



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

HIF-1 α INDUCE UN FENOTIPO DE QUIMIORESISTENCIA EN UN
MODELO DE LINFOMA NO HODGKIN A TRAVES DE LA SOBRE
REGULACIÓN DE Bcl-xL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LUNA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. SARA HUERTA YEPEZ
FACULTAD DE MEDICA

COMITÉ TUTOR
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. CESAR RAÚL GONZALEZ BONILLA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. ENERO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Este trabajo recibió financiamiento mediante los proyectos CONACYT-2008-CO1-88004 y HIM/2009/008 Ssa. 829 de Fondos Federales. Ambos aprobados por el comité de investigación local del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo los números de proyectos HIM/2009/025 y HIM/2009/008, respectivamente.

Agradecimiento a CONACYT por la beca otorgada número de registro 220662



ABREVIATURAS

2-ME: 2 Metoxiestradiol

ANOVA: Análisis de Varianza

BSA: Albúmina sérica bovina

CDDP: Cisplatino/ cis-diaminodicloro platino II

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDHB: Etil 3,4-dihidroxibenzoato

HIF-1 α : Factor Inducible por Hipoxia-1 alfa

HRE: Elementos de Respuesta a Hipoxia

LH: Linfoma de Hodgkin

LNH: Linfoma no Hodgkin

LCAG: Linfoma de células anaplásicas grandes

LB: Linfoma de Burkitt

LL: Linfoma linfoblástico

LCGB: Linfoma de células grandes de B

μ M: Micromolar

mM: Milimolar

PBS: Solución Amortiguadora de Fosfatos

SFB: Suero Fetal Bovino

siRNA: RNA de interferencia

INDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
3.1	Epidemiología del cáncer	5
3.2	Linfoma	5
3.3	Sintomatología y Diagnóstico	6
3.4	Tratamiento	7
3.5	Resistencia a Fármacos	8
3.6	Principales vías de inducción de apoptosis	10
3.7	La Familia de Bcl-2	10
3.8	HIF-1 α y la carcinogénesis	13
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5.	HIPOTESIS	19
6.	OBJETIVO GENERAL	20
6.1	Objetivos específicos	20
7.	MATERIAL Y METODOS	21
7.1	Reactivos	21
7.2	Líneas celulares y condiciones de cultivo	21
7.3	Condiciones de hipoxia	21
7.4	Transfección con RNAs de interferencia	22
7.5	Análisis por Western Blot	23
7.6	Densitometría	23
7.7	Inmunocitoquímica	24
7.8	Ensayos de apoptosis	24
7.9	Muestras Biológicas	25

7.10	Microarreglo de tejidos	25
7.11	Inmunohistoquímica y análisis de patología digital	26
7.12	Análisis estadístico	28
8.	RESULTADOS	29
8.1	El aumento de la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en la línea celular Ramos induce resistencia a Cisplatino	29
8.2	El largo período de exposición a hipoxia induce un fenotipo quimioresistencia en una línea celular de LNH	33
8.3	La inhibición de HIF-1 α y Bcl-xL sensibiliza a las líneas celulares de LNH Ramos y Daudi al efecto del Cisplatino	37
8.4	La sobreexpresión de HIF-1 α y Bcl-xL se presenta en los subtipos histológicos más agresivos de LNH	44
8.5	Expresión de otras proteínas miembros de la familia de Bcl-2	47
9.	DISCUSIÓN	48
10.	CONCLUSIONES	55
11.	REFERENCIAS	56

1. RESUMEN

El Linfoma no Hodgkin (LNH) es una de las neoplasias más comunes en la infancia. El desarrollo de quimioresistencia por parte de las células tumorales se ha convertido en una de las principales causas de falla al tratamiento. Esta resistencia se ha asociado a diferentes mecanismos, uno de ellos es la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL. Se ha demostrado que esta proteína es regulada por el factor de transcripción HIF-1 α , que se encuentra sobre expresado en una gran variedad de tumores, incluyendo el LNH. Por lo que la sobreexpresión de ambas proteínas puede resultar en la resistencia a la quimioterapia. En este trabajo, evaluamos el papel de HIF-1 α en la resistencia a la quimioterapia a través de la regulación de Bcl-xL en un modelo de LNH, utilizando la modulación farmacológica de la expresión y actividad HIF-1 α . Nuestros resultados muestran que el tratamiento de la línea celular de LNH Ramos con etil 3,4-dihidroxibenzoato, un inhibidor de la protil hidroxilasa, induce la acumulación de HIF-1 α , lo cual correlaciona con un aumento en la expresión de Bcl-xL, así como, con una mayor resistencia a la apoptosis, después de la exposición de las células a los fármacos quimioterapéuticos. En contraste, la inhibición de HIF-1 α con RNA de interferencia o con 2-metoxiestradiol, un inhibidor de la actividad de HIF-1 α , disminuyen la expresión de Bcl-xL y esto correlaciona con la sensibilización de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos. Por otro lado, utilizando la tecnología de microarreglo de tejidos, evaluamos la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en biopsia de pacientes con diferentes tipos de LNH mediante inmunohistoquímica y patología digital, los resultados mostraron que estas dos proteínas se sobreexpresan en los tipos histológicos mas agresivos.

Nuestros datos demuestran por primera vez que HIF-1 α induce un fenotipo de quimioresistencia en células de LNH esto a través de la regulación de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, esto es consistente con el hallazgo de la sobreexpresión de ambas proteínas en los subtipos de LNH de peor pronóstico. Lo cual perfila a HIF-1 α como un potencial blanco terapéutico y/o marcador pronóstico en esta neoplasia.

2. ABSTRACT

Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) is one of the most common cancers in childhood. The development of chemoresistance in tumor cells is one of the principal causes of treatment failure. This resistance has been associated to different mechanisms, being the overexpression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-xL. It has been shown that this protein is regulated by the transcription factor HIF-1 α , which is overexpressed in several tumors, including NHL, and the overexpression of both proteins may result in resistance to chemotherapy. We investigated the role of HIF-1 α in resistance to chemotherapy via the induction of the Bcl-xL expression in NHL cell lines, using a pharmacological modulation of HIF-1 α . Our data showed that treating the Ramos cell with ethyl 3,4-dihydroxybenzoate, the inhibitor of prolyl hydroxylase, induces accumulation of HIF-1 α and this correlates with an increase of Bcl-xL as well as resistance to apoptosis after the exposition to chemotherapeutics drugs. In contrast, inhibition of HIF-1 α with RNA interference or 2-methoxyestradiol, an inhibitor of the activity of HIF-1 α , decreases the expression of Bcl-xL and this correlates with the sensitization of tumor cells to chemotherapeutic drugs. Furthermore, using microarray technology of tissue, we evaluated the expression of HIF-1 α and Bcl-xL in biopsy of patients with different types of NHL by immunohistochemistry and digital pathology, the results showed that these two proteins are overexpressed in more aggressive histologic types.

Our data show for first time that HIF-1 α induces a phenotype of chemoresistance in NHL cells through the regulation of anti-apoptotic protein Bcl-xL. This is consistent with the finding of overexpression of both proteins in

the subtypes of poor prognosis of NHL. This profile to HIF-1 α as a potential therapeutic target and /or prognostic marker in this neoplastic.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Epidemiología del cáncer.

A nivel mundial el cáncer es la primer causa de muerte y se le atribuye, aproximadamente, el 13% de las defunciones ocurridas en 2008 [1]. En México, las enfermedades oncológicas se ubican dentro de las primeras diez causas de muerte en la población en general, lo cual implica una carga financiera importante a las instituciones del sector salud [2].

En la población infantil de México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en el grupo de edad de 5 a 14 años [3]. La edad de mayor incidencia de cáncer se encuentra en la primera década de la vida y lo padecen en su mayoría los varones, en donde los linfomas se encuentran entre las neoplasias de mayor incidencia en la población infantil [4].

3.2 Linfomas.

Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias del tejido linfoide, que se caracterizan por presentar una evolución aguda o subaguda; en niños, con frecuencia invaden la médula ósea y se presentan en sitios extraganglionares [5].

Los linfomas son divididos en dos grupos los Linfomas de Hodgkin (LH) y los linfomas no Hodgkin (LNH). Los linfomas de Hodgkin se caracteriza por la presencia de células de Reed Sternberg, las cuales presentan aneuploidia [6], por otra parte el termino de LNH se ha empleado para identificar a un grupo de neoplasias de origen linfocitario, cuya localización se encuentra afuera de la medula ósea. La organización mundial de la salud ha clasificado a los LNH en

diversos subtipos de acuerdo a sus características epidemiológicas, a su etiología y a manifestaciones clínicas particulares [7].

El LNH es uno de los tipos de cáncer de mayor incidencia en Estados Unidos, representando alrededor de 4% de todas las neoplasias dignosticadas cada año [8]. En la población infantil de Estados Unidos el linfoma (LH y LNH) ocupa el tercer lugar de incidencia con alrededor de 8% de casos diagnosticados, solo por detrás de leucemias y tumores del sistema nervioso central [9]. En México, los linfomas se encuentran entre las primeras 10 neoplasias de mayor incidencia en la población adulta [3]. Mientras que en la población infantil al igual que en Estados Unidos ocupan el tercer lugar de mayor incidencia [4].

En la población infantil existe una menor variabilidad entre los LNH que en la población adulta. Los principales tipos de linfoma que se presentan en la población infantil son: linfoma/leucemia de Burkitt (LB), leucemia/linfoma linfoblástico (LL), linfoma de células grandes B (LCGB); y linfoma anaplásico de células grandes (LACG), que pertenecen a la categoría de neoplasias de células T y NK [10].

3.3 Sintomatología y Diagnóstico.

El primer síntoma notable es un aumento del tamaño progresivo y no doloroso de los ganglios linfáticos, ya sea localizado o sistémico. Dependiendo de la localización será la sintomatología acompañante; en caso de localizarse en mediastino pueden llegar a poner en peligro la vida por obstrucción de la vía aérea. En caso de presentarse en abdomen muy frecuentemente se asociarán con síntomas de obstrucción, tales como estreñimiento severo o dolor [7].

Los LNH presentan mayor afección extraganglionar y tienen mayor preferencia de invasión de la médula ósea y del sistema nervioso central al compararlos con los LH; razón por la cual los primeros síntomas son: alteraciones hematológicas acompañados de hemorragia e infecciones; o bien manifestaciones neurológicas tales como debilidad, sensibilidad anormal hasta crisis convulsivas. Con el fin de corroborar el diagnóstico es necesaria la realización de una biopsia. El estudio histopatológico permite identificar la diferencia entre el LH y los distintos tipos de LNH. Con el fin de afinar el diagnóstico es necesario realizar inmunohistoquímica, con lo cual se establece el origen B o T. La extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico es uno de los factores que precisan el tratamiento y el pronóstico del paciente. La tomografía axial computarizada permite el sondeo de los probables sitios afectados. Se realiza un aspirado de médula ósea y la obtención de líquido cefalorraquídeo con el fin de determinar infiltración de células tumorales [5].

3.4 Tratamiento.

En la actualidad el tratamiento del LNH toma en consideración el subtipo histológico y el estadio de la enfermedad; generalmente los tipos de LNH que se originan a partir de linfocitos B tienen una mejor respuesta al tratamiento. El tratamiento de elección de estas neoplasias es la quimioterapia con múltiples medicamentos [5,11]. El empleo de la cirugía se limita a situaciones específicas en las cuales es posible la remoción completa del tumor. Hoy en día existen diversos protocolos de tratamiento que permiten una supervivencia global del 80 al 90% como son el CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, oncovin y prednisona) el cual puede ser complementado con inmunoterapia utilizando el

anticuerpo anti-CD20 y el tratamiento con metotrexato, ifosfamida, etoposido y dexametasona [11,12]. Sin embargo, una respuesta parcial indica que el tumor tiene resistencia primaria, por lo tanto la continuidad del mismo tratamiento tiene pocas probabilidades de éxito. En estos casos las opciones terapéuticas son pocas y se puede anticipar que los resultados serán poco eficaces [13,14,15].

El tratamiento simultáneo de la quimioterapia con anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra antígenos no modificados, como Rituximab (anti-CD20) - el cual induce la lisis celular por activación de receptores Fc [16], además de inducir la quimio-sensibilización de las células de linfoma por inhibición de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL [17] - han demostrado importante utilidad en el tratamiento del LNH en pacientes adultos [18,19,20]. No obstante, su uso en niños a la fecha es controversial y pocos estudios han mostrado un efecto positivo en el tratamiento del LNH [18,21].

3.5 Resistencia a fármacos.

El desarrollo de resistencia es uno de los principales obstáculos durante el uso de quimioterapia para el tratamiento del cáncer. Entre los mecanismos que participan en la resistencia a la quimioterapia se encuentran:

1) La reducción de la acumulación de los fármacos en la célula por la participación de proteínas expulsoras, como la glicoproteína-P 170, **MRP, LRP, VAMAT y ARX**; de esta proteínas la mas estudiada es la glicoproteína P (gp-170), una proteína fosforilada y glicosilada de 170 kD y 1,280 aminoácidos, codificada por el gen MDR1. Esta glicoproteína P, puede translocar una gran variedad de compuestos, en especial moléculas con características

hidrofóbicas [22]. Se ha reportado que diversos tumores, en donde gp-170 se encuentra sobre expresado muestran resistencia a fármacos como la doxorubicina, la vinblastina, el paclitaxel y el etopósido [23].

2) Destoxificación celular mediante el sistema de la Glutathion S transferasa (GST). La destoxificación celular mediante la GST cataliza la reacción entre el glutatión y los fármacos, lo cual resulta en un conjugado del fármaco con glutatión. Este conjugado es menos activo y más polar (aumenta su solubilidad en agua), por lo tanto es más fácilmente expulsado de la célula. Niveles altos de glutatión se han encontrado en células tumorales resistentes a agentes alquilantes como ciclofosfamida y clorambucil [24].

3) Alteración de genes y proteínas que controlan la apoptosis. Como por ejemplo la proteína p53, la familia de las IAP's y las de la familia de Bcl-2. Estas últimas han sido las más estudiadas en cáncer [24]. Se ha observado que la sobre expresión de proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL está asociada a resistencia a la quimioterapia en nefroblastomas [25], carcinoma de ovarios [26], leucemias monocíticas [27], carcinoma de células escamosas [28] y en leucemia aguda de células T [29].

El papel de la apoptosis en la resistencia a los fármacos se puede explicar si se considera que la carcinogénesis sucede en múltiples etapas, en las cuales se presentan mutaciones en genes que controlan la proliferación celular y la apoptosis, permitiendo a las células adquirir capacidades que le permiten crecer en ausencia de estímulos de crecimiento, a pesar de las señales de inhibición de crecimiento [30].

3.6 Principales vías de inducción de apoptosis.

La apoptosis está caracterizada por distintos cambios celulares tanto morfológicos como bioquímicos. Uno de los principales mecanismos que participan en este proceso, es el mediado por la familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas, las cuales se expresan como zimógenos, que son activados mediante procesamiento proteolítico. Se conocen dos vías principales de inducción de apoptosis que involucran la activación de las caspasas: la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca, se inicia a través de la unión de los ligandos de muerte como CD95L, TNF y TRAIL a sus receptores, CD95, TNFR o DR4/DR5, respectivamente, esta unión induce la activación de las caspasas proximales (o activadoras, como caspasa 8 y 10), las cuales procesan y activan a las caspasas efectoras como caspasa 3 y 7 [31].

La vía Intrínseca requiere de la desestabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas que incluyen Smac/DIABLO, HtRA2 y Citocromo c [30]. Cuando el Citocromo c interacciona con Apaf-1 induce la activación de la caspasa 9, dando pauta al inicio de la cascada de caspasas, mientras que Smac/DIABLO y HtRA2 se unen y antagonizan a las IAPs [32]. Este proceso es altamente regulado por la interacción entre las proteínas de la familia de Bcl-2.

3.8 Familia de Bcl-2

La familia de Bcl-2 se divide en dos grupos: las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 y A1 y las proteínas pro-apoptóticas, las

cuales se subdividen en las proteínas iniciadoras ó BH3 “only” Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa, entre otras y las proteínas efectoras Bax y Bak [33].

La interacción entre las proteínas de la familia de Bcl-2 regula la muerte celular, a través de la liberación de factores pro-apoptóticos de la mitocondria. Se ha reportado que estímulos como: el daño al DNA, ausencia de factores de crecimiento, el estrés oxidativo, y la exposición a radiaciones, inducen la activación de las proteínas BH3 “only” de la familia de Bcl-2, que a su vez llevan a la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak, provocando un cambio conformacional que les permite insertarse en la membrana de la mitocondria formando oligómeros, que llevan acabo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP por sus siglas en inglés), iniciando así la cascada apoptótica que llevara a la activación de la caspasa 9 y la caspasa 3 (figura 1, activación) [34]. No obstante, se ha observado que la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak también les permite interactuar con las proteínas anti-apoptoticas como Bcl-xL [35], evitando de esta forma la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos (figura 1, inhibición).

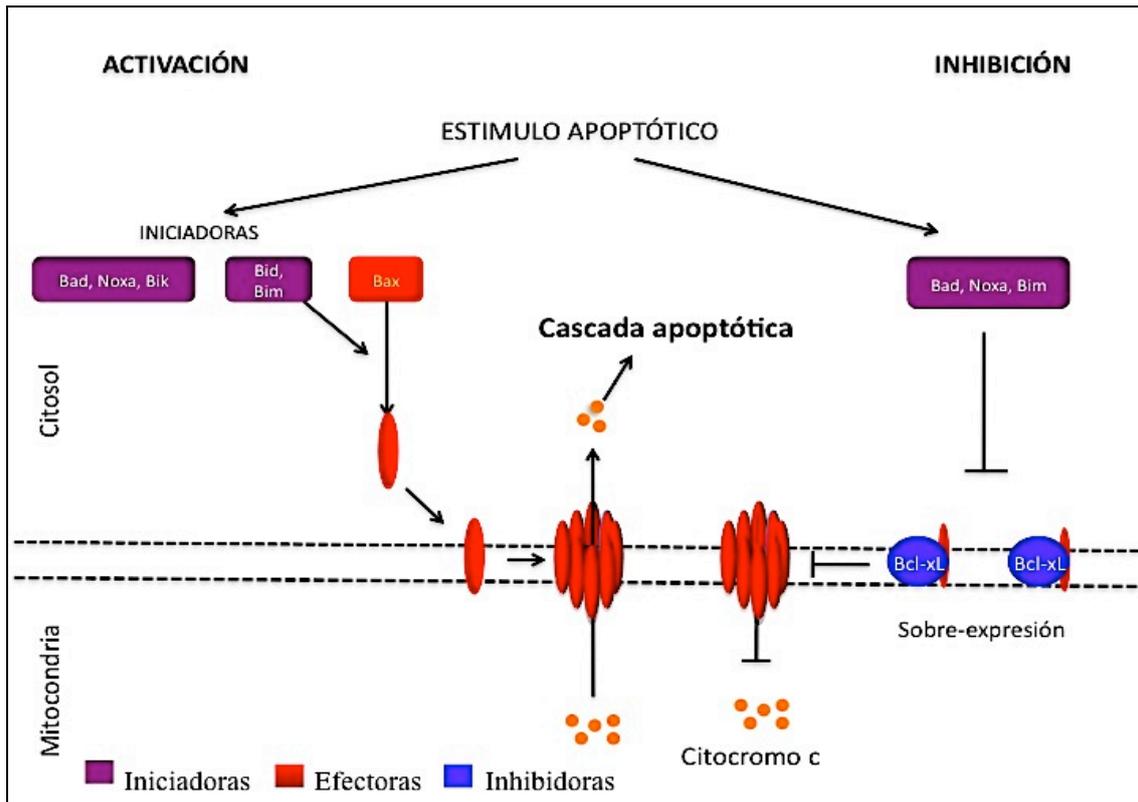


Figura 1. Participación de las proteínas de la Familia Bcl-2 en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. Estímulos apoptóticos como el daño al DNA llevan a la activación de las proteínas pro-apotóticas favoreciendo la salida de Citocromo c entre otros que inician la cascada de apoptosis. Mientras que la sobreexpresión de proteínas anti-apotóticas como Bcl-xL evitan la permeabilización de la mitocondria al secuestrar a las proteínas efectoras Bax y Bak Modificado de Häcker G y col [36].

Desde hace ya varios años se ha reportado que la desregulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 tiene un papel fundamental en los mecanismos de la carcinogénesis, pues se observó que la sobre expresión de la proteína anti-apotótica Bcl-2 en líneas celulares de leucemias [37], cáncer de mama [38] y cáncer de pulmón [39] están asociadas a la quimioresistencia. De igual manera, la sobre expresión de Bcl-xL se ha asociado a la resistencia a una gran variedad de fármacos [40,41] en distintos tipos de neoplasias como el cáncer de próstata [42] y en el LNH [43,44,45].

Por lo que entender el mecanismo de regulación de las proteínas anti-apotóticas de la familia de Bcl-2 puede ayudar en un futuro a desarrollar

nuevas estrategias para bloquear su actividad e inducir de esta forma a la célula tumoral a morir por apoptosis. Ejemplo de ello es que la inhibición de Bcl-xL con RNAs de interferencia [46], péptidos antagónicos [47] o por la acción de fármacos [48], sensibiliza a las células tumorales a morir por apoptosis.

En este aspecto, se ha reportado que Bcl-xL es regulada por varios factores de transcripción, como STAT-1 [49], GATA-1 [50], PAX3 [51], Ets2 [52], Brn-3a [53] y NF- κ B [54], este último se ha reportado que su inhibición resulta en la sensibilización de líneas celulares de LNH a la acción de los agentes quimioterapéuticos [17].

No obstante, Chen y cols [42] reportaron que Bcl-xL, también es regulada de forma transcripcional por el Factor Inducible por Hipoxia-1 α (HIF-1 α), esto en líneas celulares de cáncer de próstata, en donde, la inhibición de este factor de transcripción con un RNA de interferencia correlaciono con la disminución de la expresión de Bcl-xL y la sensibilización de las células a la radioterapia.

3.9 El Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1 α) y la carcinogénesis

El factor de transcripción HIF-1 es el principal factor de transcripción activado en condiciones de hipoxia, que regula la expresión de una gran variedad de genes que juegan un papel importante para la adaptación de la célula en un ambiente reducido en oxígeno. No obstante, se ha reportado que HIF-1 también es activado en condiciones de normales de oxígeno (normoxia) por estímulos como citocinas y hormonas [55].

El factor de transcripción HIF-1 se compone de dos subunidades, la unidad alfa (HIF-1 α) y la subunidad beta (HIF-1 β), también conocida como ARNT la cual se encuentra expresada constitutivamente en el núcleo de la célula.

En condiciones como infarto o cáncer [56,57,58,59,60,61,62], en donde se producen estados de hipoxia, se induce la expresión de HIF-1, el cual contribuye a la adaptación y supervivencia de las células a bajas concentraciones de oxígeno [63,64]. Sin embargo, el mRNA de ambas subunidades es detectable aún en estado de normoxia, lo cual indica que la subunidad α es regulada de manera postranscripcional [65]. En relación con su regulación, el primer paso es la detección de cambios de oxígeno, la cual se lleva a cabo por un sensor de oxígeno, que hidroxila dos residuos de prolina (P402 y P564) [65], que se localizan en el dominio de degradación dependiente de oxígeno, (ODD), además se hidroxila la asparagina (N803) la cual se localiza en el dominio de transactivación en la región carboxilo terminal (C-TAD). Esta hidroxilación permite la unión del inhibidor de HIF-1 (FIH-1) y con ello evita la unión del co-activador p300/CBP [66]. Por su parte, la hidroxilación de las dos prolina favorece la unión de la proteína von Hippel Lindau (VHL) [67] y con esto da la señal para la ubiquitinación por una ligasa de ubiquitina tipo E3 y su subsecuente degradación por el proteasoma 26S (figura 2, normoxia) [68]. Por otro lado, en estado de hipoxia estas hidroxilaciones no se producen, lo que permite que la subunidad α sea translocada al núcleo y ahí dimeriza con la subunidad β , lo cual permite la unión a los elementos respondedores en hipoxia (HER) (figura 2, hipoxia) [66], llevándose a cabo así la transcripción de diversos genes. Se han reportado a la fecha más de 150 genes regulados por HIF-1, los cuales participan en diversos procesos como son eritropoyesis, metabolismo

energético, glicólisis, crecimiento celular, supervivencia, movilidad celular, apoptosis, y carcinogénesis (REF) .

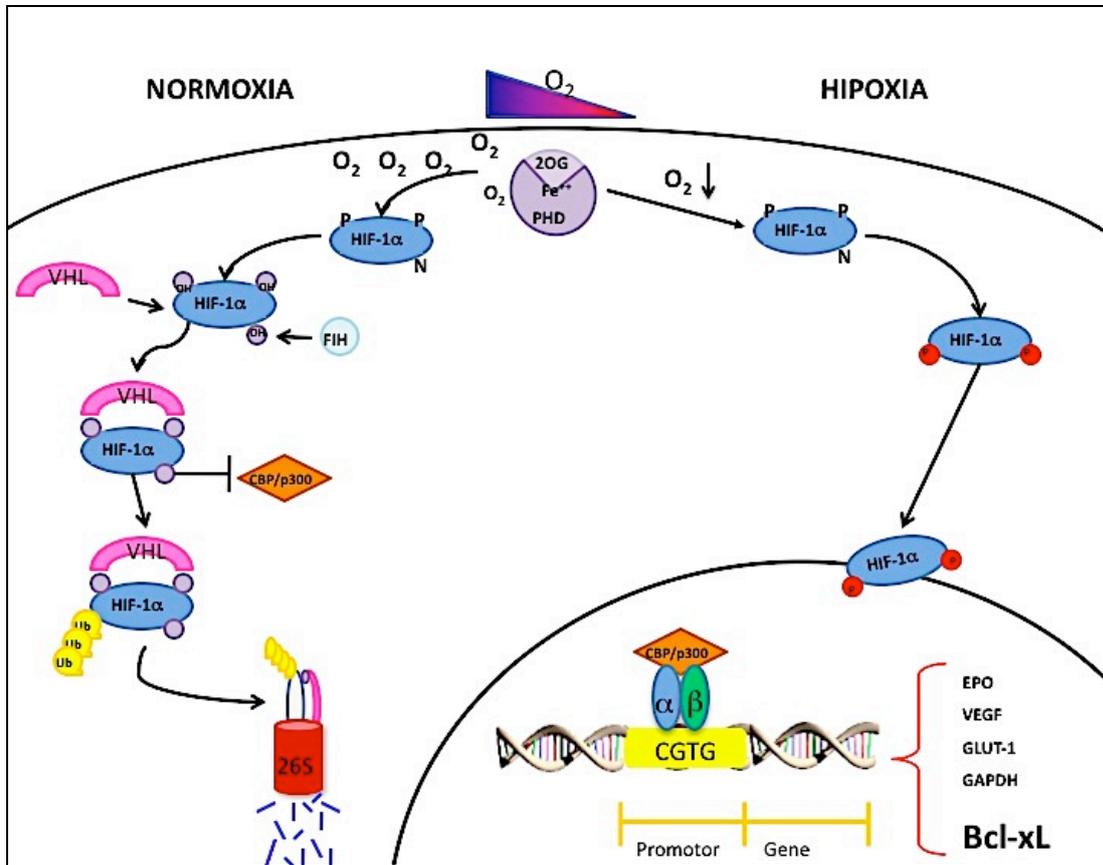


Figura 2. Activación y degradación del factor HIF-1. En condiciones de normoxia HIF-1 α es hidroxilado en sus residuos de prolina lo que permite el anclaje de la proteína VHL y servir de señal para su ubiquitinación por la enzima E3 ubiquitin ligasa y así ser degradada vía proteosoma. Mientras que en hipoxia HIF-1 α es fosforilado favoreciendo la interacción con la proteína CBP/300 para que se lleve la translocación a núcleo y así unirse a los sitios HRE para que se lleve la regulación transcripcional de sus genes blancos como Bcl-xL .

En los últimos años se ha reportado que HIF-1 α está sobre expresado en distintos tipos de cáncer como: cáncer de cabeza y cuello [69], cáncer cérvico uterino [70], cáncer de ovario [71], cáncer de mama [72,73] y cáncer de pulmón [74], entre otros [75], y se ha asociado a diferentes procesos que favorecen el desarrollo tumoral, ya que regula una gran variedad de genes implicados en distintos procesos carcinogénicos como: proliferación celular, angiogénesis,

metabolismo, metástasis y apoptosis, así como resistencia a fármacos [12,76,77].

En el LNH también se ha observado la sobre expresión de HIF-1 α [12,78], sugiriendo que este factor de transcripción podría estar implicado en la regulación de Bcl-xL en esta neoplasia.

Por lo que en este trabajo, evaluamos el papel que juega HIF-1 α en la quimioresistencia, a través de la regulación de Bcl-xL en un modelo de linfoma no Hodgkin. Para este fin se utilizaron dos agentes farmacológicos: etil 3,4-dihidroxibenzoato (EDHB), con la finalidad de inducir la acumulación de HIF-1 α , por la inactivación de la enzima prolil hidroxilasa. Esta enzima pertenece a la familia de oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, un grupo de enzimas que requieren iones de hierro, oxígeno, ascorbato y α -cetoglutarato para su actividad [79,80]. Por lo que moléculas análogas al α -cetoglutarato como el EDHB funcionan como inhibidores competitivos de la enzima evitando de esta forma la hidroxilación de HIF-1 α para que no sea degradada vía proteosoma [81].

Por otro lado, también utilizamos 2-metoxiestradiol (2-ME), un metabolito del 17 β -estradiol, que se produce de forma natural en el organismo [82] y tiene baja afinidad por el receptor de estrógenos ER [83], el cual se ha observado inhibe la proliferación en distintos modelos de cáncer [84]. Adicionalmente, se ha reportado que el tratamiento de líneas celulares de cáncer de mama con 2-ME aumenta la expresión del receptor de muerte DR5 sensibilizando a las células a apoptosis y a el tratamiento con el ligando del receptor TRAIL [85], así mismo, se observo que el 2-ME induce la apoptosis de líneas celulares de cáncer de páncreas, debido a la inactivación por fosforilación de proteínas anti-

apoptóticas de la familia de Bcl-2, favoreciendo la liberación de factores pro-apoptóticos como Citocromo c [86]. Por otra parte, se ha reportado que el 2-ME inhibe la translocación nuclear de HIF-1 α evitando de que lleve a cabo la regulación de sus genes blanco [75].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El linfoma no Hodgkin (LNH) es una de las neoplasias de mayor incidencia en la población infantil. A pesar de que el tratamiento con quimioterapia resulta en un alto porcentaje de supervivencia de los pacientes, alrededor del 20% de estos desarrolla resistencia a dicho tratamiento.

En los últimos años se ha reportado la relevancia que tiene el factor de transcripción HIF-1 α en la progresión del cáncer.

La resistencia a la quimioterapia se ha asociado a la sobre expresión de proteínas como HIF-1 α y como Bcl-xL, las cuales se encuentran aumentadas en distintos tipos de neoplasias incluyendo el LNH, por lo que entender la participación de estas proteínas en la resistencia a la quimioterapia, puede ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento.

5. HIPÓTESIS

HIF-1 α modula la resistencia a la quimioterapia a través de la regulación de Bcl-xL en un modelo *in vitro* de linfoma no Hodgkin. La sobre expresión de ambas proteínas puede estar asociada a la agresividad del subtipo histológico del LNH infantil.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de HIF-1 α en la resistencia a la quimioterapia mediada por Bcl-xL.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar un modelo *in vitro* de simulación de hipoxia para inducir la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL.
- Evaluar que el aumento de HIF-1 α y Bcl-xL en una línea celular de LNH induce la resistencia a la quimioterapia.
- Evaluar que la disminución de HIF-1 α y Bcl-xL induce la quimiosensibilidad a la quimioterapia.
- Evaluar la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en un microarreglo de tejido de biopsias de pacientes infantiles con LNH, así como su asociación con el grado de agresividad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos.

El medio de cultivo RPMI advanced, el suero fetal bovino (SFB) y otros reactivos de cultivo celular fueron adquiridos de Gibco BRL (Grand Island, NY, EE.UU.). Los fármacos Etil 3,4-dihidroxibenzoato (EDHB), cisplatino (CDDP) y 2-metoxiestradiol (2-ME) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). La doxorubicina se adquirió de Lemery (México DF, México). Los anticuerpos anti-HIF-1 α y anti-Bcl-xL se obtuvieron de Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.) y Cell signaling technology (Boston, MA, EE.UU.), respectivamente. El anticuerpo anti-tubulina se obtuvo de Abcam Biochemicals (Cambridge, MA, EE.UU.) y el anticuerpo anti-actina fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.).

7.2 Línea celular y condiciones de cultivo.

Las líneas celulares de Linfoma no Hodgkin Ramos y Daudi se obtuvieron de American Type Culture Collection y se cultivaron en medio RPMI advanced, suplementado con SFB al 3%, adicionado con una solución al 1% de antibiótico y antimicótico que contiene 10,000 U/ml de penicilina G, 10 mg/ml estreptomina y 25 μ g/ml de anfotericina B.

La línea celular Rs-Rs (Ramos-Resistentes) celular se generó a partir de línea celular Ramos la cual fue tratada con una concentración de 25 μ M de EDHB por un periodo de dos meses.

7.3 Condiciones de hipoxia *in vitro*.

Los efectos del EDHB sobre la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó en las células de Ramos. Brevemente, 1×10^5 células se cultivaron en medio RPMI

advanced y se incubaron con diferentes concentraciones de EDHB (10, 25, 50 y 100 μ M) o DMSO como vehículo. El efecto del EDHB sobre las células Ramos también se evaluó con respecto al tiempo (18, 24 y 48 hrs) utilizando una concentración fija de 100 μ M de EDHB. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluado por Western Blot e inmunocitoquímica.

7.4 Transfección con RNAs de interferencia.

La inhibición específica de HIF-1 α , se realizó con un RNA de interferencia (siRNA) empleando como control un siRNA inespecífico, ambos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Brevemente, 1 x 10⁵ células Ramos se transfectaron con una concentración 30 nM del siRNA contra HIF-1 α o el siRNA control, mas 1 μ l lipofectamina 2000 invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU) en medio RPMI advanced. La mezcla (siRNA + lipofectamina 2000) se incubó 25 min. a temperatura ambiente para facilitar la formación de complejos. La mezcla resultante se añadió a las células Ramos cultivadas en una placa de 24 pozos y se incubaron por 3:30 horas a 37°C en 5% de CO₂. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determino por Western blot. Para determinar la sensibilización de las células Ramos después de la inhibición de HIF-1 α , las células transfectadas con los siRNAs contra HIF-1 α o el control se trataron con 2.5 μ g/ml de CDDP por 18 hrs, y posteriormente se evaluó el porcentaje de células en apoptosis por el ensayo de caspasa 3 activa como se describe mas adelante.

7.5 Análisis por Western Blot.

Las células Ramos tratadas y sin tratar con EDHB se lisaron con el buffer RIPA [NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, HEPES 50 mM, 1% de Nonidet P-40, 0,5% DOC y 0,1% de un cóctel de inhibidores de proteasa de Roche Diagnostics (Indianápolis, IN, EE.UU.). Los lisados celulares (20 μ g) se fraccionaron por SDS-PAGE y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente con buffer PBS adicionado con 0,05% de Tween-20 (PBS-T) y 5% de leche. Después las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios contra HIF-1 α , Bcl-xL o Tubulina en el buffer PBS-T más 3% de Albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hr. Para la detección de proteínas se utilizó el sistema de detección Luminol de Santa Cruz de Biotechnology.

El mismo procedimiento se utilizó con las células Ramos tratadas o sin tratar con diferentes concentraciones de 2-ME para inhibir la actividad de HIF-1 α (0-5, 1, 2,5, 5 y 10 μ M). Así como, su expresión con respecto al tiempo (12, 24, 48 y 72 h) cuando se empleo una concentración fija de 1 μ M de 2-ME, el DMSO se utilizó como vehículo.

7.6 Densitometría.

Las bandas correspondientes a las proteínas HIF-1 α y Bcl-xL se cuantificaron con el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) y se normalizaron con respecto al control de carga Tubulina o Actina. Los cambios en la expresión se muestran en comparación con las células no tratadas.

7.7 Inmunocitoquímica.

La expresión de HIF-1 α y de Bcl-xL se analizó en las células Ramos y en las células Rs-Rs (sin tratar, tratadas con EDHB, tratadas con 2-ME o con el vehículo DMSO) por inmunocitoquímica, utilizando el kit de LSAB (Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.). Los anticuerpos específicos se procesaron simultáneamente en un único experimento utilizando una dilución 1:1000 en PBS con suero normal de cerdo al 2% (SNC). Se utilizó un protocolo estándar de marcaje con estreptavidina-biotina para la tinción con 3-diaminobenzidina como cromógeno y hematoxilina como tinción de contraste. Por último, las laminillas se observaron bajo un microscopio óptico (Olympus BX-41) y se analizaron con el software Image-Pro Plus, Media Cybernetics (Bethesda, MD, EE.UU.)

7.8 Ensayos de apoptosis

La apoptosis se evaluó mediante el ensayo de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Brevemente, 1×10^5 células se incubaron en presencia o ausencia de 100 μ M de EDHB durante 24 h. Después, las células se lavaron para eliminar el EDHB y se trataron con CDDP durante un periodo de 18 hrs. Posteriormente, las células se tiñeron con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa conjugado a FITC de BD Pharmingen (San Diego, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El mismo procedimiento se empleó para las células tratadas con 2-ME por 24 hrs y posteriormente tratadas con CDDP por 18 hrs más.

Adicionalmente, las células de Ramos y Rs-Rs se trataron con los fármacos CDDP o doxorubicina durante 18 horas y posteriormente se tiñeron con el

anticuerpo anti-caspasa-3 activa conjugado a FITC siguiendo el mismo protocolo.

Todas las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ).

7.9 Muestras biológicas

Para este estudio se incluyeron 35 muestras de pacientes con LNH, de los cuales 12 eran de Burkitt, 8 de células grandes, 11 linfoblástico y 4 anaplásico. Los cuales fueron diagnosticados por patólogos expertos en este tipo de neoplasia del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, que fueron protocolizados por el departamento de Oncológica Pediátrica y archivados en el departamento de Patología del mismo Hospital. Se incluyeron aquellos que tuvieron mejor calidad y cantidad de tejido. Así como también aquellos que según su expediente no hayan tenido tratamiento previo.

7.10 Microarreglo de tejidos

Para la construcción del arreglo de tejidos se procedió de la siguiente manera. De cada bloque de parafina que con tejidos diferentes se realizaron cortes de 5 μm para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés. Es decir, una región que contenía exactamente la lesión representativa del subtipo histológico de linfoma. Posteriormente, se procedió a la construcción del arreglo utilizando el equipo semiautomático Advanced Tissue Arrayer (ATA 100 Chemicon) en donde una aguja calibre 0.5 mm mediante la cual se extraerán cilindros de parafina de 3 mm de altura de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm “en blanco”, delimitándose una matriz de 5 x 5

elementos. Una vez elaborada la matriz, se utilizó una aguja de calibre 0.4 mm para obtener cilindros de tejido de cada una de las muestras de tejido embebidas en parafina (bloque donador), se tomó como guía el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros que contienen el tejido, fueron implantados en el bloque en blanco que ya había sido previamente perforado (bloque receptor) y una vez completada la matriz de 360 tejidos (cada tejido por triplicado), se impregno una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el arreglo se calentó en un horno a 60 °C por 15 minutos para homogeneizar la parafina de los cilindros inyectados con la del bloque en blanco y que no quedaran huecos entre los cilindros de las muestras y el bloque receptor, los cuales pudieran causar problemas al momento de cortarlos. Finalmente, el arreglo se enfrió durante 5 minutos en hielo y se obtuvieron los cortes de 4 µm con un microtomo rotatorio.

7.11 Inmunohistoquímica y análisis de patología digital

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica en cortes de 4 µm del microarreglo de pacientes pediátricos con diferentes tipos de linfoma para HIF-1 α y Bcl-xL, previamente desparafinados. Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos, utilizando una solución de citrato de sodio al 0.01%, pH 6.0, durante 15 min en ebullición. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con una solución al 3% de H₂O₂ con metanol durante 25 minutos. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con una solución al 2% de suero normal de cerdo en PBS (PBS-SNC) durante 60 min. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con

anticuerpos contra el HIF-1 α (1:750) y Bcl-xL (1:500). Al día siguiente, las laminillas se lavaron cinco veces en PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 8 min. Después del lavado, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilados diluido 1:500 que reconoce al primero (Anti-cabra IgG o anti-Conejo 1:500), durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por una incubación con estreptavidina conjugada a HRP (LSAB de la corporación DAKO), durante 30 min a temperatura ambiente. Para desarrollar el color se utiliza 3,3' tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (DAB líquido, Corporación DAKO) de uno a cinco min. La reacción fue detenida con agua destilada y las laminillas se contra tiñeron con Hematoxilina. Finalmente, los tejidos son deshidratados y conservado con un medio Mount E-2 (Lab Shandon, Pittsburg, PA, Estados Unidos).

Las laminillas se escanearon y analizaron en un equipo de patología digitalizada (Aperio, San Diego, CA. USA). A fin de reducir la variabilidad, todas las muestras de cada grupo se procesaron al mismo tiempo en un solo experimento usando una sola alícuota de anticuerpos diluida en PBS-SNC.

Se procedió al escaneo de las laminillas para la obtención de archivos electrónicos. En donde se realizó el análisis digitalizado de la tinción de inmunohistoquímica se realizó mediante en un equipo de patología digital Aperio CS (San Diego CA. USA) en donde la densidad de la expresión (color café) en el área total del tejido (mm³) fue analizada utilizando un algoritmo para determinar densidad en pixeles, o por el conteo del número de células positivas mediante el programa incluido en el sistema de Aperio ScanScope. De los datos obtenidos se calculó la media por cada paciente y luego por grupo.

7.12 Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como los valores de la media de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de ANOVA de una vía para un nivel de significación de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 El aumento de la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en la línea celular Ramos induce resistencia a CDDP.

El EDHB es un fármaco empleado para simular condiciones de hipoxia, debido a que inhibe la actividad de la enzima prolil hidroxilasa encargada de hidroxilar a HIF-1 α , evitando de esta forma su degradación. Con base a esto, se utilizó el EDHB para inducir la acumulación de HIF-1 α en las células Ramos y ver si existía una correlación entre el aumento de este factor de transcripción y una sobre expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL.

Los datos obtenidos corroboraron que la incubación de las células de Ramos con EDHB indujo la acumulación de HIF-1 α y correlacionó con un incremento en la expresión de Bcl-xL de forma dosis dependiente después de 24 hrs de tratamiento (Figura 3).

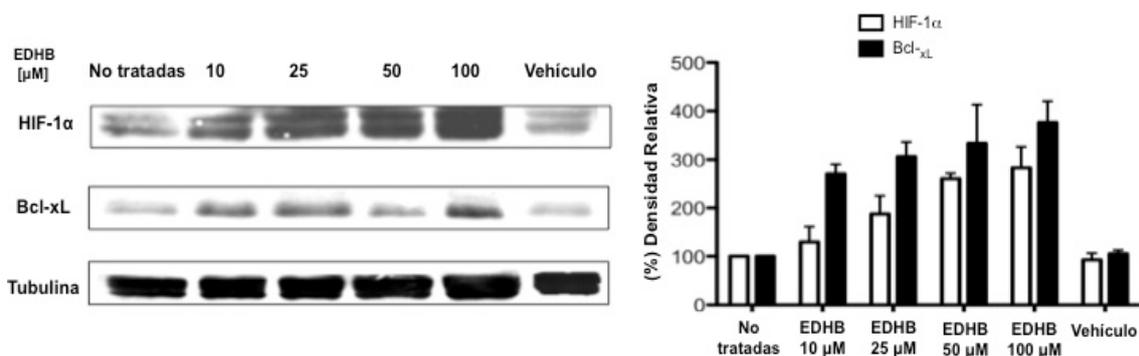


Figura 3. El EDHB induce el incremento de HIF-1 α y Bcl-xL de manera dosis dependiente en las células Ramos. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por western blot en células tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de EDHB o DMSO como vehículo. El aumento en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría normalizando con respecto al control de carga tubulina.

Así mismo, en la figura 4 se muestra que la mayor expresión de HIF-1 α se obtuvo a las 24 hrs después del tratamiento con 100 μ M de EDHB y la mayor expresión de Bcl-xL se puede apreciar a partir de las 18 hrs después del tratamiento.

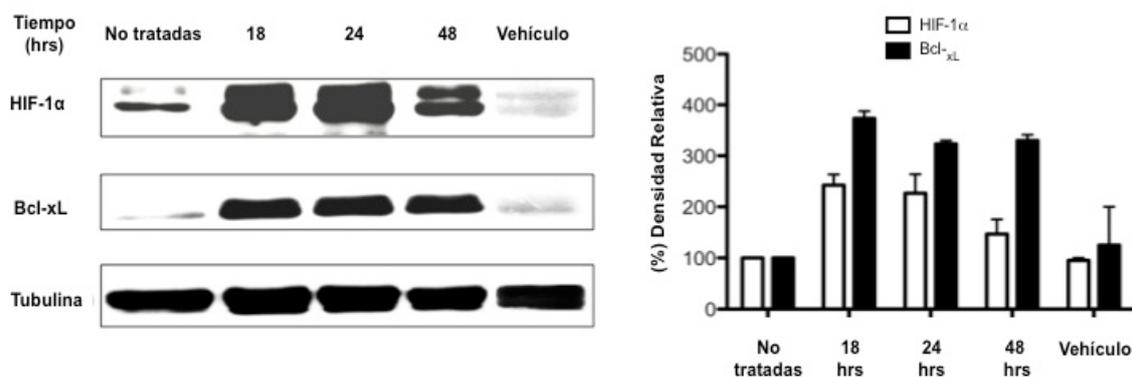


Figura 4. El EDHB induce el incremento de HIF-1 α y Bcl-xL con respecto al tiempo en las células Ramos. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por western blot en célula tratadas con una concentración de 100 μ M de EDHB por distintos periodos de tiempo, el DMSO como vehículo. El aumento en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría normalizando con respecto al control de carga tubulina.

Adicionalmente, analizamos la expresión nuclear y citoplasmática de HIF-1 α y Bcl-xL por inmunocitoquímica. Nuestros resultados muestran una mayor acumulación de HIF-1 α en el citoplasma y núcleo en las células tratadas con 100 μ M EDHB por 24 hrs en comparación con las células no tratadas o tratadas con el vehículo, en donde HIF-1 α se localiza principalmente en el citoplasma. Además, la acumulación nuclear de HIF-1 α en células Ramos tratadas con EDHB correlaciona con una mayor expresión de Bcl-xL en el citoplasma de estas células (Figura 5).

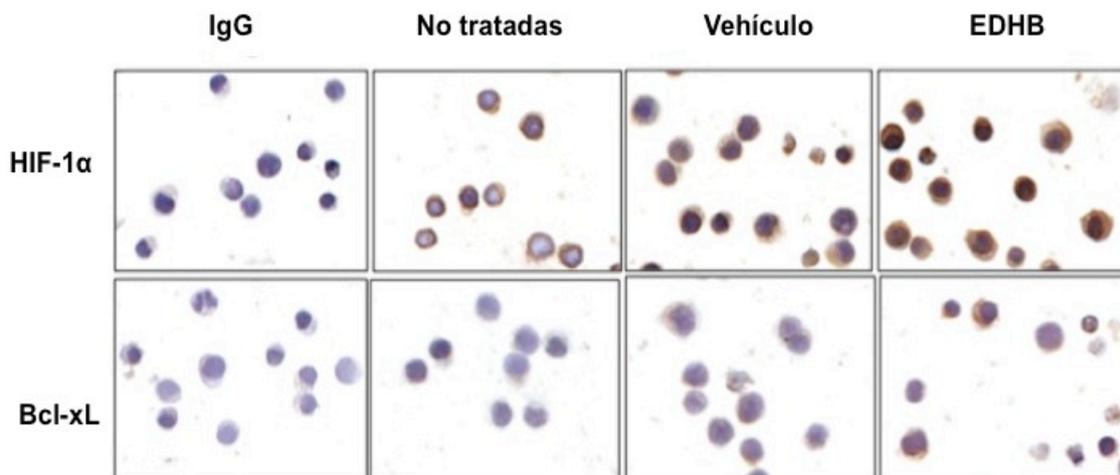


Figura 5. El aumento de la expresión HIF1 α y Bcl-xL después del tratamiento con EDHB. Se evaluó por inmunocitoquímica la expresión de ambas proteínas. Claramente se puede observar que HIF-1 α se expresa predominantemente en núcleo, aunque también a nivel citoplasma después del tratamiento con 100 μ M de EDHB por 24 hrs, en comparación con las células no tratadas o tratadas con el vehículo en donde se observa una expresión predominantemente en citoplasma. En el caso de Bcl-xL se observó un comportamiento similar en después del tratamiento con EDHB aumenta la expresión de esta proteína a nivel citoplasma en comparación con las células no tratadas o tratadas con en vehículo. Se utilizó un anticuerpo inespecífico anti-IgG como control de especificidad, en donde no se observó tinción. Magnificación 40X.

Por otro lado, una vez encontrado las condiciones en donde se observaba un aumento en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL después del tratamiento con EDHB (100 μ M por 24 h), el siguiente paso fue evaluar si el aumento de estas proteínas correlaciona con la resistencia a CDDP. Para ello, se trataron a las células Ramos con EDHB o el vehículo durante 24 hrs y posteriormente las células se expusieron al agente quimioterapéutico CDDP durante 18 hrs mas. Nuestros hallazgos muestran que las células tratadas con EDHB tienen un menor porcentaje de células positivas para caspasa-3 (células en apoptosis) activa en comparación con las células no tratadas o tratadas con el vehículo (Figura 6).

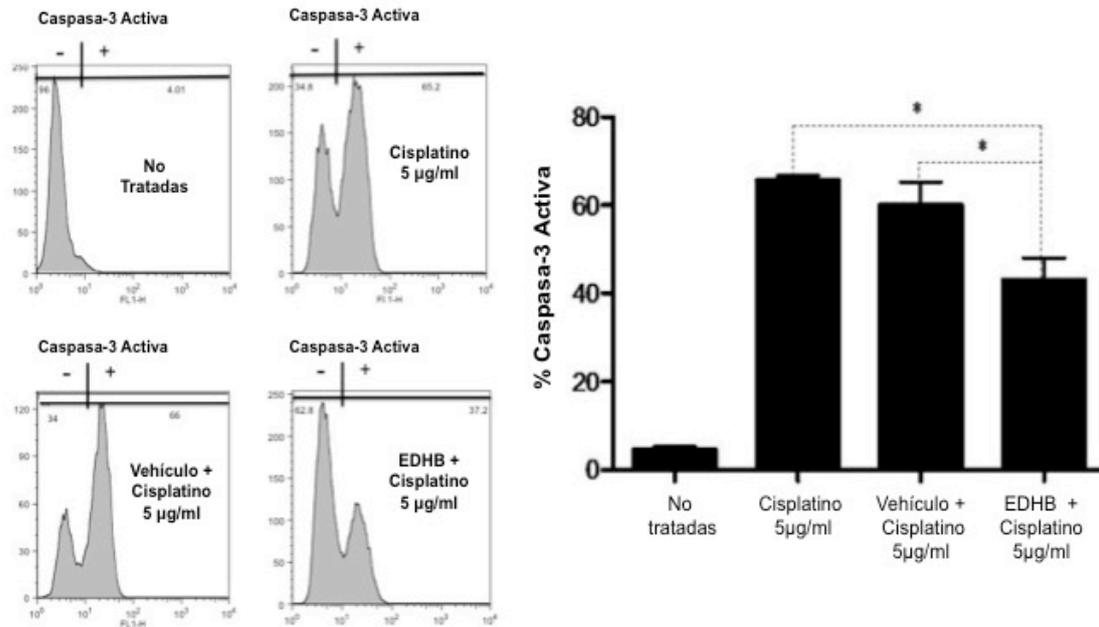


Figura 6. EDHB induce quimioresistencia en células Ramos. Las células tratadas con EDHB (100µM/24 hrs), muestra el menor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa después de la exposición al CDDP (5 µg/ml). Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que la sobre expresión de HIF-1α y Bcl-xL inducen la resistencia al CDDP en la línea celular de LNH Ramos.

8.2 El largo período de exposición a hipoxia induce un fenotipo quimio-resistencia en una línea celular de LNH.

Para mostrar que la exposición a largos periodos de hipoxia induce quimio-resistencia a través de la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL y debido a que la exposición a altas concentraciones de EDHB, así como, un tiempo prolongado a este fármaco puede inducir la muerte de las células de Ramos, lo que representa una limitación de el sistema de inducción HIF-1 α (Figura 7).

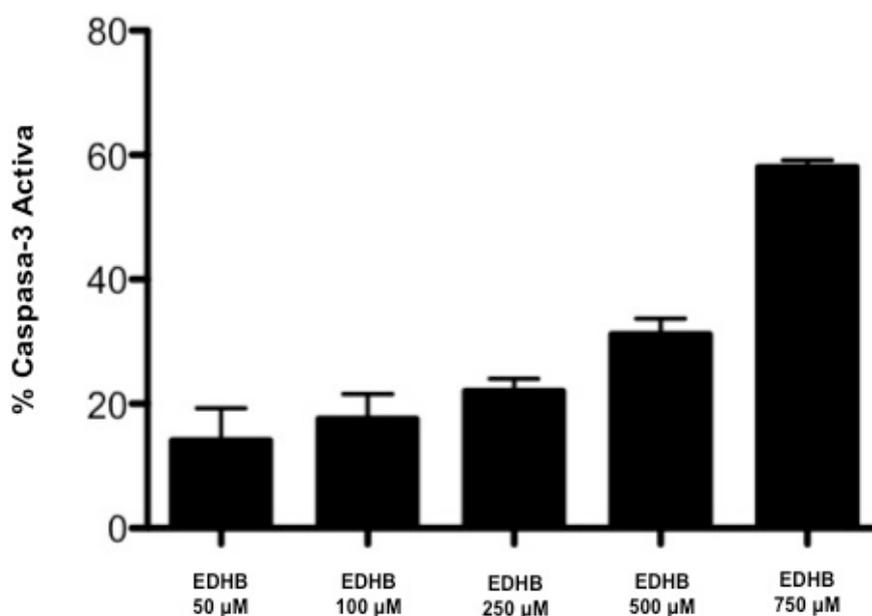


Figura 7. Altas dosis de EDHB induce a apoptosis a las células Ramos. Las células Ramos tratadas con dosis crecientes de EDHB, muestra el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa. Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Entonces evaluamos si una menor concentración de EDHB es capaz de aumentar la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL, evitando de esta forma la muerte celular. Para este propósito, se incubaron las células Ramos con 25 μM de EDHB durante un período prolongado de tiempo (dos meses). Estas células se nombraron como Rs-Rs y posteriormente evaluamos la expresión de HIF-1 α y

Bcl-xL. Nuestros resultados muestran que la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL es mayor en las células Rs-Rs en comparación con las células Ramos (figura 8).

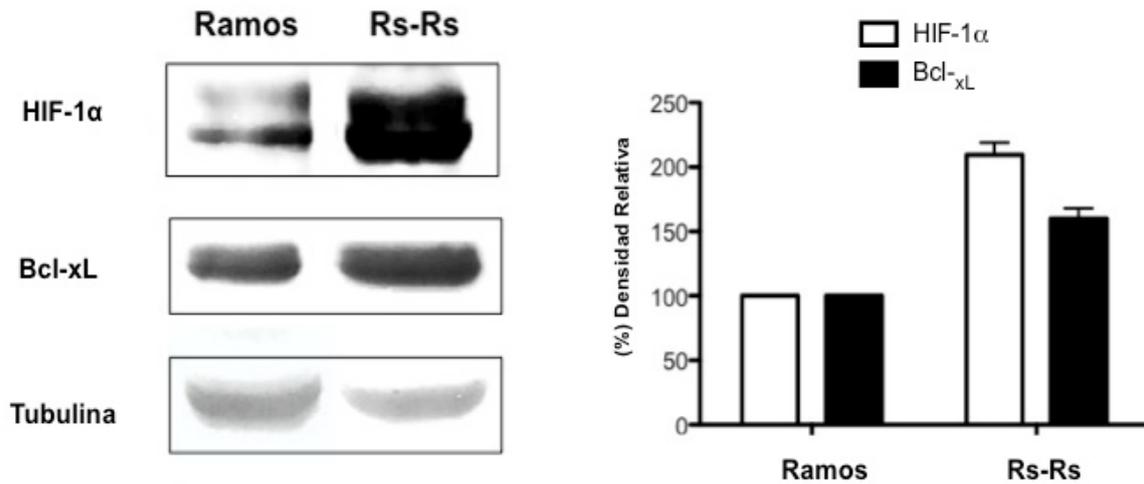


Figura 8. La exposición prolongada a condiciones de simulación de hipoxia induce la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL. La exposición prolongada a condiciones de simulación de hipoxia (2 meses) indujo el incremento en la expresión de ambas proteínas en la línea celular Ramos, la cual fue renombrada como la línea celular modificada Rs-Rs. La expresión fue evaluada por Western blot. El aumento en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría normalizando con respecto al control de carga Tubulina.

La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL también se analizó por inmunocitoquímica, como se muestra en la figura 9, HIF-1 α se localiza principalmente en el núcleo en las células Rs-Rs, mientras que en las células Ramos se encuentra en mayor proporción en el citoplasma. De igual forma, se observaron resultados similares con la expresión de Bcl-xL en donde hay una mayor expresión en las células Rs-Rs en comparación con las células Ramos (figura 9).

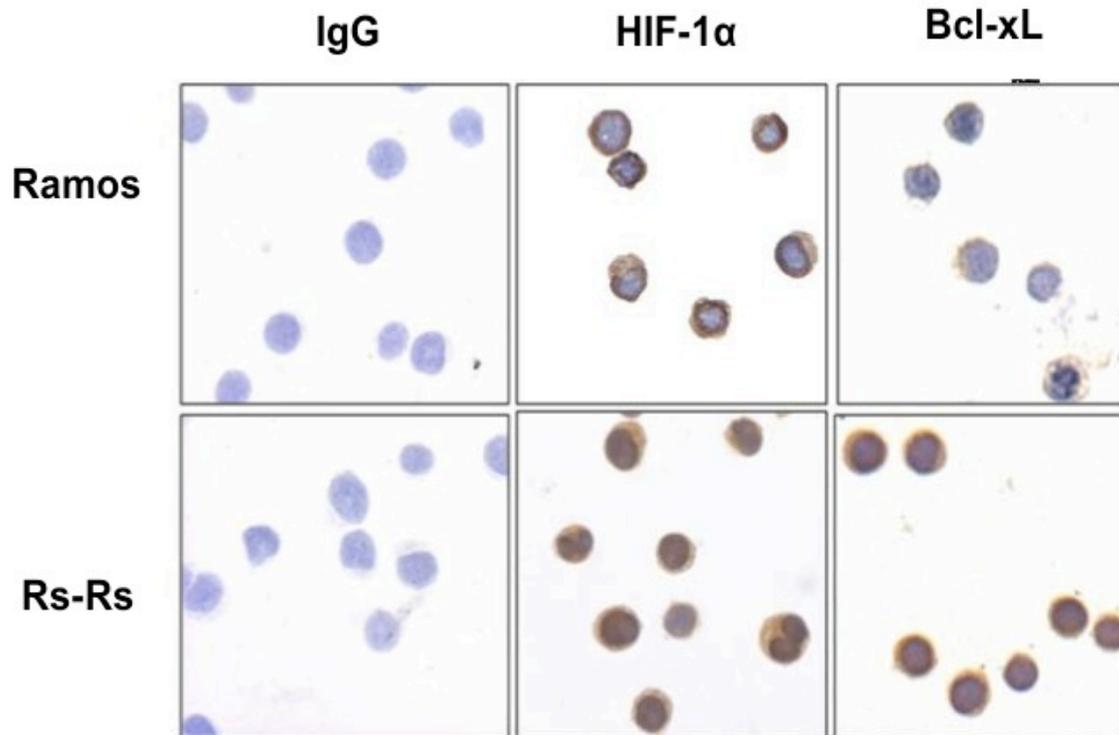


Figura 9. Aumento en la expresión HIF-1 α y Bcl-xL después de la exposición prolongada a hipoxia. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por inmunocitoquímica en las células Ramos y en las células modificadas Rs-Rs. Se puede observar que HIF-1 α se expresa predominantemente en núcleo, aunque también a nivel citoplasma en las células Rs-Rs en comparación con las células Ramos en donde se observa una expresión predominantemente en citoplasma. En el caso de Bcl-xL se observó que las células Rs-Rs tienen una mayor expresión a nivel citoplasma, en comparación de las células Ramos. Se utilizó un anticuerpo inespecífico anti-IgG como control de especificidad, en donde no se observó tinción. Magnificación 40X

Para determinar si la sobre expresión de HIF-1 α y Bcl-xL induce un fenotipo quimioresistencia, se trataron a las células Rs-Rs y a las células Ramos con dos diferentes concentraciones de CDDP (2,5 y 5 μ g/ml) por un periodo de 18 horas y posteriormente se evaluó el porcentaje de células en apoptosis mediante la determinación de células positivas para caspasa-3 activa por citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que las células Rs-Rs presentan el menor porcentaje células caspasa-3 activa positivas, en comparación con las células Ramos (figura 10).

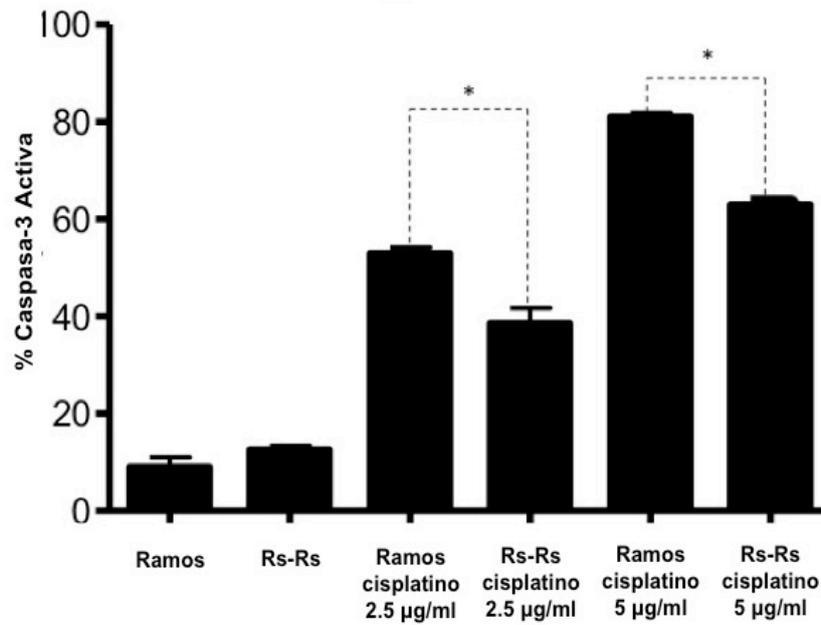


Figura 10. El incremento en HIF-1 α y Bcl-xL en las células RS-Rs inducen la resistencia al fármaco CDDP. Las células Ramos y Rs-Rs se expusieron a distintas concentraciones de CDDP (2.5 y 5 μ g/ml) por 18 hrs y posteriormente se evaluó la muerte celular, mediante un ensayo de determinación de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Las células Rs-Rs presentan el menor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células Ramos después de la exposición al CDDP. Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Esta diferencia es estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) para las dos concentraciones de CDDP probadas. Así mismo se obtuvieron resultados similares cuando las células Rs-Rs y las células Ramos se trataron con dos diferentes dosis de doxorubicina (Figura 11).

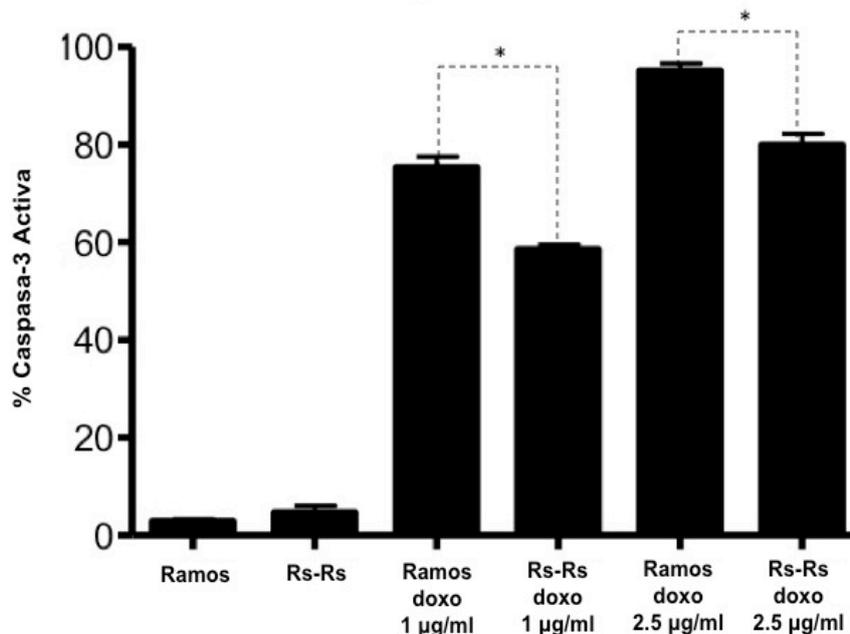


Figura 11. El incremento en HIF-1 α y Bcl-xL en las células RS-Rs inducen la resistencia al fármaco Doxorubicina. Las células Ramos y Rs-Rs se expusieron a distintas concentraciones de CDDP (1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$) por 18 hrs y posteriormente se evaluó la muerte celular, mediante un ensayo de determinación de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Las células Rs-Rs presentan el menor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células Ramos después de la exposición a la doxorubicina. Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

8.3 La inhibición de HIF-1 α y Bcl-xL sensibiliza a las líneas celulares de LNH Ramos y Daudi al efecto del CDDP.

Los datos presentados hasta el momento sugieren que un aumento en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en células de LNH induce la resistencia a fármacos empleados en la quimioterapia. Por lo tanto, es factible pensar que la inhibición de HIF-1 α a su vez correlacione con la disminución de la expresión de Bcl-xL y esto sensibilice a las células de LNH al tratamiento quimioterapéutico. Para llevar a cabo esto, se utilizó 2-metoxiestradiol (2-ME), un metabolito natural del 17- β estradiol, cuya capacidad para inhibir la actividad de HIF-1 α se ha demostrado en diferentes modelos cáncer [84]. Las células Ramos se trataron con 2-ME a diferentes concentraciones y por distintos períodos de tiempo, con el fin de disminuir la expresión de HIF-1 α y de Bcl-xL.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de las células Ramos con 2-ME disminuye la expresión de HIF-1 α en una forma dosis dependiente y esto correlaciona con la disminución de Bcl-xL (figura 12).

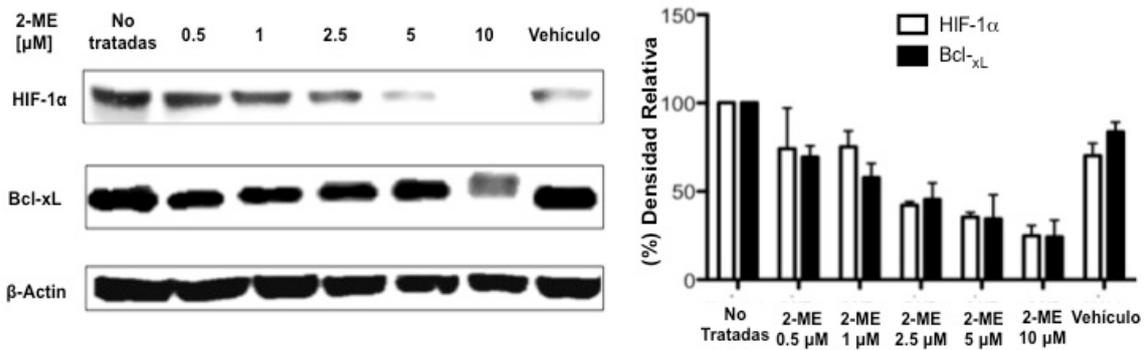


Figura 12. El 2-Metoxiestradiol induce la disminución de HIF-1 α y Bcl-xL de forma dosis dependiente en las células Ramos. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por western blot en células tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de EDHB o DMSO como vehículo. La disminución en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría normalizando con respecto al control de carga β actina.

No obstante, una alta concentración de 2-ME es capaz de inducir apoptosis en esta línea celular (figura 13).

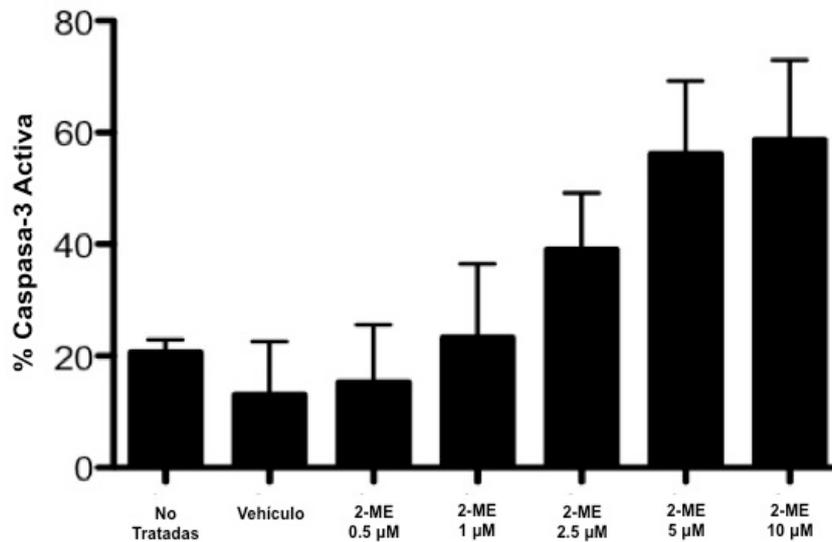


Figura 13. Altas dosis de 2-ME induce a apoptosis a las células Ramos. Las células Ramos tratadas con dosis crecientes de 2-ME, muestra el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa. Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Por otra parte, se observó una disminución de HIF-1 α y Bcl-xL entre 24 y 48 horas después de tratar las células Ramos con 1 μ M de 2-ME, pero no así en las células no tratadas o tratadas con el vehículo (Figura 14).

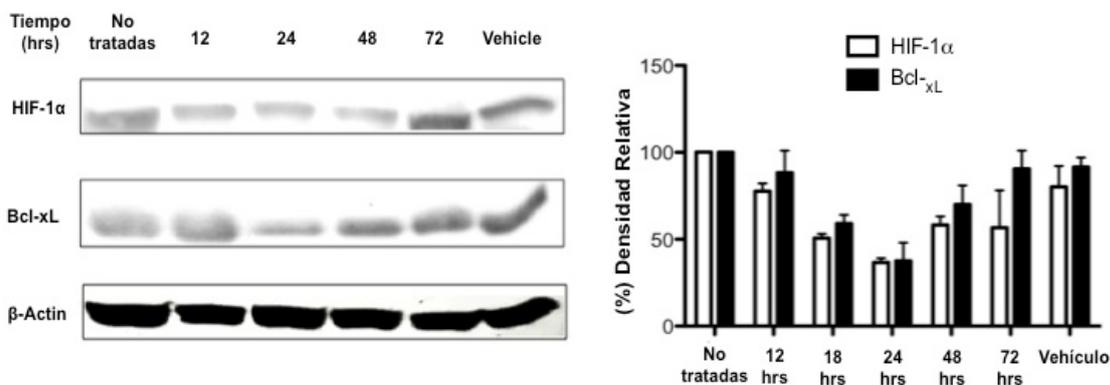


Figura 14. La disminución de HIF-1 α y Bcl-xL se mantiene por 48 horas después del tratamiento con 2-metoxiestradiol. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por western blot en célula Ramos tratadas con una concentración de 1 μ M de 2-ME a distintos periodos de tiempo, el DMSO se utilizó como vehículo. La disminución en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría, normalizando con respecto al control de carga β actina .

La disminución de HIF-1 α y Bcl-xL también fue evaluada por inmunocitoquímica (Figura 15).

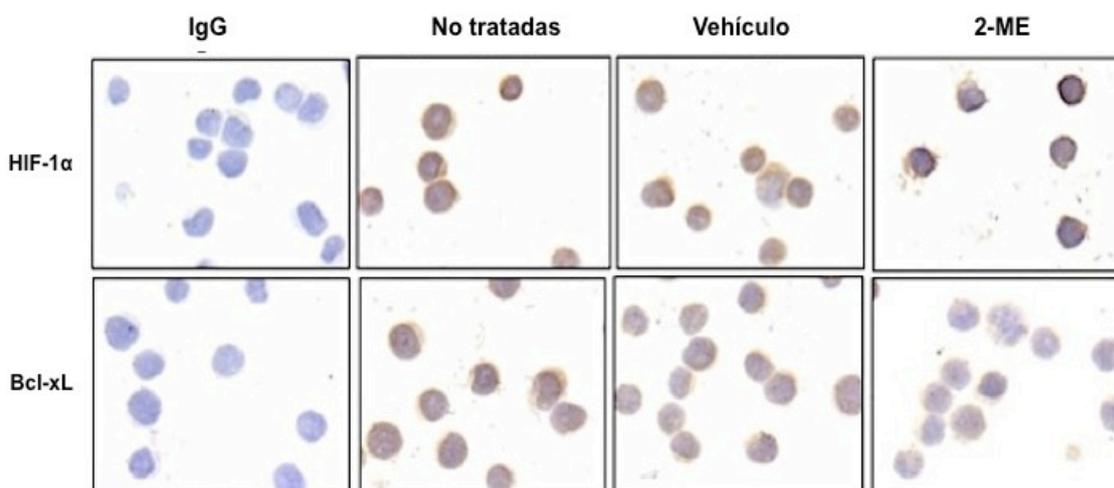


Figura 15. 2-Metoxiestradiol disminuye la expresión de HIF1 α y Bcl-xL en la línea celular de LNH Ramos. Se evaluó por inmunocitoquímica la expresión de ambas proteínas. Se puede observar una disminución en la expresión de HIF-1 α en el núcleo, así como, en el citoplasma de las células Ramos tratadas con una concentración 1 μ M 2-ME, en comparación de las células no tratadas o tratadas con el vehículo, en donde se observa una expresión de HIF-1 α en citoplasma. En el caso de Bcl-xL se observó un comportamiento similar en después del tratamiento con 2-ME en donde se observa una disminución en la expresión de esta proteína a nivel citoplasma en comparación con las células no tratadas o tratadas con en vehículo. Se utilizó un anticuerpo inespecífico anti-IgG como control de especificidad, en donde no se observó tinción. Magnificación 40X.

Finalmente, después de observar que el 2-ME disminuye la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL. El siguiente paso fue determinar si el tratamiento con 2-ME induce la sensibilización de las células a los fármacos quimioterapéuticos. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de las células Ramos con una concentración 1 μ M de 2-ME durante 24 hrs. induce el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa después de ser expuestas por 18 hrs a CDDP, esto en comparación con las células sin tratar o tratadas con el vehículo (figura 16).

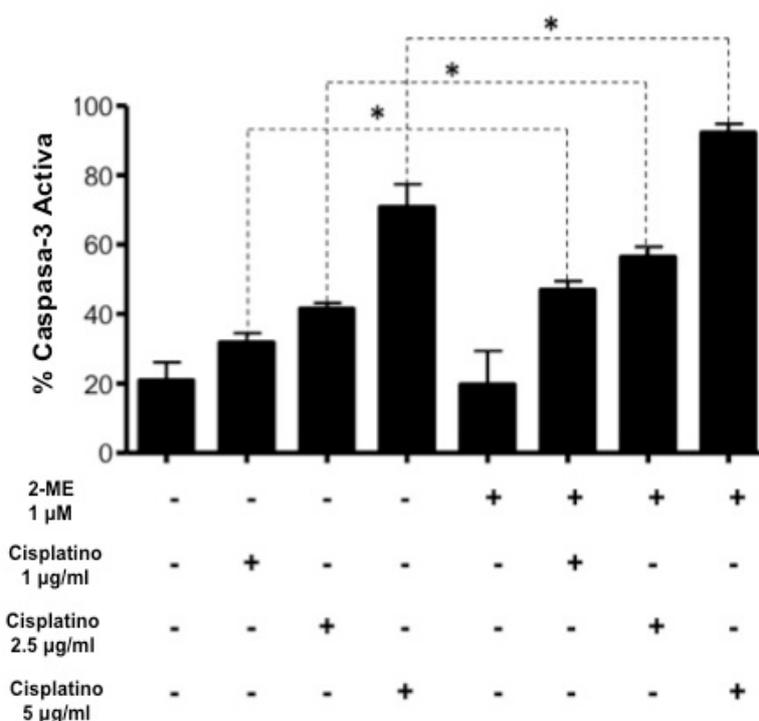


Figura 16. 2-Metoxiestradiol sensibiliza a las células Ramos al tratamiento con CDDP. Las células Ramos se trataron con una concentración 1 μ M de 2-ME por 24 hrs, seguido de la exposición por 18 hrs. a CDDP. Posteriormente se evaluó la muerte celular, mediante un ensayo de determinación de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Las células tratadas con 2-ME presentan el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células Ramos no tratadas, después de la exposición a diferentes concentraciones de CDDP (1, 2.5 y 5 μ g/ml). Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Esta diferencia es estadísticamente significativa ($*p < 0,05$) en todas las concentraciones probadas de CDDP. Así mismo, se obtuvieron resultados similares en la línea celular Daudi, en donde, el tratamiento previo con 2-ME sensibiliza a las células a la apoptosis mediada por CDDP (Figura 17).

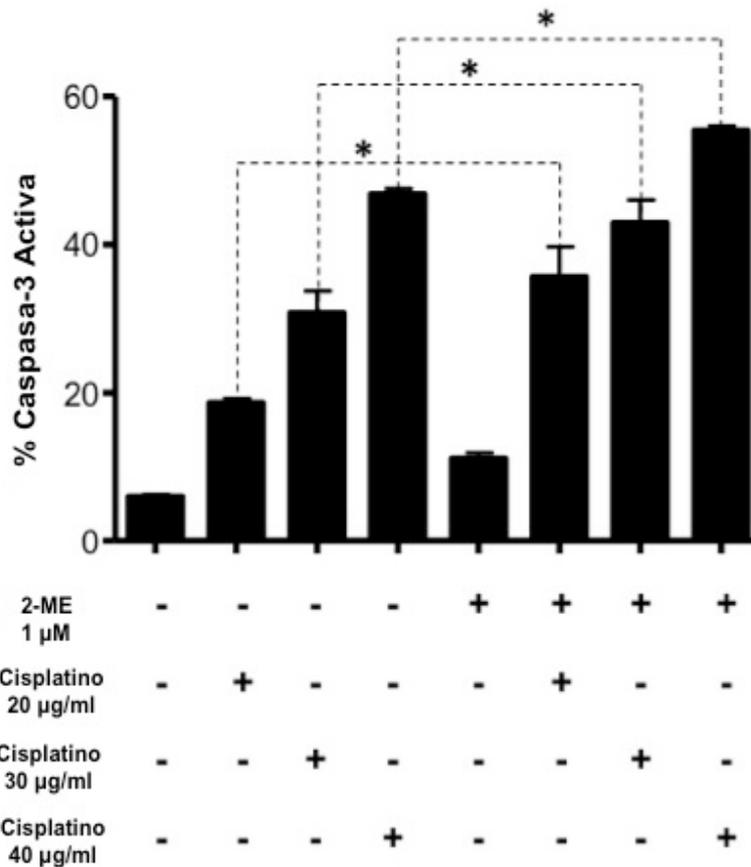


Figura 17. 2-Metoxiestradiol sensibiliza a las células Daudi al tratamiento con CDDP. Las células Daudi se trataron con una concentración 1 μ M de 2-ME por 24 hrs, seguido de la exposición por 18 hrs. a CDDP. Posteriormente se evaluó la muerte celular, mediante un ensayo de determinación de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Las células tratadas con 2-ME presentan el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células Ramos no tratadas, después de la exposición a diferentes concentraciones de CDDP (20, 30 y 40 μ g/ml). Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Para corroborar que la sensibilización de las células de LNH se debe a la inhibición de HIF-1 α , lo que a su vez, induce la disminución de Bcl-xL, se realizó la inhibición específica de HIF-1 α , a través del silenciamiento con RNAs de interferencia (siRNAs). Como se muestra en la figura 18, el tratamiento de las células Ramos con un siRNA contra HIF-1 α , no solo disminuye la expresión

de esta proteína, si no que además correlaciona con la disminución de Bcl-xL. Este efecto no fue observado en las células tratadas con un RNA de interferencia inespecífico. Así mismo, las células tratadas con el siRNA contra HIF-1 α , presentaron el mayor porcentaje de células caspasa-3 activa, al ser expuesta a 2.5 μ g/ml de cisplatino, en comparación con las células no tratadas o tratadas con el siRNA inespecífico (Figura 19).

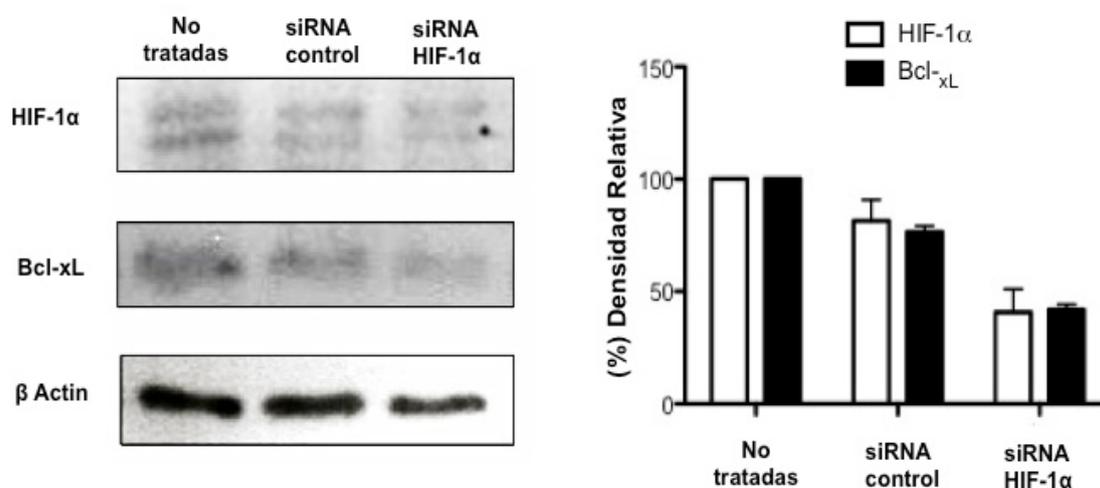


Figura 18. La inhibición de HIF-1 α con un RNA de interferencia correlaciona con la disminución de Bcl-xL. La expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se evaluó por western blot en célula Ramos transfectadas por 24 hrs con un siRNA contra HIF-1 α . La disminución en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se determinó por densitometría, normalizando con respecto al control de carga β actina.

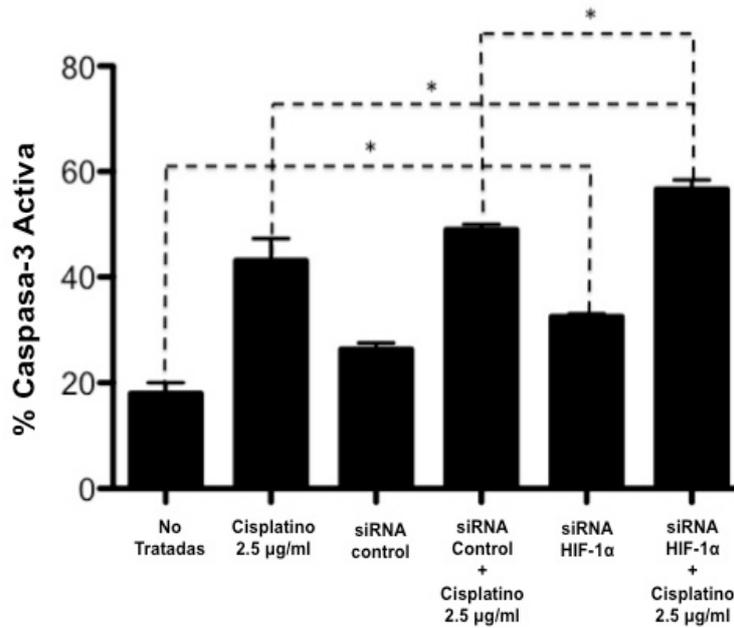


Figura 19. La inhibición de HIF-1 α con RNAs de inferencia sensibiliza las células Ramos al tratamiento con CDDP. Las células Ramos transfectadas con un siRNA contra HIF-1 α o un siRNA inespecífico por 24 hrs, se trataron 18 hrs con CDDP. Posteriormente se evaluó la muerte celular, mediante un ensayo de determinación de caspasa-3 activa por citometría de flujo. Las células transfectadas con el siRNA contra HIF-1 α presentan el mayor porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células Ramos no tratadas, después de la exposición a diferentes concentraciones de CDDP (1 y 2.5 μ g/ml). Cada columna representa el promedio y error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Estos resultados sugieren que la disminución de la expresión Bcl-xL a través de HIF-1 α induce la sensibilización a los fármacos quimioterapéuticos en las células de Linfoma no Hodgkin.

8.4. La sobreexpresión de HIF-1 α y Bcl-xL se presenta en los subtipos histológicos más agresivos de LNH

Con el propósito de corroborar nuestros estudios *in vitro*, analizamos la expresión de las proteínas HIF-1 α y Bcl-xL, en un microarreglo de tejidos de pacientes con LNH con diferentes grados de agresividad. La tecnología de microarreglo de tejidos ofrece la ventaja de disminuir la variabilidad entre muestras ya que nos permite analizar de manera simultánea una gran cantidad de muestras. Utilizando esta tecnología se realizó la tinción para HIF-1 α y Bcl-xL en un microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes pediátricos con LNH en el que se incluyeron muestras de linfoma de Burkitt (LB), linfoma linfoblástico (LL), linfoma de células grandes de B (LCGB) y linfoma de células grandes anaplásicas (LCGA). En la figura 20, se muestra la microfotografía representativa de la expresión de HIF-1 α (a y c) y Bcl-xL (b y d) en un pacientes con LB, un subtipo histológico de LNH poco agresivo (a y b) y en un paciente con LCGA, un subtipo histológico muy agresivo (c y d), así mismo, se pudo observar una mayor expresión nuclear de HIF-1 α en los subtipos más agresivos de linfoma (LCGB y LCAG) en comparación de los subtipos menos agresivos (LB y LL), siendo en estos últimos subtipos de linfoma donde se observo menor expresión citoplasmática de Bc-xL, mientras que en los subtipos más agresivos se observo una mayor expresión de esta proteína lo que sugiere una relación entre la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL. La expresión de ambas proteínas se cuantificó con patología digital utilizando un equipo Scanscope de Aperio, el cual homogeniza la densidad de expresión al utilizar un algoritmo para determinar la densidad en pixeles, obteniendo valores mas exactos de la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en el tejido. En la figura 21, se

muestra que los subtipos histológicos más agresivos de linfoma presentan una mayor expresión tanto de HIF-1 α como de Bcl-xL en comparación con los subtipos menos agresivos (Linfoma anaplásico). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p= 0001$ para el caso de HIF-1 α y $p= 001$ para el caso de Bcl-xL).

Los resultados anteriores demuestran que la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL se encuentran sobreexpresados en los LNH con mayor grado de agresividad, lo cual es consistente con nuestros estudios in vitro.

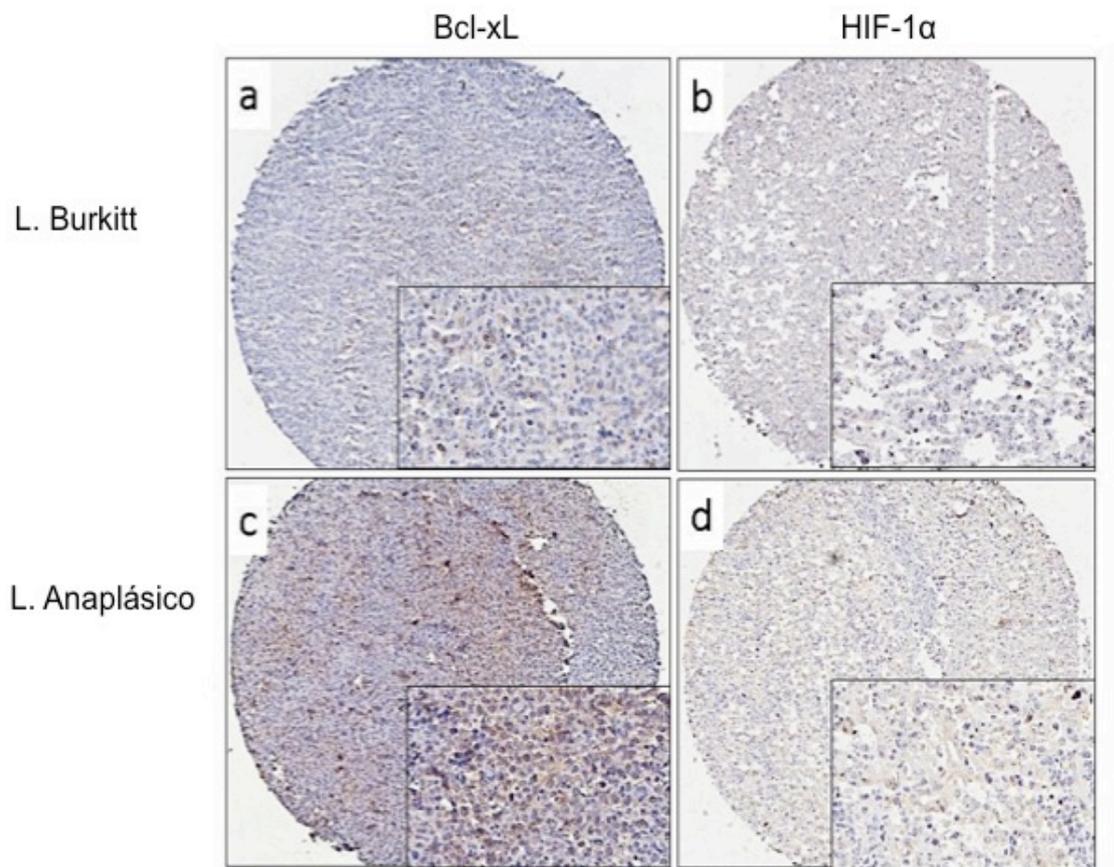


Figura 20. HIF-1 α y Bcl-xL se encuentran mayormente expresados en el linfoma de células anaplásicas. Se evaluó la expresión de ambas proteínas en un microarreglo de tejido de pacientes con linfoma no Hodgkin mediante inmunohistoquímica. Se observa claramente una menor expresión de ambas proteínas en el linfoma de Burkitt (de menor agresividad), en comparación con el linfoma anaplásico (subtipo mas agresivo). Magnificación 20X (insertado 40X).

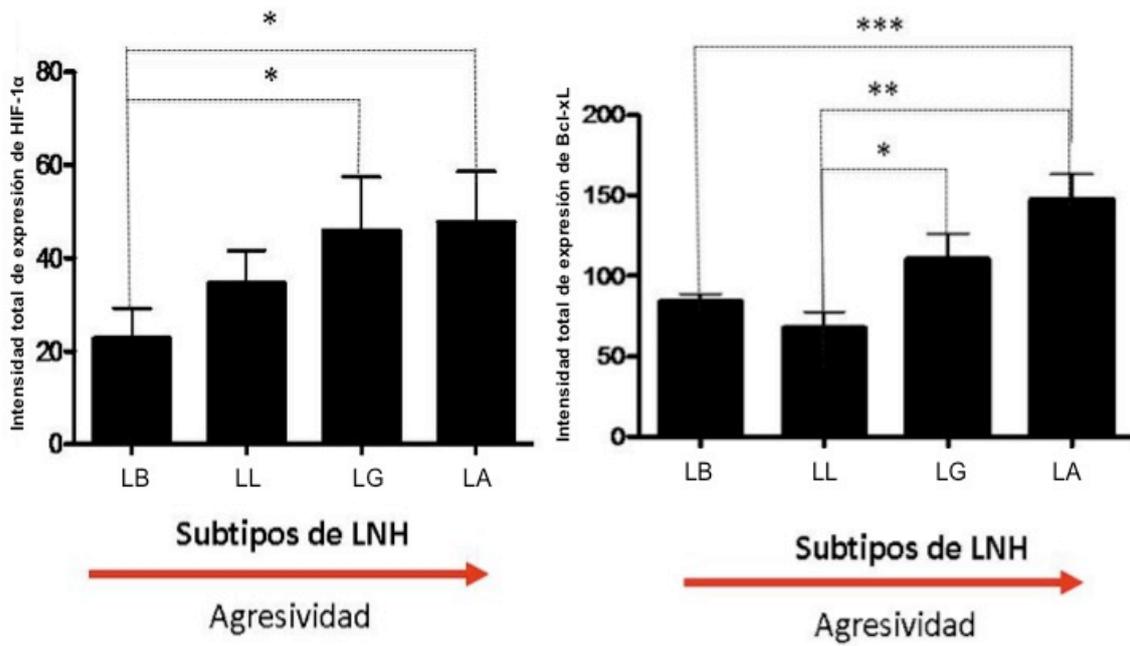


Figura 21. Los subtipos más agresivos de linfoma no Hodgkin tienen la mayor expresión de las proteínas HIF-1α y Bcl-xL. Se encontró la expresión de HIF-1α y Bcl-xL mas elevada en los subtipos mas agresivos de linfoma no Hodgkin (Linfoma de células Grandes y Linfoma de células anaplásicas). La cuantificaron se realizó por patología digital.

8.5 Expresión de otras proteínas miembros de la familia de Bcl-2.

Debido a que se ha reportado que HIF-1 α también regula a otros miembros de la familia de Bcl-2 como Mcl-1 de forma positiva [87], decidimos evaluar si la expresión de esta proteína se veía alterada después de inducir el aumento de HIF-1 α con EDHB o de inhibir su actividad con 2-ME. Como se puede observar en la figura el tratamiento de las células Ramos con 2-ME disminuye la expresión de Mcl-1, sin embargo, el tratamiento con EDHB no aumenta su expresión a diferencia de Bcl-xL que incrementa considerablemente (figura 22). Así mismo evaluamos la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax la cual se ha reportado que es regulada de forma negativa en condiciones de hipoxia [88], no obstante, no observamos una disminución considerable de Bax después de tratar a las células Ramos con EDHB, pero se observó una pequeña disminución después del tratamiento con 2-ME (figura 22).

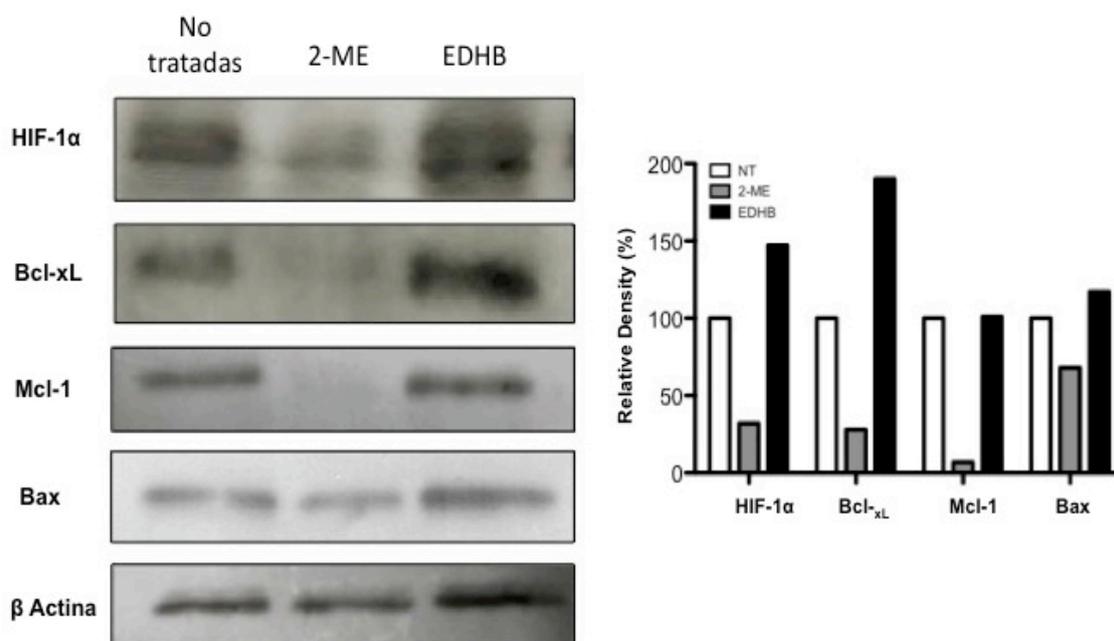


Figura 22. Expresión de proteínas miembros de la familia de Bcl-2 después del tratamiento con EDHB ó 2-ME. La expresión de HIF-1 α , Bcl-xL, Mcl-1 y Bax se evaluaron por western blot después del tratamiento por 24 hrs con 1 μ M de 2-ME ó 100 μ M de EDHB. La variación en la expresión de estas proteínas se determinó por densitometría normalizando con respecto al control de carga β actina.

9. DISCUSIÓN

La quimioresistencia es el principal obstáculo para una quimioterapia efectiva en muchos tipos de cáncer, incluyendo el linfoma no Hodgkin, lo que confiere un mal pronóstico para el paciente. A la fecha se han propuesto diferentes mecanismos que podrían estar participando en la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia [24]. Uno de estos mecanismos es la alteración de las vías que están involucrados en la muerte celular programada (apoptosis), como la familia de proteínas de Bcl-2 [89]. La proteína anti-apoptótica Bcl-xL pertenece a esta familia y su sobreexpresión se ha asociado a la resistencia a múltiples fármacos en diversos tipos de cáncer [40,41,90]. Mientras que su inhibición resulta en la sensibilización de las células tumorales a la apoptosis [46,48].

La proteína Bcl-xL es regulada transcripcionalmente por diferentes factores de transcripción como NF- κ B [54]. Vega y cols. [17], mostraron que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal humanizado Rituximab, que reconoce a las moléculas de CD20 sobre la superficie de las células B, disminuye la expresión de Bcl-xL a través de la inhibición de NF- κ B y por lo tanto sensibiliza a la célula tumoral a apoptosis. Así mismo, se ha reportado que NF- κ B, puede inducir la expresión de HIF-1 α en líneas celulares de LNH y promover de esta forma la resistencia a la radioterapia [91]. Por otro lado, Evens y cols. [92] reportaron que HIF-1 α se expresa de forma estable en diferentes líneas celulares de LNH y también en el tejido de biopsias de pacientes con linfoma difuso de células grandes de B (LDCGB). Este grupo también observó que la expresión de HIF-1 α se correlaciona con una mejor tasa de supervivencia en pacientes con LDCGB tratados con el esquema de Rituximab mas los agentes quimioterapéuticos: ciclofosfamida, doxorubicina, oncovin y prednisona (R-

CHOP) en comparación con los pacientes que sólo recibieron el esquema CHOP como tratamiento [12]. Sin embargo, este incremento en la tasa de supervivencia de los pacientes podría estar asociada con el efecto de Rituximab sobre la activación de NF- κ B, más que a la actividad de HIF-1 α , el cual se ha implicado en la resistencia a la quimioterapia en distintos modelos de cáncer, además de que se ha mostrado que también regula de forma transcripcional a Bcl-xL [42].

En el presente estudio se evaluó el papel de HIF-1 α en la quimioresistencia a través de la regulación positiva de la expresión de Bcl-xL en células de LNH. Nuestros hallazgos muestran que HIF-1 α se encuentra principalmente en el citoplasma de las células Ramos, sin embargo, la simulación de hipoxia a través de la modulación farmacológica induce la acumulación y translocación de HIF-1 α a el núcleo y este aumento correlaciona con la sobreexpresión de Bcl-xL, así como, una mayor resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Además, se observó que la alta expresión de HIF-1 α induce apoptosis en las células tumorales lo que es consistente con otros reportes, en donde se ha mostrado que la hipoxia severa (anoxia) induce apoptosis a través de la estabilización de HIF-1 α con la proteína p53 [93].

En contraste, Graeber y cols, [94] reportaron que la hipoxia promueve la resistencia de las células tumorales a la apoptosis. Con base a esto, nos dimos a la tarea de modificar a la línea celular Ramos, esto al exponerla a bajas concentraciones de EDHB durante un período largo de tiempo con el fin de hacerlas resistentes a condiciones de hipoxia. Adicionalmente, se observó que esta línea celular modificada no sólo era resistente a la hipoxia, si no también

aumento su resistencia a los fármacos CDDP y doxorubicina, dos medicamentos comúnmente utilizados en la clínica. Esta resistencia podría estar asociada a la sobre expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, que se ha asociado a la resistencia a la radio y la quimioterapia [40,41,95].

Cabe señalar que aunque no se ha demostrado que existe un ambiente hipóxico importante en el caso de los LNH, debido a que no se trata de un tumor sólido como tal, se ha reportado que HIF-1 α también puede ser activado en condiciones de inflamación por una vía denominada independiente de hipoxia, en donde participan quimiocinas como TNF- α e IL-1 β [96,97], Así mismo, se ha reportado que el óxido nítrico, el cual es producido por las células de linfoma [98], puede llevar a cabo la estabilización de la subunidad HIF-1, así como su activación con lo que podría llevar a cabo la regulación de sus genes blanco, incluyendo la resistencia a la quimioterapia [99].

Por otro lado, si la acumulación de HIF-1 α induce un fenotipo de quimioresistencia, entonces, la inhibición de este factor de transcripción podría conducir a la sensibilización de las células de LNH a la quimioterapia. Para este fin, se utilizó 2-ME que ha mostrado tener actividad antitumoral a través de diferentes mecanismos, siendo la desregulación de HIF-1 α , uno de ellos [75]. Adicionalmente, el 2-ME se ha utilizado en diferentes modelos de cáncer y actualmente se están probando en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de próstata, mama y de ovario [84]. Además, Park y cols., [100] reportaron que el 2-ME inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de una manera dosis-dependiente en líneas celulares de LNH. Nosotros encontramos un comportamiento similar en las células Ramos después del tratamiento con 2-ME. Sin embargo, nuestro principal hallazgo fue que el tratamiento con 2-ME

seguido de la exposición a CDDP, induce un mayor porcentaje de células a apoptosis, en comparación con las células tratadas solo con el fármaco. Esto podría estar asociado a una disminución en la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en las células Ramos, ya que al inhibir específicamente a HIF-1 α con un RNA de interferencia, también se observó una disminución de Bcl-xL y la sensibilización de las células al CDDP como cuando se trataron con 2-ME.

A la fecha se ha observado que 2-ME puede tener distintos efectos sobre la célula tumoral como es la inhibición de la proliferación en distintas líneas celulares de cáncer [84], la inhibición de la angiogénesis [75], inducción de apoptosis por la vía extrínseca al aumentar la expresión de receptores de muerte como DR5 [85] ó inducción de la vía intrínseca de la apoptosis a través de la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 [86].

Aunque, en este trabajo no nos centramos en el efecto del 2-ME sobre otros miembros de la familia de Bcl-2. Se ha reportado que la línea celular Ramos es deficiente en la expresión de Bcl-2 [101,102]. Sin embargo, otros reportes, han mostrado que el 2-ME induce la fosforilación de Bcl-2 provocando su inactivación y la inducción de apoptosis en un modelo de cáncer de próstata [103,104]. Además, se ha reportado que el 2-ME aumenta la relación entre los RNAs mensajeros de Bax/Bcl-2 en células de carcinoma cervical lo que podría estar asociada con una mayor apoptosis [105].

Por otra parte, se ha reportado que el factor de transcripción HIF-1 α , regula de forma transcripcional a la proteína Mcl-1 [87]. Adicional a esto Gao y cols., [106] mostraron que el 2-ME inhibe la expresión de Mcl-1 a través de la inactivación de la vía de Akt, la cual también se encarga de regular la expresión de HIF-1 α [107]. De acuerdo a lo reportado por Gao y cols., [106] nosotros

también observamos disminución en la expresión de Mcl-1 después de tratar las células Ramos con 2-ME, sin embargo, el tratamiento de las células con EDHB no aumento la expresión de Mcl-1 a diferencia de Bcl-xL en donde si se observó un incremento considerable. Estos datos sugerirían que la regulación de Mcl-1 por HIF-1 α pueden estar asociado a la vía de Akt mas que al microambiente hipóxico propio del tumor, tal como lo han mostrado otros autores [108,109].

No obstante, aquí mostramos que el 2-ME disminuye la expresión de Bcl-xL y esto podría deberse a la inhibición de HIF-1 α , teniendo como resultado la sensibilización de las células tumorales de LNH a la quimioterapia.

Por ultimo, se ha reportado que HIF-1 α y Bcl-xL se encuentran sobre expresado en varios tipos de cáncer, incluyendo el linfoma [40,41,44,45,75,78] en donde se han asociado a diferentes procesos que favorecen el desarrollo del tumor, incluyendo resistencia a fármacos [40,41,76]. Los resultados obtenidos en este trabajo en biopsias de pacientes pediátricos con LNH muestran que HIF-1 α y Bcl-xL se encuentran sobre expresados en los subtipos de LNH con mayor grado de agresividad, lo cual es consistente con los estudios ya mencionados, y además es consistente con nuestros estudios *in vitro* en donde mostramos que HIF-1 α participa de manera importante en la quimioresistencia, mediante la regulación de la expresión de Bcl-xL, y que esta regulación puede tener un efecto biológico importante en los pacientes con LNH. Aunque se ha reportado la sobreexpresión de HIF-1 α [12] y de Bcl-xL [44] en pacientes adultos con LNH. A la fecha no existen reportes de la expresión de estas proteínas en la población infantil. Así mismo, no existen reportes en

donde se haga una asociación entre estas dos proteínas en biopsias de pacientes con LNH en población adulta e infantil.

Finalmente, el uso de la tecnología de microarreglo de tejidos y patología digital nos permitió realizar un análisis detallado de la expresión de HIF-1 α y Bcl-xL en biopsias de pacientes infantiles con LNH, apoyando de esta manera la posible asociación que existe entre estas proteínas y la resistencia a la quimioterapia como los sugieren nuestros resultados *in vitro*.

Este es el primer reporte que examina el papel de HIF-1 α en la quimioresistencia a través de la sobreexpresión de Bcl-xL en el linfoma no Hodgkin (ver modelo propuesto en la figura 23). Los datos aquí presentados, exponen la necesidad de diseñar nuevas estrategias para el tratamiento por quimioterapia, en el que la inhibición de las proteínas que inducen la resistencia a los fármacos como es el caso de HIF-1 α y Bcl-xL puede ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento. Además, apoya la propuesta de que estas dos proteínas podrían utilizarse como marcadores pronóstico y/o blancos terapéuticos en linfoma no Hodgkin.

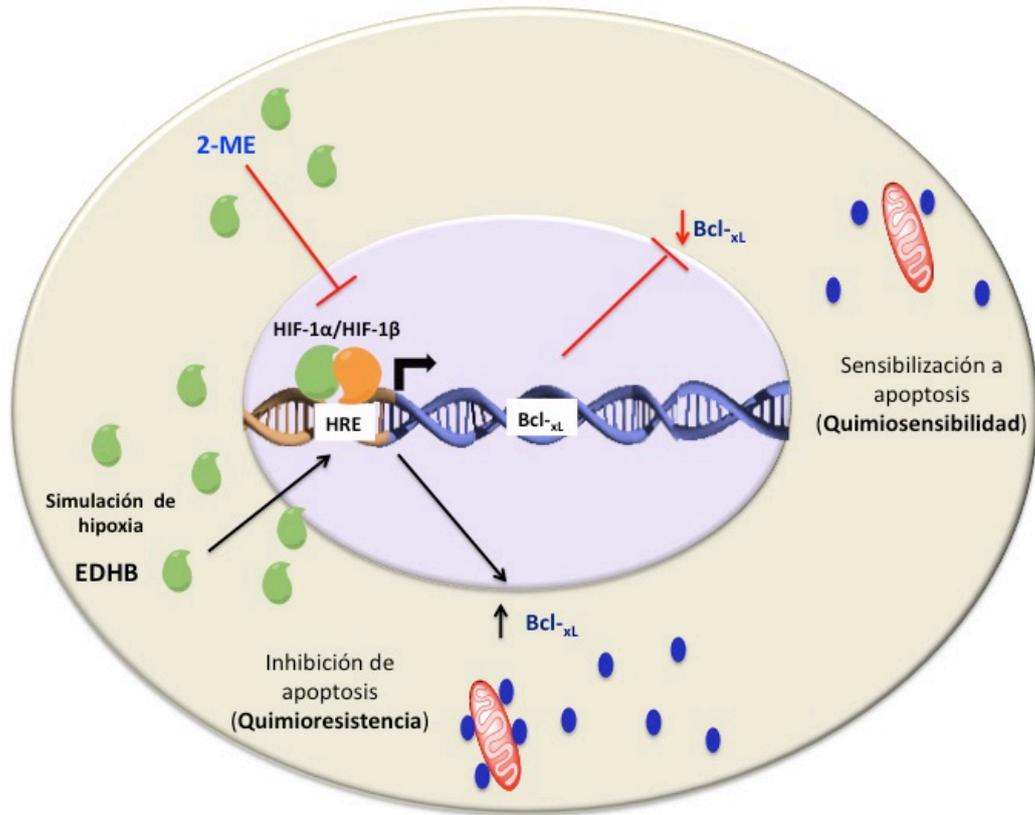


Figura 23. Modelo propuesto. El microambiente hipóxico induce la resistencia a la quimioterapia a través del aumento del factor de transcripción HIF-1 α el cual induce la sobreexpresión de Bcl-xL bloqueando la actividad de proteínas pro-apoptóticas como Bax, teniendo como consecuencia la resistencia a la quimioterapia en células de linfoma no Hodgkin.

10. CONCLUSIONES

- ✓ El ambiente hipóxico juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos.
- ✓ En este trabajo mostramos por primera vez la participación de HIF-1 α en el desarrollo de la resistencia en LNH.
- ✓ HIF-1 α induce un fenotipo de resistencia a la quimioterapia en células de LNH a través de la regulación de Bcl-xL.
- ✓ Nuestros datos sugieren una asociación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y Bcl-xL con la agresividad del subtipo de LNH.

11. REFERENCIAS

- [1] I. GLOBOCAN, Section of Cancer Information (17/6/2011).
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>,
2011.,
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>,
2011.
- [2] <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>, (2008).
- [3] <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../ni%C3%B1o0.doc>,
(2010).
- [4] CENSIA,
<http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/vinculacion/sintesis1.html>.
- [5] A. Reiter, Diagnosis and treatment of childhood non-hodgkin lymphoma,
Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2007) 285-296.
- [6] V. Garcia-Vidrios, Actualidades en linfomas y mielomas, Gaceta Médica de
México 138 (2002) S106-S117.
- [7] K.R. Shankland, J.O. Armitage, B.W. Hancock, Non-Hodgkin lymphoma, Lancet
380 (2012) 848-857.
- [8] <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/LinfomanoHodgkin/Guiadetallada/linfoma-no-hodgkin-what-is-types-of-non-hodgkin-lymphoma2>.
- [9] <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/LinfomanoHodgkinenninos/Guiadetallada/linfoma-no-hodgkin-en-ninos-what-is-key-statistics>.
- [10] J. Hochberg, I.M. Waxman, K.M. Kelly, E. Morris, M.S. Cairo, Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science, Br J Haematol 144 (2009) 24-40.
- [11] J.T. Sandlund, C.H. Pui, H. Mahmoud, Y. Zhou, E. Lowe, S. Kaste, L.E. Kun, M.J. Krasin, M. Onciu, F.G. Behm, R.C. Ribeiro, B.I. Razzouk, S.C. Howard, M.L. Metzger, G.A. Hale, R. Rencher, K. Graham, M.M. Hudson, Efficacy of high-dose methotrexate, ifosfamide, etoposide and dexamethasone salvage therapy for recurrent or refractory childhood malignant lymphoma, Ann Oncol 22 (2011) 468-471.
- [12] A.M. Evens, L.H. Sehn, P. Farinha, B.P. Nelson, A. Raji, Y. Lu, A. Brakman, V. Parimi, J.N. Winter, P.T. Schumacker, R.D. Gascoyne, L.I. Gordon, Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP, J Clin Oncol 28 (2010) 1017-1024.
- [13] H. Tanaka, S. Hashimoto, D. Abe, S. Sakai, T. Takagi, Double-hit lymphoma at second relapse of Burkitt-like lymphoma: a case report, J Clin Exp Hematop 51 (2011) 43-47.
- [14] S.M. Smith, J. Anastasi, K.S. Cohen, L.A. Godley, The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma, Blood Cells Mol Dis 45 (2010) 317-323.
- [15] S. Hasselblom, U. Hansson, M. Olsson, L. Toren, A. Bergstrom, H. Nilsson-Ehle, P.O. Andersson, High immunohistochemical expression of p-AKT predicts inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy, Br J Haematol 149 (2010) 560-568.

- [16] R.A. Clynes, T.L. Towers, L.G. Presta, J.V. Ravetch, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets, *Nat Med* 6 (2000) 443-446.
- [17] M.I. Vega, A.R. Jazirehi, S. Huerta-Yepez, B. Bonavida, Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively, *J Immunol* 175 (2005) 2174-2183.
- [18] D. Attias, S. Weitzman, The efficacy of rituximab in high-grade pediatric B-cell lymphoma/leukemia: a review of available evidence, *Curr Opin Pediatr* 20 (2008) 17-22.
- [19] J. Boye, T. Elter, A. Engert, An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, *Ann Oncol* 14 (2003) 520-535.
- [20] C. Kosmas, K. Stamatopoulos, N. Stavroyianni, N. Tsavaris, T. Papadaki, Anti-CD20-based therapy of B cell lymphoma: state of the art, *Leukemia* 16 (2002) 2004-2015.
- [21] S. Akbayram, M. Dogan, C. Akgun, F. Erbey, H. Caksen, A.F. Oner, Use of rituximab in three children with relapsed/refractory Burkitt lymphoma, *Target Oncol* 5 (2010) 291-294.
- [22] T. Ban, Pleiotropic, multidrug-resistant phenotype and P-glycoprotein: a review, *Chemotherapy* 38 (1992) 191-196.
- [23] Y.A. Luqmani, Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy, *Med Princ Pract* 14 Suppl 1 (2005) 35-48.
- [24] A.A. Stavrovskaya, Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells, *Biochemistry (Mosc)* 65 (2000) 95-106.
- [25] M.A. Ghanem, T.H. Van der Kwast, J.C. Den Hollander, M.K. Sudaryo, M.M. Van den Heuvel, M.A. Noordzij, R.J. Nijman, E.H. Soliman, G.J. van Steenbrugge, The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma, *Br J Cancer* 85 (2001) 1557-1563.
- [26] J. Williams, P.C. Lucas, K.A. Griffith, M. Choi, S. Fogoros, Y.Y. Hu, J.R. Liu, Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease, *Gynecol Oncol* 96 (2005) 287-295.
- [27] E. Schmitt, G. Cimoli, A. Steyaert, R. Bertrand, Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities, *Exp Cell Res* 240 (1998) 107-121.
- [28] T. Noutomi, H. Chiba, M. Itoh, H. Toyota, J. Mizuguchi, Bcl-x(L) confers multi-drug resistance in several squamous cell carcinoma cell lines, *Oral Oncol* 38 (2002) 41-48.
- [29] J. Skommer, T. Brittain, S. Raychaudhuri, Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death, *Apoptosis* 15 (2010) 1223-1233.
- [30] R.W. Johnstone, A.A. Ruefli, S.W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell* 108 (2002) 153-164.
- [31] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol* 35 (2007) 495-516.
- [32] M. Gyrd-Hansen, P. Meier, IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer, *Nat Rev Cancer* 10 (2010) 561-574.
- [33] J.E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, D.R. Green, The BCL-2 family reunion, *Mol Cell* 37 (2010) 299-310.

- [34] A.G. Letai, Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis, *Nat Rev Cancer* 8 (2008) 121-132.
- [35] E.H. Cheng, M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, S.J. Korsmeyer, BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis, *Mol Cell* 8 (2001) 705-711.
- [36] G. Hacker, A. Weber, BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?, *Arch Biochem Biophys* 462 (2007) 150-155.
- [37] T. Miyashita, J.C. Reed, Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line, *Blood* 81 (1993) 151-157.
- [38] A. Bonetti, M. Zaninelli, R. Leone, G.L. Cetto, G. Pelosi, S. Biolo, A. Menghi, E. Manfrin, F. Bonetti, Q. Piubello, bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer, *Clin Cancer Res* 4 (1998) 2331-2336.
- [39] E. Wesarg, S. Hoffarth, R. Wiewrodt, M. Kroll, S. Biesterfeld, C. Huber, M. Schuler, Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer, *Int J Cancer* 121 (2007) 2387-2394.
- [40] I. Lebedeva, R. Rando, J. Ojwang, P. Cossum, C.A. Stein, Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity, *Cancer Res* 60 (2000) 6052-6060.
- [41] M. Villedieu, M.H. Louis, S. Dutoit, E. Brotin, H. Lincet, F. Duigou, C. Staedel, P. Gauduchon, L. Poulain, Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells, *Gynecol Oncol* 105 (2007) 31-44.
- [42] N. Chen, X. Chen, R. Huang, H. Zeng, J. Gong, W. Meng, Y. Lu, F. Zhao, L. Wang, Q. Zhou, BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}, *J Biol Chem* 284 (2009) 10004-10012.
- [43] F. Habens, A.S. Lapham, C.L. Dallman, B.M. Pickering, J. Michels, E.G. Marcusson, P.W. Johnson, G. Packham, Distinct promoters mediate constitutive and inducible Bcl-XL expression in malignant lymphocytes, *Oncogene* 26 (2007) 1910-1919.
- [44] R. Soltani-Arabshahi, C. Leboeuf, J. Rivet, H. Pisonero, W.L. Zhao, H. Bachelez, J.C. Ameisen, A. Janin, Bcl-xL gene expression correlated with lower apoptotic cell numbers and shorter progression-free survival in PCFCL, *J Invest Dermatol* 129 (2009) 1703-1709.
- [45] W.L. Zhao, M.E. Daneshpouy, N. Mounier, J. Briere, C. Leboeuf, L.F. Plassa, E. Turpin, J.M. Cayuela, J.C. Ameisen, C. Gisselbrecht, A. Janin, Prognostic significance of bcl-xL gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma, *Blood* 103 (2004) 695-697.
- [46] R. Wang, F. Lin, X. Wang, P. Gao, K. Dong, S.H. Wei, S.Y. Cheng, H.Z. Zhang, Suppression of Bcl-xL expression by a novel tumor-specific RNA interference system inhibits proliferation and enhances radiosensitivity in prostatic carcinoma cells, *Cancer Chemother Pharmacol* 61 (2008) 943-952.
- [47] E.P. Holinger, T. Chittenden, R.J. Lutz, Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases, *J Biol Chem* 274 (1999) 13298-13304.
- [48] A.A. Arnold, A. Aboukameel, J. Chen, D. Yang, S. Wang, A. Al-Katib, R.M. Mohammad, Preclinical studies of Apogossypolone: a new nonpeptidic pan

- small-molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 proteins in Follicular Small Cleaved Cell Lymphoma model, *Mol Cancer* 7 (2008) 20.
- [49] Y. Fujio, K. Kunisada, H. Hirota, K. Yamauchi-Takahara, T. Kishimoto, Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes, *J Clin Invest* 99 (1997) 2898-2905.
- [50] T. Gregory, C. Yu, A. Ma, S.H. Orkin, G.A. Blobel, M.J. Weiss, GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression, *Blood* 94 (1999) 87-96.
- [51] C.M. Margue, M. Bernasconi, F.G. Barr, B.W. Schafer, Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR, *Oncogene* 19 (2000) 2921-2929.
- [52] L. Sevilla, C. Aperlo, V. Dulic, J.C. Chambard, C. Boutonnet, O. Pasquier, P. Pognonec, K.E. Boulukos, The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism, *Mol Cell Biol* 19 (1999) 2624-2634.
- [53] K.L. Sugars, V. Budhram-Mahadeo, G. Packham, D.S. Latchman, A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53, *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 4530-4540.
- [54] C. Chen, L.C. Edelstein, C. Gelinas, The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L), *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2687-2695.
- [55] J.P. Piret, D. Mottet, M. Raes, C. Michiels, Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?, *Biochem Pharmacol* 64 (2002) 889-892.
- [56] A. Chetta, A. Zanini, O. Torre, D. Olivieri, Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation, *Inflamm Allergy Drug Targets* 6 (2007) 41-45.
- [57] C.G. Lee, H. Link, P. Baluk, R.J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M.J. Kang, L. Cohn, Y.K. Kim, D.M. McDonald, J.A. Elias, Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung, *Nat Med* 10 (2004) 1095-1103.
- [58] M.E. Rothenberg, VEGF obstructs the lungs, *Nat Med* 10 (2004) 1041-1042.
- [59] G. Hopfl, O. Ogunshola, M. Gassmann, HIFs and tumors--causes and consequences, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 (2004) R608-623.
- [60] J.S. Isaacs, Y.J. Jung, D.R. Mole, S. Lee, C. Torres-Cabala, Y.L. Chung, M. Merino, J. Trepel, B. Zbar, J. Toro, P.J. Ratcliffe, W.M. Linehan, L. Neckers, HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability, *Cancer Cell* 8 (2005) 143-153.
- [61] G.L. Semenza, Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis, *Hematol Oncol Clin North Am* 8 (1994) 863-884.
- [62] G.L. Semenza, Hypoxia and cancer, *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) 223-224.
- [63] N.V. Iyer, S.W. Leung, G.L. Semenza, The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation, *Genomics* 52 (1998) 159-165.
- [64] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology, *Trends Mol Med* 7 (2001) 345-350.

- [65] P.J. Kallio, K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka, L. Poellinger, Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha, *EMBO J* 17 (1998) 6573-6586.
- [66] J. Gu, J. Milligan, L.E. Huang, Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine, *J Biol Chem* 276 (2001) 3550-3554.
- [67] K.R. Kozak, B. Abbott, O. Hankinson, ARNT-deficient mice and placental differentiation, *Dev Biol* 191 (1997) 297-305.
- [68] N. Masson, P.J. Ratcliffe, HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels, *J Cell Sci* 116 (2003) 3041-3049.
- [69] N.J. Beasley, R. Leek, M. Alam, H. Turley, G.J. Cox, K. Gatter, P. Millard, S. Fuggle, A.L. Harris, Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients, *Cancer Res* 62 (2002) 2493-2497.
- [70] P. Birner, M. Schindl, A. Obermair, C. Plank, G. Breitenecker, G. Oberhuber, Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer, *Cancer Res* 60 (2000) 4693-4696.
- [71] P. Birner, M. Schindl, A. Obermair, G. Breitenecker, G. Oberhuber, Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy, *Clin Cancer Res* 7 (2001) 1661-1668.
- [72] C. Blancher, J.W. Moore, K.L. Talks, S. Houlbrook, A.L. Harris, Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines, *Cancer Res* 60 (2000) 7106-7113.
- [73] R. Bos, H. Zhong, C.F. Hanrahan, E.C. Mommers, G.L. Semenza, H.M. Pinedo, M.D. Abeloff, J.W. Simons, P.J. van Diest, E. van der Wall, Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis, *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 309-314.
- [74] A. Giatromanolaki, M.I. Koukourakis, E. Sivridis, H. Turley, K. Talks, F. Pezzella, K.C. Gatter, A.L. Harris, Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival, *Br J Cancer* 85 (2001) 881-890.
- [75] N.J. Mabeesh, D. Escuin, T.M. LaVallee, V.S. Pribluda, G.M. Swartz, M.S. Johnson, M.T. Willard, H. Zhong, J.W. Simons, P. Giannakakou, 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF, *Cancer Cell* 3 (2003) 363-375.
- [76] N. Rohwer, T. Cramer, Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways, *Drug Resist Updat* 14 (2011) 191-201.
- [77] G.L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 721-732.
- [78] A. Giatromanolaki, M.I. Koukourakis, F. Pezzella, E. Sivridis, H. Turley, A.L. Harris, K.C. Gatter, Phosphorylated VEGFR2/KDR receptors are widely expressed in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation, *Hematol Oncol* 26 (2008) 219-224.

- [79] T. Sasaki, K. Majamaa, J. Uitto, Reduction of collagen production in keloid fibroblast cultures by ethyl-3,4-dihydroxybenzoate. Inhibition of prolyl hydroxylase activity as a mechanism of action, *J Biol Chem* 262 (1987) 9397-9403.
- [80] C.J. Schofield, Z. Zhang, Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes, *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999) 722-731.
- [81] B. Li, K. Takeda, S. Yokoyama, S. Shibahara, A prolyl-hydroxylase inhibitor, ethyl-3,4-dihydroxybenzoate, induces haem oxygenase-1 expression in human cells through a mechanism independent of hypoxia-inducible factor-1 α , *J Biochem* 144 (2008) 643-654.
- [82] D. Berg, R. Sonsalla, E. Kuss, Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an 125I-labelled ligand, *Acta Endocrinol (Copenh)* 103 (1983) 282-288.
- [83] T.M. LaVallee, X.H. Zhan, C.J. Herbstritt, E.C. Kough, S.J. Green, V.S. Pribluda, 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta, *Cancer Res* 62 (2002) 3691-3697.
- [84] A.O. Mueck, H. Seeger, 2-Methoxyestradiol--biology and mechanism of action, *Steroids* 75 (2010) 625-631.
- [85] T.M. LaVallee, X.H. Zhan, M.S. Johnson, C.J. Herbstritt, G. Swartz, M.S. Williams, W.A. Hembrough, S.J. Green, V.S. Pribluda, 2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway, *Cancer Res* 63 (2003) 468-475.
- [86] S. Qanungo, A. Basu, M. Das, S. Halder, 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells, *Oncogene* 21 (2002) 4149-4157.
- [87] J.P. Piret, E. Minet, J.P. Cosse, N. Ninane, C. Debacq, M. Raes, C. Michiels, Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis, *J Biol Chem* 280 (2005) 9336-9344.
- [88] J.T. Erler, C.J. Cawthorne, K.J. Williams, M. Koritzinsky, B.G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I.J. Stratford, C. Dive, Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance, *Mol Cell Biol* 24 (2004) 2875-2889.
- [89] G. Lessene, P.E. Czabotar, P.M. Colman, BCL-2 family antagonists for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* 7 (2008) 989-1000.
- [90] S.A. Amundson, T.G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J.C. Reed, A.J. Fornace, Jr., An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines, *Cancer Res* 60 (2000) 6101-6110.
- [91] Q. Qiao, Y. Nozaki, K. Sakoe, N. Komatsu, K. Kirito, NF-kappaB mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma, *Exp Hematol* 38 (2010) 1199-1208.
- [92] A.M. Evens, P.T. Schumacker, I.B. Helenowski, A.T. Singh, D. Dokic, A. Keswani, E. Kordeluk, A. Raji, J.N. Winter, B.D. Jovanovic, A. Holmgren, B.P. Nelson, L.I. Gordon, Hypoxia inducible factor-alpha activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family, *Br J Haematol* 141 (2008) 676-680.

- [93] H. Suzuki, A. Tomida, T. Tsuruo, Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia, *Oncogene* 20 (2001) 5779-5788.
- [94] T.G. Graeber, C. Osmanian, T. Jacks, D.E. Housman, C.J. Koch, S.W. Lowe, A.J. Giaccia, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours, *Nature* 379 (1996) 88-91.
- [95] S.S. Park, M.A. Kim, Y.W. Eom, K.S. Choi, Bcl-xL blocks high dose doxorubicin-induced apoptosis but not low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe, *Biochem Biophys Res Commun* 363 (2007) 1044-1049.
- [96] T. Hellwig-Burgel, K. Rutkowski, E. Metzgen, J. Fandrey, W. Jelkmann, Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1, *Blood* 94 (1999) 1561-1567.
- [97] N. Dehne, B. Brune, HIF-1 in the inflammatory microenvironment, *Exp Cell Res* 315 (2009) 1791-1797.
- [98] E. Atik, M. Ergin, S. Erdogan, I. Tuncer, Inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human B cell lymphomas, *Mol Cell Biochem* 290 (2006) 205-209.
- [99] B. Brune, J. Zhou, Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling, *Cardiovasc Res* 75 (2007) 275-282.
- [100] J. Park, R.S. Franco, J.J. Augsburger, R.K. Banerjee, Comparison of 2-methoxyestradiol and methotrexate effects on non-Hodgkin's B-cell lymphoma, *Curr Eye Res* 32 (2007) 659-667.
- [101] A.R. Jazirehi, M.I. Vega, D. Chatterjee, L. Goodglick, B. Bonavida, Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab, *Cancer Res* 64 (2004) 7117-7126.
- [102] D. Shan, J.A. Ledbetter, O.W. Press, Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells, *Cancer Immunol Immunother* 48 (2000) 673-683.
- [103] H. Attalla, J.A. Westberg, L.C. Andersson, H. Adlercreutz, T.P. Makela, 2-Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation, *Biochem Biophys Res Commun* 247 (1998) 616-619.
- [104] S. Bu, A. Blaukat, X. Fu, N.E. Heldin, M. Landstrom, Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells, *FEBS Lett* 531 (2002) 141-151.
- [105] A. Joubert, C. Maritz, F. Joubert, Bax/Bcl-2 expression levels of 2-methoxyestradiol-exposed esophageal cancer cells, *Biomed Res* 26 (2005) 131-134.
- [106] N. Gao, M. Rahmani, P. Dent, S. Grant, 2-Methoxyestradiol-induced apoptosis in human leukemia cells proceeds through a reactive oxygen species and Akt-dependent process, *Oncogene* 24 (2005) 3797-3809.
- [107] H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M.M. Georgescu, J.W. Simons, G.L. Semenza, Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res* 60 (2000) 1541-1545.
- [108] S. Iqbal, S. Zhang, A. Driss, Z.R. Liu, H.R. Kim, Y. Wang, C. Ritenour, H.E. Zhau, O. Kucuk, L.W. Chung, D. Wu, PDGF upregulates Mcl-1 through activation of

beta-catenin and HIF-1alpha-dependent signaling in human prostate cancer cells, PLoS One 7 (2012) e30764.

- [109] K.B. Lee, H.J. Byun, S.H. Park, C.Y. Park, S.H. Lee, S.B. Rho, CYR61 controls p53 and NF-kappaB expression through PI3K/Akt/mTOR pathways in carboplatin-induced ovarian cancer cells, Cancer Lett 315 (2012) 86-95.