (Sub G_0) resultado de la incubación con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM durante 24 h así como con estaurosporina y etopósido. Las células control presentan un 2% en Sub G_0 . A 0.5 mM se observa que hay un 5% de células en Sub G_0 , mientras que con 1.0 mM se observa que hay un 22% de células en esta fase ($p < 0.05$). La incubación con etopósido induce un incremento mínimo (5%) de células en Sub G_0 , y con la estaurosporina se observó un 26% de células muertas. En la figura 14 se presentan los resultados para 48 h de incubación con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM donde

se observa que en el control hay un 3% de células en Sub G₀. Para 0.5 mM se observa un 13% de células en Sub G₀, mientras que para 1.0 mM se observa un 27% de células en esta fase ($p < 0.05$). La incubación con etopósido no genera una señal detectable de células en la fase Sub G₀ y con estaurosporina ésta es de un 20%.

Lo anterior nos indica que el CoCl₂ es capaz de inducir muerte celular con 24 y 48 h de incubación en ambas concentraciones evaluadas (0.5 y 1.0 mM). Este comportamiento se observa como concentración-dependiente, ya que solo los resultados para 1.0 mM son significativos, al incrementar considerablemente con respecto al control. Lo que observamos es que se necesitan tiempos prolongados de incubación (24 y 48 h) y concentraciones de aproximadamente 1.0 mM para conseguir resultados más sensibles y evidentes de muerte celular.

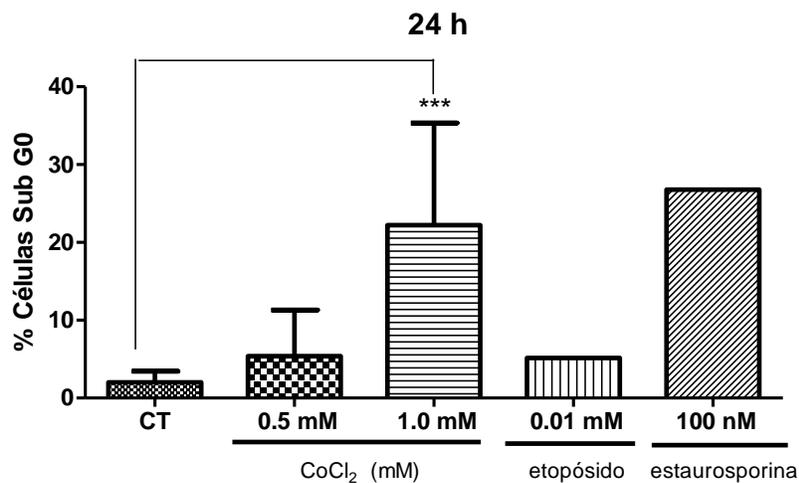


Fig. 13.- Porcentaje de células muertas (fase Sub G₀) luego de 24 h de incubación con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂, los resultados se compararon contra un control. El etopósido (0.01 mM) y la estaurosporina (100 nM) se usaron como controles positivos de muerte celular. Los valores se presentan como la media \pm la D.E. Se realizó un post análisis con una prueba de Dunnett. * $P \leq 0.05$ contra el grupo control. $n=7$.

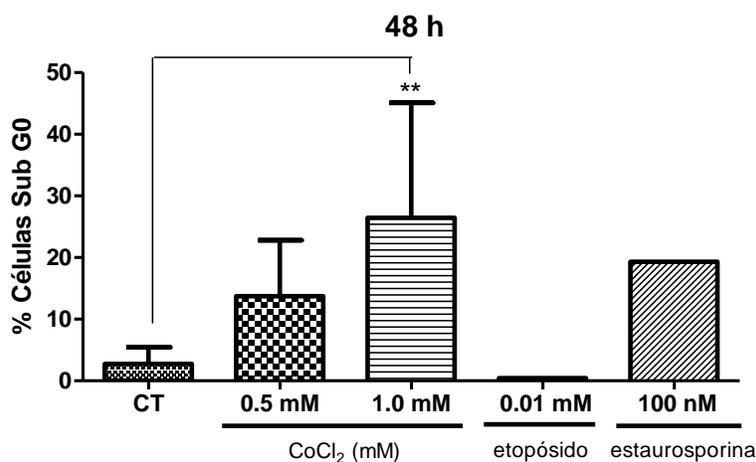


Fig. 14.- Porcentaje de células incubadas con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM por 48 h que se encuentran en fase Sub G₀. Los resultados se compararon contra un grupo control. El etopósido (0.01 mM) y la estaurosporina (100 nM) se usaron como controles positivos de muerte celular. Los valores se presentan como la media ± la D.E. Se realizó un post análisis con una prueba de Dunnett. *P ≤ 0.05 contra el grupo control. n=7.

El etopósido no fue capaz de inducir muerte celular en ninguno de los tiempos de incubación evaluados (24 y 48 h) a pesar de ser un inductor de procesos apoptóticos, lo cual corelaciona con lo observado en el ensayo de fragmentación de ADN en donde tampoco logramos ver el efecto de este compuesto reportado en la literatura (*Nakajima et al.*, 1994). Sin embargo para la estaurosporina que también es un inductor de muerte celular y fragmentación de ADN, sí se observó el efecto esperado en ambos tiempos de incubación (24 y 48 h). Los ensayos de estaurosporina se han reportado en células PC12 donde se ha visto una inducción de muerte celular por apoptosis en tratamientos con 0.1 y 0.2 μM de estaurosporina (*Furuchi et al.*, 2009; *Seo y Seo*, 2009).

Está descrito que el CoCl₂ posee la capacidad para inducir daño y muerte celular en diversos linajes celulares, pero particularmente en PC12. Se ha demostrado claramente que el tratamiento con CoCl₂ no solo induce muerte

celular, sino que claramente desata un proceso apoptótico. (*Guo et al.*, 2006; *Jung et al.*, 2007; *Wang et al.*, 2000; *Zou et al.*, 2001).

La técnica de tinción con IP se basa en la afinidad del IP por el ADN. El IP es un colorante fluorescente que se intercala en el ADN. Puede unirse a ADN libre (el liberado por células que murieron por necrosis) o al ADN que se encuentra en las células completas o en cuerpos apoptóticos, esto sólo cuando se ha permeabilizado su membrana con el amortiguador de permeabilización (ver material y métodos). Por lo tanto, esta técnica nos puede dar información del ADN que se encuentra en células vivas o bien en células en etapas tardías de apoptosis (cuerpos apoptóticos) o en núcleos dispersos de forma indistinta (*Martin et al.*, 1995), englobándolos como células muertas.

Por tal razón se decidió hacer la prueba diferencial entre necrosis y apoptosis (tardía y temprana) mediante una tinción dual que permite discriminar entre los mecanismos de muerte celular mencionados.

Determinación de la muerte celular por necrosis y/o apoptosis.

La evaluación de esta prueba se realizó en células tratadas con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM por 24 y 48 h. Se utilizó estaurosporina 100 nM como control positivo de apoptosis a 24 h de incubación. Se efectuó una tinción dual con IP y anexina V, con la que se puede diferenciar el estado de las células vivas y muertas por necrosis y apoptosis. Más aún, este método nos permite diferenciar si las células se encuentran en apoptosis tardía o apoptosis temprana. La tinción dual con IP y Anexina V se basa en que esta última, que es una proteína anticoagulante de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, se une con la fosfatidilserina. La fosfatidilserina es una proteína membranal que es translocada de la cara interna de la membrana a la externa en células apoptóticas. Por otro lado, el IP se utiliza como colorante de exclusión. En este caso, las células no se permeabilizan (ver

material y métodos), por lo tanto, el IP sólo entra en las células cuya membrana plasmática ha perdido su integridad, así que fluoresce en el citoplasma o en el núcleo. La tinción con anexina V está acoplada a isocianato de fluoresceína (FITC) para poder emitir una señal de fluorescencia a 514 nm, mientras que el IP es un fluoróforo que emite a 630 nm (*O'Brien y Bolton, 1995; Vermes et al., 1995*).

La señal obtenida en el citómetro de flujo con la tinción dual se representa en cuatro cuadrantes dependiendo del aumento en la intensidad de la señal de IP o anexina V y que se denominan Q1-Q4, donde: Q1= células necróticas, donde la señal es positiva a IP por haber perdido la integridad membranal pero negativa a Anexina (que es una señal típicamente apoptótica, ver arriba); Q2= células en apoptosis tardía, con alta señal de IP así como de anexina; Q3=células en apoptosis temprana, con alta señal de anexina y negativas a IP y Q4= células vivas, negativas tanto para anexina como para IP (Fig. 15).

Para facilitar la presentación de los resultados de 24 y 48 h así como la discusión de los mismos, en las figuras 16 y 17 se presentan primero los resultados de células vivas (Q4, Fig. 16 A y 17 A), posteriormente los datos de células muertas por necrosis (Q1, Fig. 16 B y 17 B) y por último los datos de células en apoptosis temprana y tardía (Q3 y Q2, Fig. 16 y 17 C y D respectivamente).

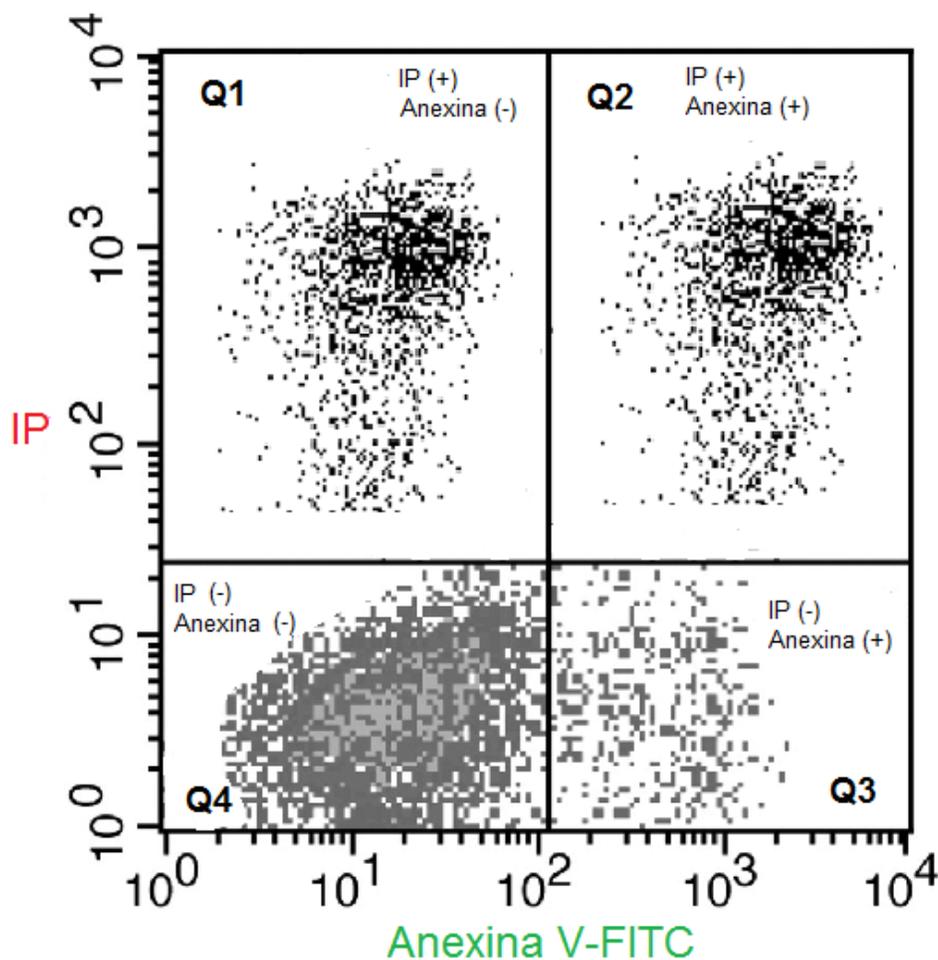


Fig. 15.- Gráfica que muestra la distribución de la señal en una tinción A(V)/IP. En el eje de las ordenadas se observa la señal de IP, en el de las abscisas la señal de la anexina V, las unidades son intensidades de fluorescencia con base en la cantidad de células en cada cuadrante. Q1=solo positivas a IP (necrosis), Q2= positivas a IP y anexina (apoptosis tardía), Q3= positivas solo a anexina (apoptosis temprana) y Q4= negativas a ambos colorantes (células vivas).

En la figura 16 se presenta la evaluación a 24 h de incubación con CoCl_2 0.5 y 1.0 mM. Se utilizó un grupo tratado con estaurosporina 100 nM como control positivo. En el panel A se observa que con 0.5 mM de CoCl_2 el porcentaje de células vivas disminuye un 5% con respecto al control, mientras que con 1.0 mM así como para el control positivo disminuye 35%. Estos dos últimos resultados fueron estadísticamente significativos con respecto al control.

En el panel B se presenta el porcentaje de células muertas por necrosis (Q1). Los resultados indican que el porcentaje de células que mueren por necrosis a las concentraciones de CoCl_2 de 0.5 y 1.0 mM son realmente mínimas, teniendo una contribución de 2% para 0.5 mM y de 6% para 1.0 mM. Para las muestras con estaurosporina, el porcentaje de células necróticas es de 0%.

En el panel C se presentan las células que murieron por apoptosis temprana (Q3). Se observa que el control tiene un 16% de células en apoptosis temprana muy parecido al obtenido con 0.5 mM de CoCl_2 (14%), mientras que para 1.0 mM y estaurosporina se observó un incremento hasta 27 y 28% respectivamente. En el panel D se presentan las células en Q2 (células que se encuentran en apoptosis tardía). Se observa que con ambas concentraciones de CoCl_2 el porcentaje de células en Q2 se incrementa con respecto al control (8%), siendo de 14% para 0.5 mM, 27% para 1.0 mM de CoCl_2 y de 22% para el control positivo.

Con 24 h de incubación se presenta un comportamiento de forma concentración-dependiente el cual se observa para las células vivas, las muertas por necrosis y las que se encuentran en apoptosis tardía. En el caso de las células en Q3 (apoptosis temprana), no hay diferencia significativa entre las células control y 0.5 mM, sin embargo sí se observa diferencia significativa entre las dos concentraciones usadas de CoCl_2 .

A 24 h con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 se encontró que con la concentración más baja de CoCl_2 los cambios no son muy evidentes, mientras que con 1.0 mM de CoCl_2 los cambios son muy claros y estadísticamente significativos. Por otro lado, estos resultados indican que el CoCl_2 induce una muerte celular mayoritariamente por apoptosis (~60% del total de células evaluadas, entre los cuadrantes Q2 y Q3).

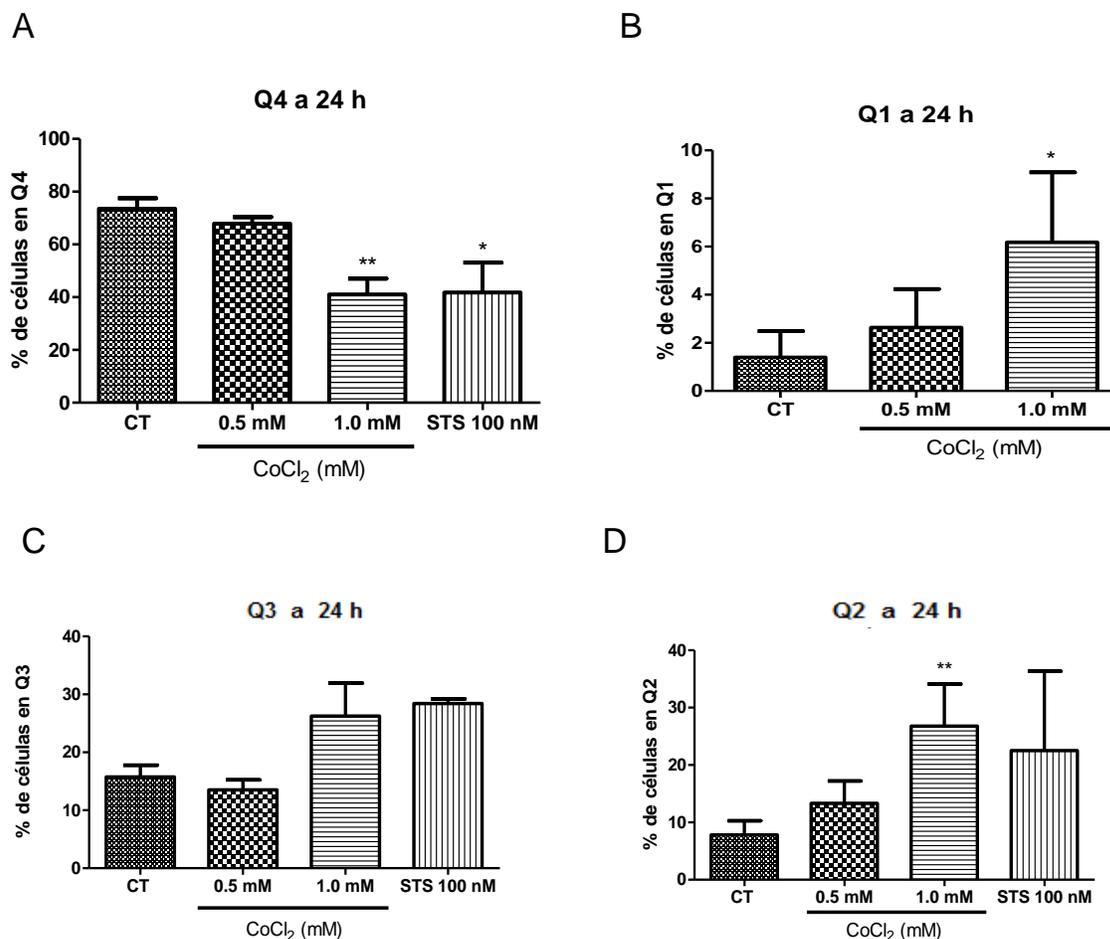


Fig. 16.- Evaluación de la muerte celular por tinción con Anexina/IP en células tratadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ por 24 h. La suma de los 4 paneles representa el 100% de las células evaluadas. (A) porcentaje de células vivas (Q4), (B) porcentaje de células muertas por necrosis (Q1), (C) porcentaje de células en apoptosis etapa temprana (Q3) y (D) porcentaje de células en apoptosis etapa tardía (Q2). Se utilizó estaurosporina (STS) 100 nM como control positivo. Los resultados se compararon contra el control. Los datos se expresan como la media \pm la D.E. Se hizo un post análisis con una prueba de Dunnett. *P \leq 0.05. n=4.

La evaluación a 48 h de incubación con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM se presenta en la figura 17. En el panel A se observa que el porcentaje de células vivas (Q4) disminuye un 50% a 0.5 mM y un 70% con 1.0 mM de CoCl₂ con respecto al control (p<0.05). En el panel B se presenta el porcentaje de células muertas por necrosis (Q1), con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ los porcentajes incrementaron del 2%

de células muertas en el control a 6 y 9% para 0.5 y 1.0 mM respectivamente ($p < 0.05$).

El panel C muestra las células que murieron por apoptosis temprana (Q3), observándose un incremento del 30% con respecto al control para la concentración de 0.5 mM ($p < 0.05$). Mientras que 1.0 mM no presentó ningún incremento en el número de células en este estadio.

En el panel D se presentan las células que murieron por apoptosis tardía (Q2). Se observa una disminución del 10% con 0.5 mM sin diferencia significativa. Sin embargo, a 1.0 mM el incremento es del 50% ($p < 0.05$).

A las 48 h de incubación el número de células vivas disminuye de forma más evidente con ambas concentraciones de CoCl_2 si se compara con lo obtenido a 24 h. La contribución de células muertas por necrosis es insignificante tanto a 24 como a 48 h a ambas concentraciones de CoCl_2 . A las 48 h se encontró con las dos concentraciones utilizadas que el 80% de las células se encuentra en apoptosis (Q2+Q3). Existe una diferencia importante. Mientras que 0.5 mM de CoCl_2 la mayor parte (55%) de las células en apoptosis se encuentran en una etapa temprana, para 1.0 mM este mismo porcentaje se encuentra en apoptosis tardía, lo que nos habla de la importancia del efecto de la concentración de este compuesto en la muerte celular.

Se ha descrito la inducción de apoptosis temprana con incubación de CoCl_2 a una concentración de 0.4 mM con 12 h y se ha observado un incremento notorio en los niveles de expresión de caspasa 9 y p53 en células PC12.

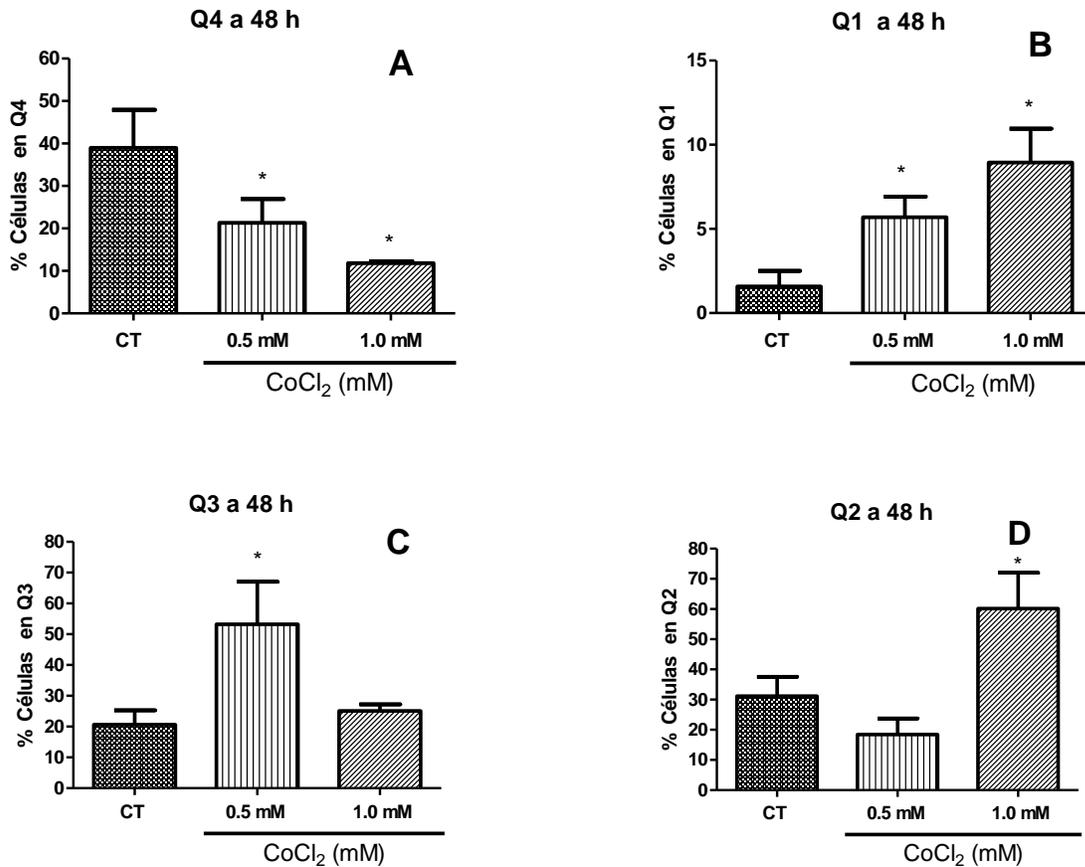


Fig. 17.- Evaluación de la muerte celular por tinción con anexina/IP en células tratadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ por 48 h. La suma de los 4 paneles representa el 100% de las células evaluadas. (A) porcentaje de células vivas (Q4), (B) porcentaje de células muertas por necrosis (Q1), (C) porcentaje de células en apoptosis etapa temprana (Q3) y (D) porcentaje de células en apoptosis etapa tardía (Q2). Los resultados se compararon contra el control. Los datos se expresan como la media ± la D.E. Se hizo un post análisis con una prueba de Dunnett. *P ≤ 0.05. n=4.

Estos reportes han encontrado que el CoCl₂ regula a la baja a Bcl-2 (el principal modulador anti-apoptótico presente en las células), regula a la alta a Bax1 (modulador pro-apoptótico) e induce activación de caspasas en células PC12 (Guo *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha reportado que con la activación de p53 seguida del tratamiento con 0.2 mM de CoCl₂ en células PC12, se logra inhibir la actividad transcripcional del factor HIF-1αβ. p53 se une

competitivamente al coactivador transcripcional p300 necesario para la unión del HIF-1 α al ADN, provocando muerte celular por daño al ADN o hipoxia (*Tan et al.*, 2008). Así mismo se ha sugerido que la mitocondria podría ser el principal blanco de la toxicidad inducida por el CoCl₂ por medio de la pérdida de su potencial de membrana y liberación de factores apoptogénicos como el factor de inducción de apoptosis (AIF) (*Caltana et al.*, 2009; *Karovic et al.*, 2007).

VI. CONCLUSIONES

- Se logró establecer un modelo simulador del evento hipóxico *in vitro* en el cual se consiguió medir diferentes marcadores de daño celular, desencadenados por el tratamiento con cloruro de cobalto.

- La activación del HIF-1 α se observó aumentada en células que fueron tratadas con el CoCl₂ a 0.15, 0.5 y 1.0 mM y 24 h y 48 h de incubación como evidencia de su estabilización, evento similar al observado tras la señalización por hipoxia química.

- El CoCl₂ induce una disminución en la funcionalidad mitocondrial normal y por lo tanto en la supervivencia celular que depende tanto del tiempo como de la concentración.

- Se observó un incremento en la generación de ROS por el tratamiento con CoCl₂ en células expuestas por 10 minutos a concentraciones de 0.5 y 1.0 mM.

- No fue posible evaluar la fragmentación del ADN en las células incubadas con CoCl₂ 0.5 y 1.0 mM por 24 y 48 h.

- Por medio de la tinción con IP se pudo verificar que el CoCl₂ es capaz de inducir muerte celular tras la incubación con 0.5 y 1.0 mM a 24 y 48 h. Con la tinción de anexina V/IP, se observó que el cobalto induce muerte en las células

PC12 y lo hace por el mecanismo de apoptosis, mayoritariamente. También hubo evidencia de muerte por necrosis pero en menor proporción.

VII. PERSPECTIVAS

- La perspectiva más importante de este trabajo es poder aplicar las condiciones establecidas en el modelo de hipoxia química para evaluar el efecto protector de algunos compuestos.

- Particularmente, nos interesa evaluar el efecto protector que ejercen el Extracto de Ajo Envejecido (AGE, de *Aged Garlic Extract*) y la S-alil-cisteína (SAC) que funcionan principalmente como compuestos antioxidantes, en células PC12 previamente tratadas con CoCl_2 simulando una señalización por hipoxia. Esto ya que resultados previos en el laboratorio han mostrado dicha protección en modelos de disminución de oxígeno *in vivo*.

Adicionalmente a la evaluación de los efectos protectores que ofrecen la SAC y el AGE en los diversos marcadores de la respuesta celular en eventos de hipoxia química pretendemos utilizar este modelo para dilucidar los mecanismos de acción a través de los cuales ejercen la protección celular.

- Estandarizar un modelo de hipoxia química *in vitro* en células PC12 con la deferoxamina, reportada como simulador de señalización por hipoxia a través de quelar el hierro del sitio activo de las PHDs y estabilizar a HIF-1 α con los métodos estandarizados en este trabajo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Agani** FH, Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. 2000. "The Role of Mitochondria in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 Expression during Hypoxia". *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (46):35863–35867
- **Aguilera** P, Vázquez-Contreras E, Gómez-Martínez CD, Chánez-Cardenas ME. 2009. "Hypoxia Inducible Factor-1 as a Therapeutic Target in Cerebral Ischemia". *Current Signal Transduction Therapy*. 4:162-173
- **Bardós** JI, Ashcroft M. 2005. "Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1755:107 – 120
- **Bergueron** M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. 2000. "Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Hypoxia-Induced Ischemic Tolerance in Neonatal Rat Brain". *Annals of Neurology*. 48 (3):285-296
- **Berra** E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. 2003. "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1a in normoxia". *The EMBO Journal*. 22 (16):4082-4090
- **Bouleau** S, Párvu-Ferecatu I, Rodriguez-Enfedaque A, Rincheval V, Grimal H, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F. 2007. "Fibroblast Growth

Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells”. *Apoptosis*. 12:1377–1387

- **Bracken** CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, Peet DJ. 2006. “Cell-specific Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Stabilization and Transactivation in a Graded Oxygen Environment”. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (32):22575–22585
- **Bruick** RK, McKnight SL. 2001. “A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF”. *Science*. 294:1337–1340
- **Bunn** HF, Poyton RO. 1996. “Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia”. *Physiological reviews*. 76 (3):839-85
- **Cabanillas** R. 2008. “Implicaciones Pronósticas de la Expresión de HIF-1 α en Carcinomas Epidermoides de Cabeza y Cuello”. Tesis Dr. Cien. Asturias, Universidad de Oviedo, Instituto Universitario de Oncología. 133 p.
- **Caltana** L, Merelli A, Lazarowski A, Brusco A. 2009. “Neuronal and Glial Alterations Due to Focal Cortical Hypoxia Induced by Direct Cobalt Chloride (CoCl₂) Brain Injection”. *Neurotoxicology Research*. 15:348–358
- **Camacho** A, Massieu L. 2006. “Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death”. *Arch Med Res*. 37:11-18
- **Caramelo** C, Peña-Deudero JJ, Castilla A, Justo S, De-Solis AJ, Neria F, Peñate S, Gonzalez-Pacheco FR. 2006. “Respuesta a la hipoxia: un

mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica”.
MEDICINA 66:155-164

- **Correia** SC, Moreira PI. 2010. “Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration?”. *Journal of Neurochemistry*. 112:1–12
- **Das** KP, Freudenrich TM, Mundy WR. 2004. “Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures”. *Neurotoxicology and Teratology*. 26:397–406
- **Davidson** TL, Chen H, Di Toro DM, D’Angelo G, Costa M. 2006. “Soluble nickel inhibits HIF-prolyl-hydroxylases creating persistent hypoxic signaling in A549 cells”. *Mol. Carcinog*. 45:479–489
- **Dirnagl** U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. “Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view”. *Trends Neurosci*. 22:391–397
- **Ema** M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. 1999. “Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal- induced interaction with CBP/p300”. *EMBO J*. 18 (7):1905-14
- **Epstein** AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O’Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. “C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation”. *Cell*. 107:43–54

- **Fang** D, Li Z, Zhong-ming Q, Mei WX, Ho YW, Yuan XW, Ya K. 2008. "Expression of bystin in reactive astrocytes induced by ischemia/reperfusion and chemical hypoxia in vitro". *Biochimica et Biophysica acta*. 1782:658-653
- **Fujimura** M, Morita-Fujimura Y, Noshita T, Sugawara T, Kawase M, Chan PH. 2000. "The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral in mice". *J Neurosci*. 20:2817-2824
- **Furuchi** T, Suzuki T, Sekine M, Katane M, Homma H. 2009. "Apoptotic inducers activate the release of D-aspartate through a hypotonic stimulus-triggered mechanism in PC12 cells". *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 490:118-128
- **Goldberg** MA, Dunning SP, Bunn HF. 1988. "Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein". *Science*. 242:1412–1415
- **Green** LA, Tischler AS. 1976. "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:2424–2428
- **Gu** J, Milligan J, Huang LE. 2001. "Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine". *J Biol. Chem* Feb. 276(5):3550-3554
- **Guo** L, Liu J, Zheng X, Yin F, Hu Y, Deng X, Chen G, Jiajia J, Zhang H. 2006. "Neurotrophic property of geniposide for inducing the neuronal differentiation of PC12 cells". *Int. J. Devl Neuroscience*. 24:419–424

- **Guo L, Liu J, Xia Z.** 2009. “Geniposide inhibits CoCl₂-induced PC12 cells death via the mitochondrial pathway”. *Chin Med J.* 122(23):2886-2892

- **Guo S, Miyake M, Liu KJ, Shi H.** 2009. “Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by *in vitro* ischemia through deteriorating cellular redox environment”. *Neurochem.* 108(5):1309–1321

- **Hewitson KS, Liénard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, Oldjam NJ, McNeill LA, Schotfield CJ.** 2007. “Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates”. *J Biol Chem.* 285 (5):3293-3301

- **Hirsilä M, Li D, Koivunen P, Brenner MC, Xu L, Yang C, Kivirikko KI, Myllyharju J.** 2004. “Many Amino Acid Substitutions in a Hypoxia-inducible Transcription Factor (HIF)-1 α -like Peptide Cause Only Minor Changes in Its Hydroxylation by the HIF Prolyl 4-Hydroxylases”. *THE Journal of Biological Chemistry.* 279 (53): 55051–55059

- **Hirsilä M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J.** 2005. “Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway”. *The FASEB Journal.* 19(10):1308-1310

- **Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS.** 2002. “Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3”. *J Biol Chem.* 277:39792-39800

- **Huang** HM, Zhang H, Ou HC, Chen HL, Gibson GE. 2004. “ α -keto-g-methyl-n-valeric acid diminishes reactive oxygen species and alters endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores”. *Free Radical Biology & Medicine*. 37 (11):1779–1789

- **Jung** JY, Kim WJ. 2004. “Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in $CoCl_2$ -induced apoptosis of rat PC12 cells”. *Neuroscience Letters*. 371:85–90

- **Jung** JY, Mo HC, Yang KH, Jeong YJ, Yoo HG, Choi NK, Oh WM, Oh HK, Kim SH, Lee JH, Kim JH, Kim WJ. 2007. “Inhibition by epigallocatechin gallate of $CoCl_2$ -induced apoptosis in rat PC12 cells” *Life Sciences*. 80:1355–1363

- **Jung** JY, Roh KH, Jeong YJ, Kim SH, Lee EJ, Kim MS, Oh WM, Oh HK, Kim WJ. 2008. “Estradiol protects PC12 cells against $CoCl_2$ -induced apoptosis”. *Brain Research Bulletin*. 76:579–585

- **Kaczmarek** M, Timofeeva OA, Karaczyn A, Malyguine A, Kasprzak K S, Salnikow K. 2007. “The role of ascorbate in the modulation of HIF-1 α protein and HIF-dependent transcription by chromium(VI) and nickel(II)”. *Free Radic. Biol. Med.* 42:1246–1257

- **Kaczmarek** M, Cachau RE, Topol IA, Kasprzak KS, Ghio A, Salnikow K. 2009. “Metal Ions-Stimulated Iron Oxidation in Hydroxylases Facilitates Stabilization of HIF-1 α Protein”. *Toxicological Sciences*. 107 (2):394–403

- **Kallio** PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. 1997. “Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and

conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(11):5667-5672

- **Kanaya** K, Kamitani T. 2003. “pVHL-independent ubiquitination of HIF1 α and its stabilization by cobalt ion”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 306:750–755
- **Kanski** J, Drake J, Aksenova M, Engman L, Butterfield DA. 2001. “Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures”. *Brain Research*. 911 (1):12-21
- **Karovic** O, Tonazzini I, Rebola N, Edström E, Lövdahl C, Fredholm BB, Daré E. 2007. “Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1 α ”. *Biochem Pharmacol*. 73 (5):694-708
- **Kim** BY, Kim H, Cho EJ, Youn HD. 2008. “Nur77 upregulates HIF- α by inhibiting pVHL-mediated degradation”. *Experimental and Molecular Medicine*. 40 (1):71-83
- **Kotake-Nara** E, Saida K. 2007. “Characterization of CoCl₂-induced reactive oxygen species (ROS): Inductions of neurite outgrowth and endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in PC12 cells by CoCl₂ are ROS dependent, but those by MnCl₂ are not”. *Neuroscience Letters*. 422:223–227

- **Kroll** SL, Czyzyk-Krzeska MF. 1998. “Role of H₂O₂ and heme-containing O₂ sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression” *Am. J Physiol.* 274 (1):167-74

- **Lee** SR, Park JH, Park EK, Chung CH, Kang SS, Bang OS. 2005. “Akt-Induced Promotion of Cell-Cycle Progression at G₂/M Phase Involves Upregulation of NF-Y Binding Activity in PC12 Cells”. *Journal of Cellular Physiology.* 205:270–277

- **Lee** HK, Seo IA, Suh DJ, Lee HJ, Park HT. 2009. “A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in neuroglial cells”. *Journal of Neurochemistry.* 108:273–284

- **Li** Q, Chen H, Huang X, Costa M. 2006. “Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-regulated genes”. *Toxicol Appl Pharmacol.* 213 (3): 245-255

- **Lisy** K, Peet DJ. 2008. “Turn me on: regulating HIF transcriptional activity”. *Cell Death and Differentiation.* 15:642–649

- **Luo** FM, Liu XJ, Yan NH, Li SQ, Cao CQ, Cheng QY, Xia QJ, Wang HJ. 2006. “Hypoxia-inducible transcription factor-1 α promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway”. *BMC Cancer.* 6:26

- **Margaill** I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. “Antioxidant strategies in the treatment of stroke”. *Free Radical Biology & Medicine.* 39:429 – 443

- **Martin** SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ. 1995. "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl". *J Exp Med.* 182 (5):1545-1556
- **Metzen** E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. 2003. "Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing". *J Cell Sci.* 116 (7): 1319-1326
- **Nakajima** M, Kashiwagi K, Ohta J, Furukawa S, Hayashi K, Kawashima T, Hayashi Y. 1994. "Nerve growth factor and epidermal growth factor rescue PC12 cells from programmed cell death induced by etoposide: distinct modes of protection against cell death by growth factors and a protein-synthesis inhibitor". *Neuroscience Letters.* 176:161-164
- **Naranjo-Suárez** S, Castellanos MC, Álvarez-Tejado M, Vara A, Landázuri MO, Del Peso L. 2003. "Down-regulation of Hypoxia-inducible Factor-2 in PC12 Cells by Nerve Growth Factor Stimulation". *The Journal of Biological Chemistry*". 278 (34):31895-31901
- **Narita** T, Yin S, Gelin CF, Moreno CS, Yepes M, Nicolaou KC, Van Meir EG. 2009. "Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor". *Clin Cancer Res.* 15 (19): 6128–6136
- **O'Brien** MC, Bolton WE. 1995. "Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry". *Cytometry.* 19 (3):243-255

- **Osada-Oka** M, Hashiba Y, Akiba S, Imaoka S, Sato T. 2010. “Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1a under hypoxia: Contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization”. *FEBS Letters*. 584:3073–3079

- **Pacary** E, Tixier E, Coulet F, Roussel S, Petit E, Bernaudin M. 2007. “Crosstalk between HIF-1 and ROCK pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in PC12 neurite outgrowth”. *Mol. Cell. Neurosci.* 35:409–423

- **Pacary** E, Petit E, Bernaudin M. 2008. “Concomitant inhibition of prolyl hydroxylases and ROCK initiates differentiation of mesenchymal stem cells and PC12 towards the neuronal lineage”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 377:400–406

- **Pappalardi** MB, McNulty DE, Martin JD, Fisher KE, Jiang Y, Burns MC, Zhao H, Ho T, Sweitzer S, Schwartz B, Annan RS, Copelands RA, Tumminos PJ, Luo L. 2011. “Biochemical Characterization of Human HIF Hydroxylases Using HIF Protein Substrates That Contain All Three Hydroxylation Sites”. *Biochemical Journal*. 436 (2):363-369

- **Salnikow** K, An WG, Melillo G, Blagosklonny MV, Costa M. 1999. “Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors”. *Carcinogenesis*. 20:1819–1823

- **Sánchez-Puig** N, Veprintsev DB, Fersht AR. 2005. “Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53”. *Mol Cell*. 17 (1):11-21

- **Sandner** P, Wolf K, Bergmaier U, Gess B, Kurtz A. 1997. “ Hypoxia and cobalt stimulate vascular endothelial growth factor receptor gene expression in rats”. *Pflugers Arch.* 433 (6):803-808

- **Schotfield** CJ, Ratcliffe PJ. 2004. “Oxygen sensing by HIF hydroxylases”. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:343–354

- **Semenza** GL, Wang GL, Jiang BH. 1995, “Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1”. *Biochem Biophys Res Commun.* 216 (2):669-675

- **Semenza** GL, Jiang B-H, Bauer C, Marti HH. 1996. “Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension”. *Am J Physiol.* 271:1172-1180

- **Seo** SR, Seo JT. 2009. “Calcium overload is essential for staurosporine-induced cell death following neuronal differentiation in PC12 cells”. *Experimental and Molecular Medicine.* 41 (4):269-276

- **Stenger** C, Naves T, Verdier M, Ratinaud MH. 2011. “The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status”. *Int J Oncol.* 39 (3):601-609

- **Tan** XL, Huang XY, Gao WX, Zai Y, Huang QY, Luo YJ, Gao YQ. 2008. “CoCl₂-induced expression of p300 promotes neuronal-like PC12 cell damage”. *Neuroscience Letters.* 441:272–276

- **To** KK, Huang LE. 2005. “Suppression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1”. *J Biol Chem.* 280 (45):38102-38107

- **Torii S**, Kobayashi K, Takahashi M, Katahira K, Goryo K, Matsushita N, Yasumoto K, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. 2009. "Magnesium Deficiency Causes Loss of Response to Intermittent Hypoxia in Paraganglion Cells". *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (28):19077–19089

- **Traystman RJ**. 2003. "Animal models of focal and global cerebral ischemia". *ILAR J*. 44 (2):85-95

- **Vaudry D**, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE. 2002. "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections". *Science*. 296 (5573):1648-1659

- **Vengellur A**, LaPres JJ. 2004. "The Role of Hypoxia Inducible Factor 1 α in Cobalt Chloride Induced Cell Death in Mouse Embryonic Fibroblasts". *Toxicological Sciences*. 82:638–646

- **Vermes I**, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". *J Immunol Methods*. 184 (1):39-51

- **Villar D**, Vara-Vega A, Landazuri MO, Del PL. 2007. "Identification of a region on hypoxia inducible-factor prolyl-4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains". *Biochem.J*. 408:231-240

- **Wang G**, Hazra TK, Mitra S, Lee HM, Englander EW. 2000. "Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells". *Nucleic Acid Research*. 28 (10):2135-2140

- **Zagórska** A, Dulak J. 2004. "HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing". *Acta Biochimica Polonica*. 51 (3):563-585
- **Ziello** JE, Jovin IS, Huang Y. 2007. "Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia". *YALE Journal of Biology and Medicine*. 80:51-60
- **Zou** W, Yan M, Xu W, Huo H, Sun L, Zheng Z, Liu X. 2001. "Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation". *Journal of Neuroscience Research*. 64 (6):646–653
- **Zou** W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu X. 2002. "Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride induced apoptosis in PC12 cells". *Journal of Neuroscience Research*. 28 (6):2135–2140