



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel que juegan los factores inducibles por hipoxia HIF-2 α y HIF-3 α
en el fenotipo maligno de células de melanoma humano.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

ANDREA SÁNCHEZ COLLADO

TUTORA PRINCIPAL

DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Ciudad Universitaria, CD. MX. Mayo, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: **“Papel que juegan los factores inducibles por hipoxia HIF-2a y HIF-3a en el fenotipo maligno de células de melanoma humano.”**

que presenté para obtener el grado de ----Maestría----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente



**Andrea Sánchez Collado
523015161**

DEDICATORIA

A mi mamá, quien ha sido mi guía incondicional.

A mi papá, quien ha cuidado de nuestra familia en todo momento.

A mi hermana, quien me recuerda día a día lo hermosa que es la vida.

A Jul, por su apoyo y amor incondicional.

A mis amigos, por convertirse en mi familia.

A mi abuela, por ser mi mejor amiga.

A mi abuelo, por ser mi estrella.

Y al universo, por permitirme estar aquí y hacer lo que me llena de vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de su historia.

A la Facultad de Medicina de la UNAM, por convertirse en mi segundo hogar.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, por poner en mi camino a formadores de excelencia.

A mi tutora, la Dra. Martha Robles Flores, por su confianza y apoyo en todo momento.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Marina Macías Silva y el Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por sus recomendaciones y apoyo a lo largo de mi proyecto.

A la Dra. Cristina Castañeda Patlán, por su paciencia, calidad humana, e invaluable apoyo en el desarrollo de mi proyecto.

A mis amigos de laboratorio, por su invaluable apoyo.

Al CONAHCYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Índice

Abreviaturas.....	7
1. Resumen.....	8
2. Marco Teórico.....	9
2.1 Cáncer.....	9
2.2 Bases Moleculares del Cáncer	9
2.3 Epidemiología del Cáncer.....	10
2.4 Melanoma.....	11
2.5 Factores de transcripción inducibles por hipoxia	12
2.5.1 Factores de transcripción inducibles por hipoxia en cáncer	15
3. Planteamiento del problema	16
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos	17
5.1 Objetivo General	17
5.2 Objetivos Particulares.....	17
6. Materiales y Métodos	17
6.1 Materiales y Reactivos.....	17
6.1.1 Cultivo Celular.....	17
6.1.2 Western Blot.....	18
7. Metodología	18
7.1 Cultivo Celular.....	18
7.2 Tratamiento de Hipoxia	18
7.3 Lisado Celular y Cuantificación de Proteína	19
7.4 SDS-Page/Western Blot	19
7.5 Bloqueo y análisis de expresión de HIF-2 α y HIF-3 α	20
7.6 Ensayo de Cierre de Herida	20
7.7 Ensayo de Formación de Colonias	21
7.8 Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	21
8. Resultados	21
8.1 HIF-2 α se encuentra sobre-expresado en células malignas de melanoma humano	21
8.2 El bloqueo de HIF-2 α y HIF-3 α por método de transducción lentiviral resulta en una disminución considerable, aunque no completa, de su expresión.	24
8.3 El bloqueo HIF-2 α disminuye la viabilidad celular de melanocitos malignos de forma basal y los sensibiliza aún más al tratamiento con inductor de apoptosis (H ₂ O ₂).	26

8.4 El bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α resulta en una disminución en la proliferación celular y en la capacidad clonogénica de células de melanoma	28
8.5 El bloqueo HIF-2 α y HIF-3 α resulta en una disminución en la capacidad migratoria de células de melanoma	29
9. Discusión	30
10. Conclusión	34
11. Referencias.....	35

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HIF	Factor inducible por hipoxia
MC	Melanoma Cutáneo
MT	Microambiente Tumoral
UV	Ultravioleta

1. Resumen

La hipoxia es un componente característico del microambiente tumoral. Uno de los principales sensores de cambios en la concentración de oxígeno en las células son los factores transcripcionales inducibles por hipoxia, HIFs, los cuales son mediadores esenciales de las rutas de señalización sensibles a oxígeno que regulan múltiples fases de la tumorigénesis tales como la reprogramación metabólica tumoral, inducción de angiogénesis, resistencia a apoptosis, invasión y metástasis. El papel preponderante que juegan en la biología del cáncer se ha establecido claramente para los factores HIF-1 α y HIF-2 α , pero el de HIF-3 α apenas empieza a ser estudiado.

El cáncer de piel del tipo melanoma se origina en las células productoras de pigmento o melanocitos y se caracteriza por ser el tipo de cáncer de piel más letal que existe ya que tiene una alta incidencia de metástasis comparado con otros tipos de cáncer de piel. Una característica de la dermis es el ambiente fisiológico de hipoxia en el que se encuentra, lo que resulta en que las células de la piel estén constantemente expuestas a concentraciones bajas de oxígeno y se promueva el desarrollo de melanoma. Estas características ambientales pueden inducir algunas de las funciones que tienen los HIFs en células normales, así como en células transformadas. En el caso del melanoma, solo se ha demostrado ampliamente el papel preponderante que juega HIF-1 α en la supervivencia, promoción de invasión, metástasis, y generación de resistencia a tratamiento, pero se conoce poco del papel que juega HIF-2 α en estos procesos, y hasta ahora no se ha investigado el papel que juega HIF-3 α .

El objetivo de este estudio es determinar el papel que desempeñan los factores inducibles por hipoxia 2 α y 3 α (HIF-2 α y HIF-3 α), principalmente investigando su participación en distintos aspectos característicos del fenotipo maligno, como la viabilidad celular, la proliferación celular, la apoptosis, la migración e invasividad celular y la inducción de metástasis.

2. Marco Teórico

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la rápida y descontrolada proliferación de células alteradas por mutaciones genéticas. Se han propuesto características principales para distinguir a esta familia de enfermedades, conocidos como los *Hallmarks* del cáncer, entre los cuales incluye señalización proliferativa constitutivamente activa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a apoptosis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, y activación de invasión a otros tejidos (1). La transformación maligna de una célula depende de la adquisición sucesiva de estas características, y las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo en un proceso conocido como metástasis. Hoy en día, el cáncer representa la segunda causa de muerte a nivel mundial, resultando en aproximadamente 10 millones de muertes anuales (INEGI). Los tratamientos principales incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia y la eficiencia de estos depende de la etapa en la que se encuentre el tumor, así como las características del tumor. El cáncer se considera tratable siempre y cuando se detecte en etapas tempranas, pero tiende a ser letal cuando la etapa es más avanzada. Siendo que el cáncer raramente presenta síntomas hasta que está en una etapa avanzada, es necesario desarrollar tratamientos y métodos de diagnóstico que ayuden a abordar este problema.

2.2 Bases Moleculares del Cáncer

El cáncer es una enfermedad en donde las células acumulan y retienen mutaciones genéticas que alteran la expresión de genes y afectan el funcionamiento de diversas vías de señalización celular. Las mutaciones pueden ocurrir en oncogenes como lo son *MYC* y *KRAS*, genes supresores de tumores como *TP53*, o en componentes de diferentes vías de señalización como la vía de mTOR (2–5). Aunque el cáncer se caracteriza principalmente por alteraciones genéticas, se ha observado que las alteraciones epigenéticas pueden influir en la incidencia y desarrollo de un tumor.

Los oncogenes son alelos “activados”, comúnmente por una mutación, de la versión silvestre de un proto-oncogén, cuya función está involucrada en procesos de regulación del ciclo celular. Entre

ellos se encuentran genes que codifican factores de crecimiento, factores de angiogénesis, receptores de factores de crecimiento, y transductores de señales (5–7). Los genes supresores de tumores son aquellos en que la mutación se manifiesta con pérdida de función, y por tanto facilita la transformación maligna de la célula (8). Estos genes regulan procesos de señalización celular, inducción de apoptosis, reparación de DNA entre otros relacionados con regulación del ciclo celular.

Aun cuando el cáncer es una enfermedad altamente heterogénea, con células del mismo tumor mostrando un perfil genético diferente, los *Hallmarks* del cáncer proponen una serie de características que se observan en las células cancerosas. Además de las ya mencionadas, otras características de las células cancerosas son la evasión del sistema inmune, promoción de inflamación, metabolismo desregulado, inestabilidad genómica, plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética, microbiomas polimórficos, y capacidad de senescencia (9).

2.3 Epidemiología del Cáncer

En el 2020, Globocan (Global Cancer Observatory) reportó 19,292,789 casos nuevos y 9,958,133 defunciones, así como un total de 50,550,287 casos prevalentes, siendo el cáncer de mama el más común reportado. En México, se reportaron 195,499 casos nuevos, 90,222 defunciones y 530,602 casos prevalentes y el INEGI reportó cifras similares.

Respecto al cáncer de piel, se encuentran dos clasificaciones principales: el melanoma y el no melanoma, este último representa del 90 al 95% de los casos de cáncer de piel e incluye una variedad de tipos de cáncer que entre los más comunes se encuentran el carcinoma de células basales (70%) y el carcinoma de células escamosas (25%). El cáncer de piel no melanoma es el tipo de cáncer más frecuente, sin embargo, es altamente tratable y las estadísticas relacionadas a este cáncer son comúnmente omitidas en los censos (10).

En cuanto al melanoma de piel, se reportaron 324,635 casos nuevos y 57,043 defunciones y 1,092,818 casos prevalentes en 2020 a nivel mundial, considerando que en muchos países no existe un sistema accesible para la detección de cáncer, México siendo uno de estos. El incremento anual

en incidencia de cáncer de piel es el más alto de todos los tipos de cáncer. En EUA la incidencia ha incrementado de 1 en 1500 en 1935 a 1 en 68 en 2002 (11,12).

2.4 Melanoma

El melanoma cutáneo (MC) es un tipo de cáncer de piel que se origina en las células productoras de pigmento conocidas como melanocitos. Aun cuando no es el tipo de cáncer de piel más común, se considera el tipo de cáncer de piel más agresivo y con mayor tasa de mortalidad por la alta incidencia de metástasis que lo caracteriza (3,13,14). Se han identificado diversos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de MC, entre ellos la exposición a rayos ultravioleta (UV), historial familiar de melanoma, presencia numerosa de lunares atípicos y tonalidad de piel clara (14,15). En años recientes, se han considerado características del microambiente dérmico como factores que promueven la transformación celular en melanoma, cómo lo es la hipoxia fisiológica de la piel (11).

La vía BRAF/RAS/RAF/MEK/ERK es la que comúnmente se encuentra alterada en MC y comprende aproximadamente el 90% de los casos. Entre las mutaciones más comunes observadas se encuentran alteraciones en protooncogenes *BRaf* y *NRas*, y en el gen supresor de tumores *CDKN2a* (15–17).

Actualmente, el diagnóstico de MC se realiza mediante la obtención y análisis de una biopsia junto con un examen físico. El análisis puede revelar información sobre el tipo y estadio del melanoma, lo que ayudará a determinar el tipo de tratamiento a seguir. El tratamiento estándar para MC es la cirugía cuando es posible. En otros casos, el tratamiento incluye quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, se han hecho avances muy importantes en el tratamiento de MC, posicionando la terapia dirigida y la inmunoterapia como los tratamientos más efectivos para el melanoma. La detección temprana, como en otros tipos de cáncer, continúa siendo la clave para un pronóstico favorable.

El melanoma se caracteriza por tener una tasa elevada de mutaciones, algunas derivadas de exposición a rayos UV y se puede subclassificar según las mutaciones genéticas que están presentes en las células tumorales. La mutación genética más comúnmente asociada con el melanoma es la

mutación en el gen BRAF, pero también se pueden encontrar otras mutaciones en otros genes (17).

Mutación BRAF: Es la mutación más frecuente en el melanoma cutáneo. La mutación más común es la sustitución de la valina por glutamato en la posición 600 (V600E) del gen BRAF. Esta mutación activa la vía de señalización MAPK, que promueve el crecimiento y la supervivencia celular. Otros tipos de mutaciones BRAF incluyen V600K y V600R. El tratamiento dirigido con inhibidores de BRAF y MEK ha demostrado eficacia en pacientes con mutación BRAF.

Mutación NRAS: Es otra mutación frecuente en el melanoma. NRAS es un gen que codifica para una GTPasa implicada en la vía de señalización MAPK. Las mutaciones en NRAS activan esta vía de señalización y promueven el crecimiento celular descontrolado. Sin embargo, los inhibidores específicos de NRAS todavía no están disponibles y el tratamiento suele ser más desafiante en comparación con el melanoma con mutación BRAF.

2.5 Factores de transcripción inducibles por hipoxia

Los HIFs son factores transcripcionales heterodiméricos compuestos de una subunidad α y una subunidad β de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS. En mamíferos existen tres genes que codifican subunidades alfa: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . La subunidad HIF- β (ARNT) también cuenta con tres isoformas funcionales que no son reguladas por cambios en las concentraciones de oxígeno (18–22).

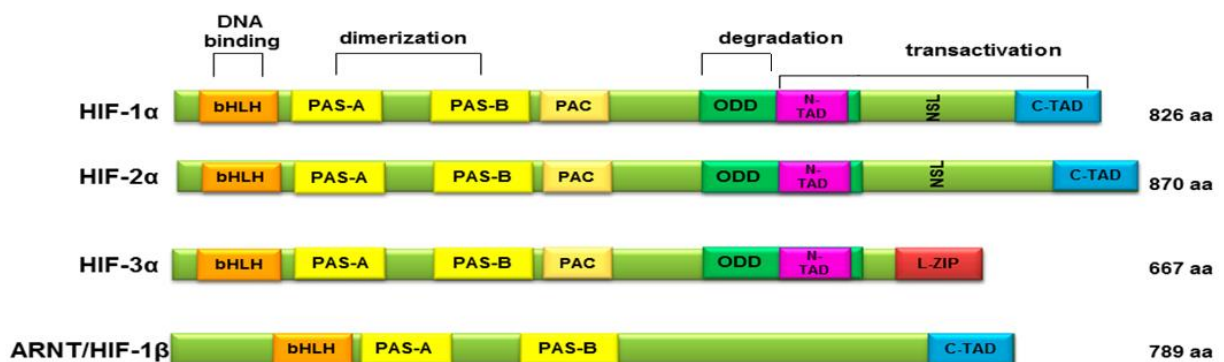


Figura 1. Comparación estructural de HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α y la proteína translocadora nuclear del receptor arilhidrocarburo (ARNT) HIF-1 β . HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α comparten un dominio de tipo hélice-giro-hélice y dos dominios PAS (A y B) que facilitan la unión y dimerización al DNA. PAC es otro dominio de tipo PAS que está asociado al carboxilo terminal y también comparten el dominio ODD que está involucrado en la degradación dependiente de oxígeno.

Los HIFs se expresan constitutivamente, pero la estabilidad de las subunidades α es dependiente de la concentración de oxígeno en la célula. Cuando los niveles de oxígeno en las células son normales, HIF α es hidroxilado en residuos clave de prolina por enzimas llamadas proli-hidroxilasas, lo que lo lleva a ser reconocido por la proteína von-Hippel Lindau (pVHL) que lo señala para ubiquitinación y degradación vía proteosoma. En hipoxia, las proli hidroxilasas son inhibidas, HIF α es estabilizado y se acumula en el núcleo, en donde dimeriza con HIF β para llevar a cabo la actividad transcripcional (18).

Además de la ruta dependiente de oxígeno, la estabilidad y degradación de las subunidades HIF α también se regula de manera independiente de oxígeno: se ha demostrado que la expresión de HIFs se induce también mediante la activación de rutas de señalización activadas por mitógenos y factores de crecimiento, tales como la vía de PI3K/Akt/mTOR, que promueven la estabilidad y traducción del RNAm que codifica las subunidades HIF α , así como la transcripción de los HIFs (23). Por tanto, es importante tener en consideración que, en las células cancerosas, esta forma de activación independiente de oxígeno es particularmente relevante, pues las células cancerosas generalmente tienen mutaciones oncogénicas en estas vías de señalización, que permiten la acumulación de HIFs independientemente de los niveles de oxígeno (18–21).

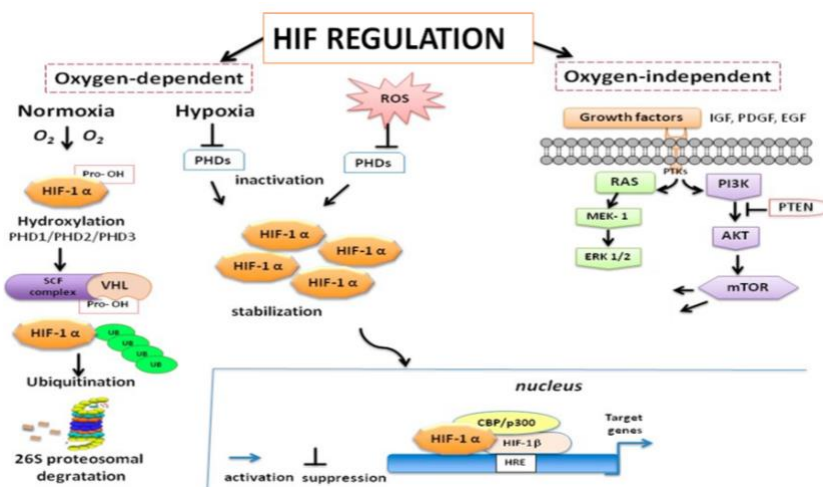


Figura 2. Vías de regulación de HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . En la regulación dependiente de oxígeno, los HIFs son hidroxilados y posteriormente degradados en condiciones de normoxia. En la regulación independiente de oxígeno, los HIFs son estabilizados a nivel de traducción y se estimula su expresión también a nivel de transcripción por factores de crecimiento que estimulan diferentes vías de señalización oncogénicas frecuentemente activas de manera constitutiva en células malignas.

Al ser un factor transcripcional, la estabilización de HIF tiene como objetivo inducir la expresión de genes que permiten la adaptación celular a las concentraciones cambiantes de oxígeno. Se ha observado que cada HIF tiene un set de genes blanco propios y también genes que regula en conjunto con otros HIF (21). De igual forma, la expresión de cada factor es dependiente del tejido y características del microambiente que lo rodea. El complejo HIF activo se une a regiones específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) presentes en los promotores de varios genes. Al unirse a estos elementos, el complejo HIF estimula la transcripción de una serie de genes involucrados en la adaptación celular a la hipoxia. Estos genes incluyen aquellos involucrados en la angiogénesis, el metabolismo anaeróbico, la proliferación celular, la supervivencia y otros procesos que ayudan a la célula a sobrevivir y adaptarse a la hipoxia (18–21).

Además de las modificaciones que regulan la estabilidad de la subunidad alfa en hipoxia, los HIFs son sujetos de diversas modificaciones transcripcionales, incluyendo la generación de isoformas por *splicing* alternativo. Aunque hasta ahora solo se han reportado e identificado isoformas para

HIF-3 α , análisis bioinformáticos demuestran la alta probabilidad que tienen HIF-1 α y HIF-2 α de generar variantes por *splicing* alternativo (21).

2.5.1 Factores de transcripción inducibles por hipoxia en cáncer

El rápido crecimiento tumoral, así como la mala vascularización llevan a que la hipoxia sea una característica del MT, misma que promueve la expresión de características del fenotipo maligno en las células cancerosas a través de la actividad de los HIFs (16). Anteriormente se ha observado que la estabilización de HIF-1 α por estrés oxidativo induce la activación de genes blanco que fomentan la dispersión, invasividad, angiogénesis y crecimiento de células de melanoma (24).

En las células cancerosas, los HIF promueven la supervivencia, el crecimiento y la invasión tumoral. Estimulan la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, promoviendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a las células cancerosas (25,26). Los HIF también regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo celular, promoviendo una mayor producción de energía mediante la glucólisis. Esto proporciona a las células cancerosas una ventaja de supervivencia y crecimiento en un entorno hipóxico (27).

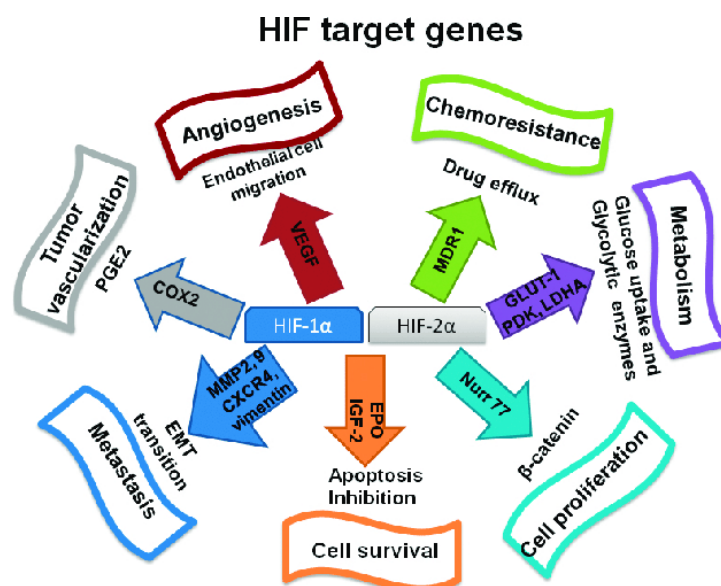


Figura 3. Genes blanco de HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . Los HIF regulan procesos de adaptación a hipoxia, entre ellos genes responsables de angiogénesis, proliferación celular, reprogramación metabólica y supervivencia. La implicación en la regulación de estos genes los convierte en un factor importante para la tumorigénesis.

La epidermis se encuentra en un ambiente constitutivo de hipoxia y por tanto facilita la estabilización de HIF- α . Se ha reportado una sobre-expresión de HIF-1 α en células de melanoma en comparación a nevos benignos (13,28). En un estudio, se observó que la sobre-expresión de HIF-1 α incrementó la capacidad angiogénica y de invasividad de las células de melanoma. De manera interesante, también se observó una sobre-expresión de HIF-1 α en queratinocitos colonizados por células de melanoma en comparación a tejidos distales al tumor (16). La expresión de HIF-2 α no ha sido caracterizada para tejido o células de melanoma, sin embargo, un estudio reportó la expresión elevada de HIF-1 α y HIF-2 α en el suero sanguíneo de pacientes con melanoma (29). En la actualidad no hay reportes de la expresión de HIF-3 α en melanoma y el papel que juegan HIF-2 α y HIF-3 α en melanoma no ha sido elucidado.

3. Planteamiento del problema

Los HIFs constituyen un posible blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer. Determinar el papel que HIF-2 α y HIF-3 α juegan en el tipo de cáncer de piel más agresivo y elucidar algunas de las funciones que tienen en el desarrollo del fenotipo maligno pueden proporcionar herramientas para un tratamiento más eficaz de este tipo de cáncer.

4. Hipótesis

El bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α disminuirá viabilidad, proliferación e invasividad de células de melanoma.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar el papel que juegan HIF-2 α y HIF-3 α en el fenotipo maligno de células de melanoma humano

5.2 Objetivos Particulares

1. Examinar y determinar el perfil de expresión de HIF-2 y HIF-3 en melanocitos normales en comparación con malignos en condiciones de normoxia (21% O₂) y de hipoxia (3% O₂).
2. Bloquear la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α mediante shRNA y confirmar la eficiencia del knockdown.
3. Analizar el efecto que tiene el bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α en la viabilidad celular de melanocitos malignos.
4. Analizar el efecto que tiene el bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α en la proliferación celular/capacidad clonogénica de melanocitos malignos.
5. Analizar el efecto que tiene el bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α en la migración celular en melanocitos malignos.

6. Materiales y Métodos

6.1 Materiales y Reactivos

6.1.1 Cultivo Celular

- Melanocitos Normales HEMa (ATCC PCS-200-13)
- Melanocitos Malignos A375 (ATCC CRL-1619)
- Melanocitos Malignos VMM1 (ATCC CRL-3225)
- Melanocitos Malignos VMM425 (ATCC CRL-3231)
- Adult Melanocyte Growth Kit (ATCC PCS-200-042)
- Suero Fetal Bovino (GIBCO-Invitrogen, California, EUA)

6.1.2 Western Blot

- Anticuerpos Primarios Monoclonales:
 - HIF-2 α : Anti-HIF2 α : Rabbit, Cell Signaling 7096
 - HIF-3 α : Anti-HIF3 α : Rabbit, Novus NBP03155
 - GADPH: Anti-GADPH: Mouse, SantaCruz SC47724
- Anticuerpos Secundarios
 - Anti-Rabbit IgG: Cell Signaling #7074
 - Anti-Mouse IgG: Cell Signaling #7076

7. Metodología

7.1 Cultivo Celular

La línea de melanocitos normales HEMa se cultiva en medio ATCC Dermal Cell Basal Medium adicionado con ATCC Adult Melanocyte Growth y 1% antibiótico/antimicótico. La línea A-375 se cultiva en medio DMEM, suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% antibiótico/antimicótico. Las células VMM1 y VMM425 fueron cultivadas en medio RPMI Advanced 1640 suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico/antimicótico.

7.2 Tratamiento de Hipoxia

Se utilizó una cámara de hipoxia (StemCell Technologies Cat #27310) con una concentración ambiental de 3% O₂, 5% CO₂ y 92% N₂. Se purgó la cámara de hipoxia previo a su uso con un flujo de 20 L/min por cuatro minutos. Posteriormente, se colocaron las cajas Petri con los cultivos celulares, se selló la cámara y se dejó dentro de la incubadora a 37°C por 24 horas. Se utilizó un tratamiento de normoxia (21% Oxígeno) como control.

7.3 Lisado Celular y Cuantificación de Proteína

Posterior al tratamiento de normoxia e hipoxia, los cultivos fueron lisados utilizando buffer de lisis RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.25% Na-desoxicolato, 1mM EDTA) adicionado con 10 μ L de NaPPi, 10 μ L de inhibidor de tripsina, 2 μ L de Leupeptina 20 μ M, 10 μ L de PMSF 1mM, 2mg de NaV04, y 25 μ L de NaF. Cada cultivo fue incubado por 30 minutos con el buffer de lisis y el lisado celular fue recolectado con un gendarme. Posteriormente, se centrifugaron los lisados (13,000 rpm, 5min, 4°C) y se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteína.

Posteriormente, se obtuvieron alícuotas de proteína diluidas 1:100 de cada lisado celular y se cuantificaron mediante el método Bradford. Utilizando albúmina de suero bovino (0.1mg/mL), se determinó la absorbancia a 595nm en un lector de placas (VICTOR Nivo Perkin Elmer). Se creó una gráfica para determinar la concentración de proteína en cada extracto y determinar el volumen a cargar en el SDS-PAGE. Cada lisado fue guardado a -80°C hasta previo a su uso en SDS-PAGE.

7.4 SDS-Page/Western Blot

Electroforesis

Se realizó una electroforesis (Buffer Tris-Glicina pH 8.3) con geles al 10% de acrilamida, se cargaron las muestras de proteína mezcladas con buffer Laemmli 4x (20% β -Mercaptoetanol). El gel se migró a corriente constante con un voltaje de 80V por 20 minutos y posteriormente un voltaje de 120V hasta previo a la salida del frente de corrida.

Electro-Transferencia

El gel fue transferido (1.5 horas, 0.16Amp) a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semi-seca utilizando buffer Nielsen-SDS.

Western Blot

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche (5% en TBS) durante una hora en agitación. Posteriormente, se hicieron tres lavados de cinco minutos en agitación con TBS-Tween 20 (0.1%; TTBS). La membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal para GADPH (1:5000), HIF2 α y HIF3 α (1:1000) durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario fue removido y la membrana se lavó tres veces por cinco minutos con TBS-Tween 20 para su posterior incubación con el anticuerpo secundario (Anti-Mouse 1:2000 y Anti-Rabbit 1:2000) por dos horas en

agitación. La membrana fue lavada dos veces con TBS-Tween 20 por cinco minutos en agitación y una vez con TBS por cinco minutos en agitación. Para finalizar, la membrana se incubó por un minuto con luminol (GADPH, Forte 300 μ L) (HIFs, 200 μ L Buffer + 200 μ L Luminol) para su posterior revelación utilizando un escáner revelador.

7.5 Bloqueo y análisis de expresión de HIF-2 α y HIF-3 α

El bloqueo de la expresión se realizó a través de una transfección lentiviral con un shRNA (short-hairpin RNA) de interferencia. Se sembraron 2.5×10^5 células de la línea A375 por pocillo en una placa de 6 pocillos y se incubaron por 24 horas para permitir la formación de la monocapa. Se añadió medio DMEM completo (10% SFB) con polibreno (10 μ g/mL) y se agregaron 7 μ L de partículas lentivirales a cada pocillo. Se utilizó un sh-RNA no dirigido como control (sc-108080), EPAS-1/HIF2 α shRNA de humano (sc-35316) y HIF3 α shRNA de humano (sc-38167) respectivamente. Se transfectaron dos pocillos por grupo experimental. Posteriormente, se retiró el medio con polibreno y partículas lentivirales, y se seleccionaron las células transfectadas utilizando puromicina (1 μ g/mL).

El análisis de bloqueo se realizó inmediatamente después de la transfección por medio de Western Blot utilizando el protocolo y anticuerpos ya mencionados. Los ensayos funcionales se realizaron a la par del análisis para asegurar estabilidad del bloqueo.

7.6 Ensayo de Cierre de Herida

Se sembraron 3.5×10^4 células por pocillo en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C hasta obtener una confluencia del 70%. Se agregó medio de ayuno (DMEM 0% SFB) durante 24hrs. Transcurrido este tiempo, se realizó una herida utilizando una punta estéril de 200 μ L. Las células se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C en medio de ayuno. Se obtuvieron fotografías de las zonas aledañas a la herida a tiempo 0hrs y 72hrs. El área de la herida se determinó usando el programa Fiji (ImageJ).

7.7 Ensayo de Formación de Colonias

Se sembraron 1×10^2 células de cada condición (sh-control, sh-HIF2 α , sh-HIF3 α) por pocillos en una placa de 96 pocillos para obtener n=12 por condición. Las células se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ durante 4 días. Posteriormente, se fijaron las colonias con metanol (MeOH) absoluto y se realizó una tinción utilizando cristal violeta (0.5% en 25% MeOH). El número de colonias se cuantificó utilizando un microscopio óptico.

7.8 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Células A375 scramble y bloqueadas para HIF2 α y HIF3 α fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio DMEM completo. Posteriormente, se añadió H₂O₂ para crear una curva de dosis-respuesta con concentraciones de 0.0, 0.5, 1 y 2mM H₂O₂ con triplicados para cada concentración. Se utilizó medio DMEM completo + H₂O como vehículo y se incubaron las células a 37°C por 24hrs.

Posteriormente, se agregaron 10 μ L de reactivo MTT (0.5mg/mL) por 100 μ L de medio DMEM completo por pocillo y se incubó cubierto con aluminio a 37°C por tres horas. Se retiró el medio, se agregó isopropanol ácido (2M) para disolver los cristales y se midió la absorbancia a 570nm utilizando un lector de placas (VICTOR Nivo Perkin Elmer).

8. Resultados

8.1 HIF-2 α se encuentra sobre-expresado en células malignas de melanoma humano

Anteriormente se ha reportado la sobreexpresión de HIF1 α en líneas celulares y tejidos de melanoma, cuya actividad está asociada con características del fenotipo maligno (30). En un estudio (29) se detectaron niveles elevados de HIF-2 α en el suero sanguíneo de pacientes con

melanoma en comparación con pacientes sanos, pero el papel que juega HIF-2 α en melanoma no se ha reportado. La expresión de HIF-3 α apenas comienza a ser estudiada en otros tipos de cáncer como el de mama y colon. Sin embargo, no hay reportes de la expresión o el papel que HIF-3 α pudiese ejercer en melanoma.

Con el objetivo de identificar diferencias en la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α entre melanocitos malignos y melanocitos normales, se analizó la expresión basal de la proteína en tres líneas celulares de melanocitos malignos y una línea celular de melanocitos normales mediante Western Blot. Dado que la proteína HIF- α es estabilizada solo en condiciones de hipoxia, se obtuvieron extractos de las cuatro líneas celulares cultivadas tanto en normoxia como en hipoxia.

Se observó una sobreexpresión de HIF-2 α en condiciones de hipoxia para las líneas celulares de melanocitos malignos en comparación con la línea celular de melanocitos normales.

De forma inesperada, se observó la expresión de una banda no reportada anteriormente en la literatura para HIF-2 α de aproximadamente 60 kDa que sólo expresan las células malignas y de forma independiente de oxígeno. Cabe recalcar que la línea celular de melanoma VMM425 está caracterizada por ser altamente metastásica y en esta línea celular solamente se observa la expresión de la isoforma de menor peso no reportada para HIF-2 α , sin identificarse expresión de la banda de 100 kDa (Figura 3).

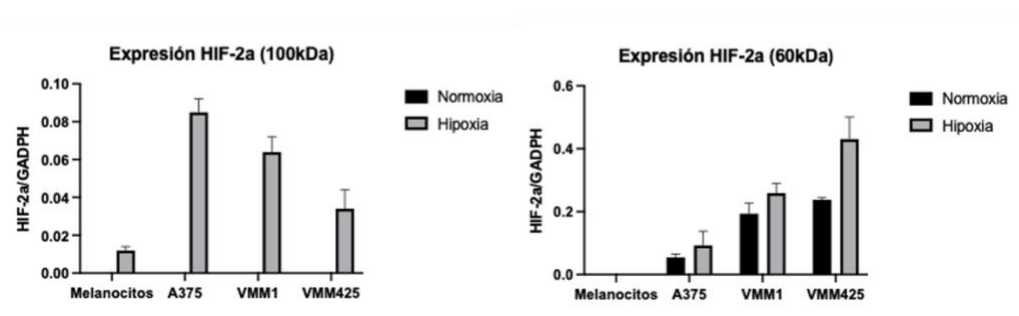
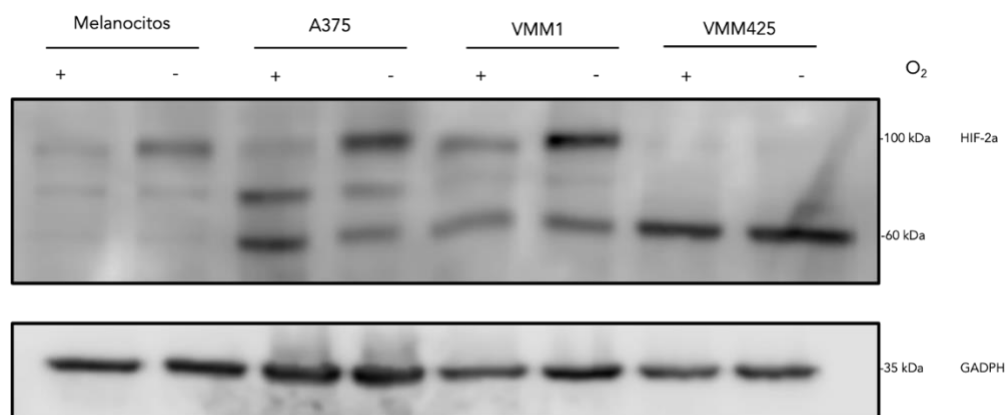


Figura 4. Expresión de HIF-2 α en melanocitos normales y melanocitos malignos (A375, VMM1, VMM425).

El factor inducible por hipoxia 3 α (HIF-3 α) es el único de los tres HIFs para los que se ha reportado la existencia de isoformas por *splicing* alternativo con funciones específicas (22,31–33). Respecto a la expresión de HIF-3 α en melanocitos y células de melanoma, se observa la expresión de la isoforma completa de HIF-3 α de aproximadamente 75 kDa. De forma interesante, esta isoforma se expresa en condiciones de normoxia e hipoxia tanto para melanocitos normales como melanocitos malignos. De igual forma se observa la expresión de bandas de menor tamaño en las cuatro líneas celulares (Figura 5).

Aunque de forma aparente no se observan cambios significativos entre líneas celulares o entre condiciones de oxígeno, el análisis densimétrico revela un aumento en la expresión de HIF-3 α para las líneas celulares de melanoma VMM1 y VMM425, líneas celulares con una alta tasa de metástasis, aunque el aumento no resulta significativo.

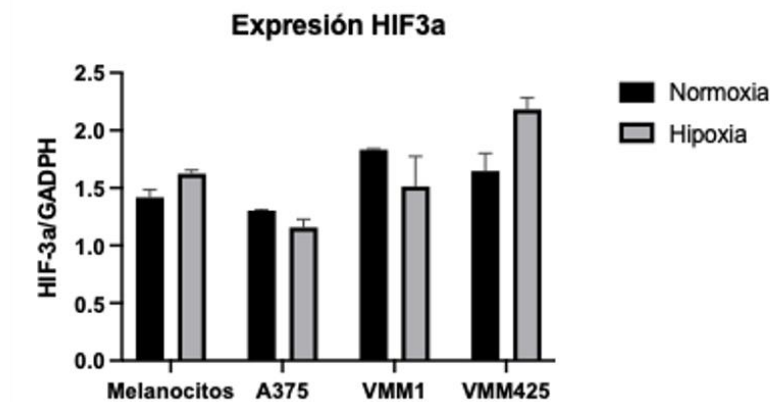
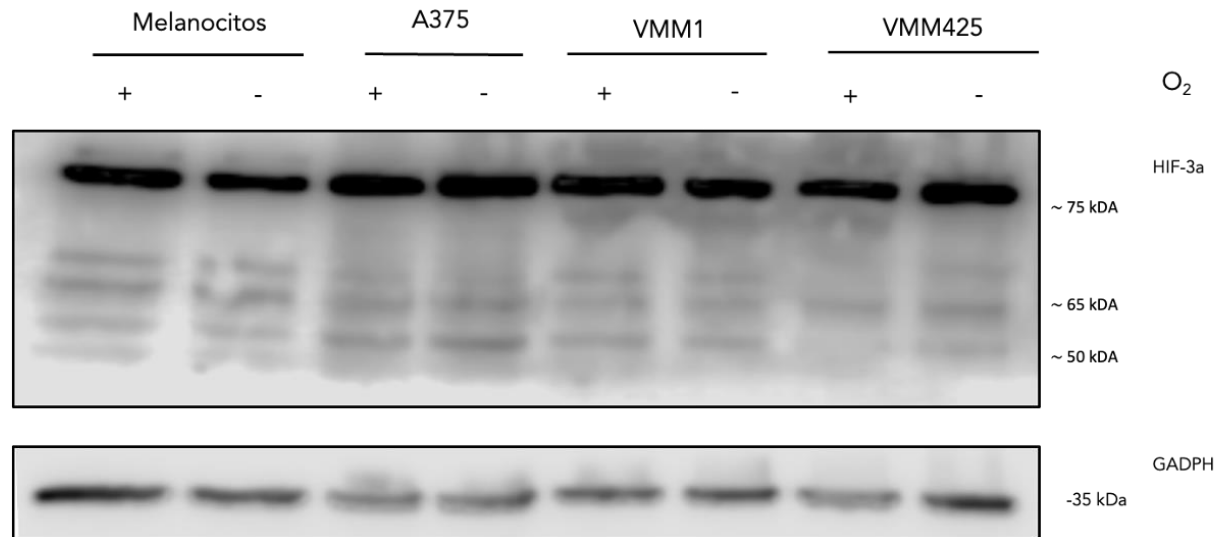


Figura 5. Expresión de HIF-3 α en melanocitos normales y melanocitos malignos.

**** Blot a repetir cuando llegue el anticuerpo de HIF-3 con menor carga de proteína**

8.2 El bloqueo de HIF-2 α y HIF-3 α por método de transducción lentiviral resulta en una disminución considerable, aunque no completa, de su expresión.

El papel preponderante que juega HIF-1 α en la expresión de diversas características del fenotipo maligno se ha determinado en gran parte a través de estudios en donde HIF-1 α es silenciado a través de una transducción lentiviral con un shRNA (24,34). Este método fue utilizado en el presente estudio para evaluar los efectos del bloqueo de expresión de HIF-2 α y HIF-3 α en líneas celulares de melanoma. La línea celular A375 fue considerada para el bloqueo de expresión de

HIF-2 α y HIF-3 α y los posteriores ensayos funcionales por ser la única de las líneas celulares que no presentó cambios drásticos en morfología al ser tratada con puromicina.

El bloqueo de expresión por método lentiviral resultó exitoso y se observó una disminución alta, aunque no completa de la expresión de HIF-2 α (Figura 6) y HIF-3 α (Figura 7). La interdependencia de las tres variantes de HIF, así como de las isoformas ha sido reportado anteriormente. En acuerdo con esto, se observa una disminución de la expresión de HIF-2 α cuando la expresión de HIF-3 α es bloqueada (Figura 6) y de igual forma, una disminución en la expresión de HIF-3 α cuando la expresión de HIF-2 α es bloqueada (Figura 7), lo que demuestra la interdependencia antes reportada.

Es importante mencionar que este método compone una limitación de este estudio ya que las células recuperaban la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α de forma rápida, probablemente debido a la generación de resistencia contra puromicina. De igual forma no fue posible utilizar este método con las células VMM1 y VMM425 ya que resultaron ser altamente sensibles a concentraciones bajas de puromicina, afectando su morfología y muy probablemente funciones celulares.

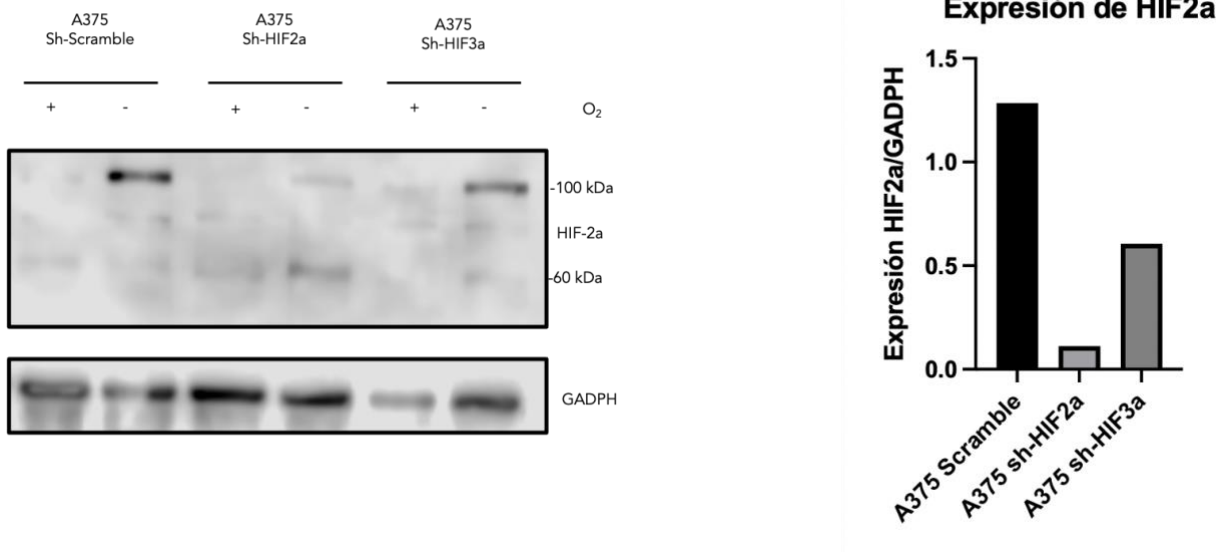


Figura 6. Expresión de HIF-2 α en células sometidas a bloqueo de expresión de HIF-2 α y HIF-3 α con shRNA.

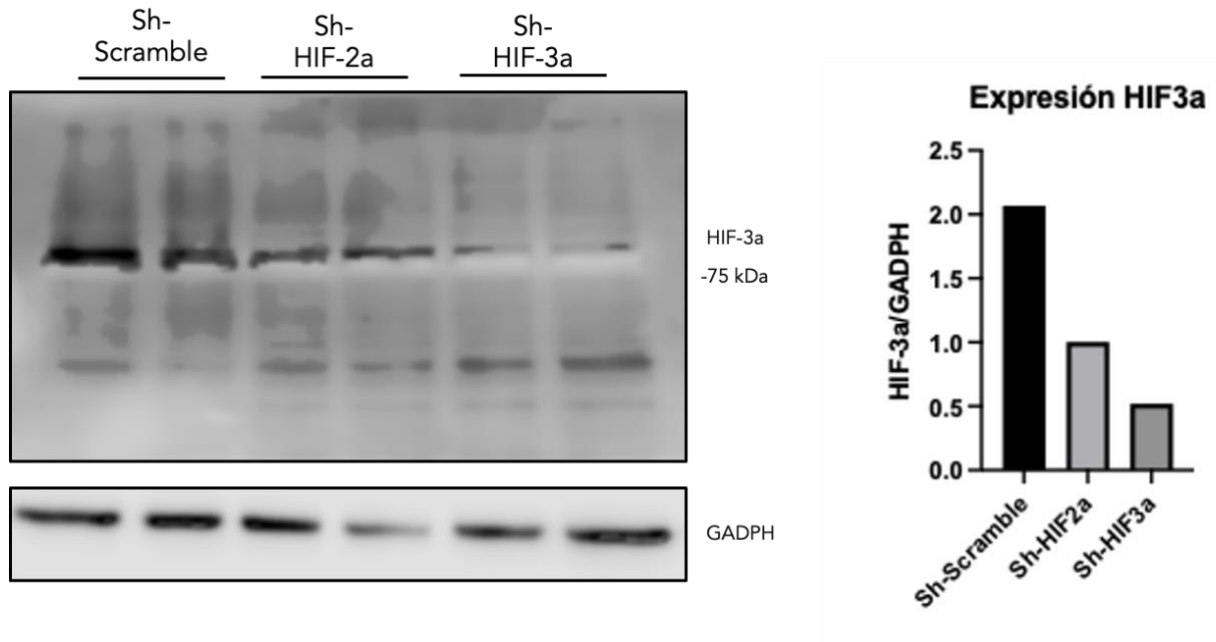


Figura 7. Expresión de HIF-3 α en células sometidas a bloqueo de expresión de HIF-2 α y HIF-3 α con shRNA.

8.3 El bloqueo HIF-2 α disminuye la viabilidad celular de melanocitos malignos de forma basal y los sensibiliza aún más al tratamiento con inductor de apoptosis (H₂O₂).

Los HIFs son factores transcripcionales que tienen como blanco genes responsables de mediar procesos de proliferación y muerte celular. Los HIFs permiten la adaptación de las células cancerosas a condiciones de hipoxia, por lo que desempeñan un papel crucial en la viabilidad de las células cancerosas. HIF-1 α induce la expresión de genes que protegen contra muerte celular y se ha demostrado que el bloqueo de expresión de HIF-1 α sensibiliza a las células cancerosas contra agentes citotóxicos (19,35).

Con el objetivo de identificar el papel que juegan HIF-2 α y HIF-3 α en la viabilidad celular de células de melanoma, células A375 Scramble, sh-HIF-2 α y sh-HIF-3 α fueron expuestas a peróxido de hidrógeno por 16 horas. El bloqueo de la expresión de HIF-2 α redujo de forma significativa la viabilidad de las células malignas, tanto en condiciones basales como cuando expuestas a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), efecto que se vio

exacerbado en condiciones de hipoxia. Lo anterior sugiere una disminución en la proliferación celular, un aumento en apoptosis, o ambos.

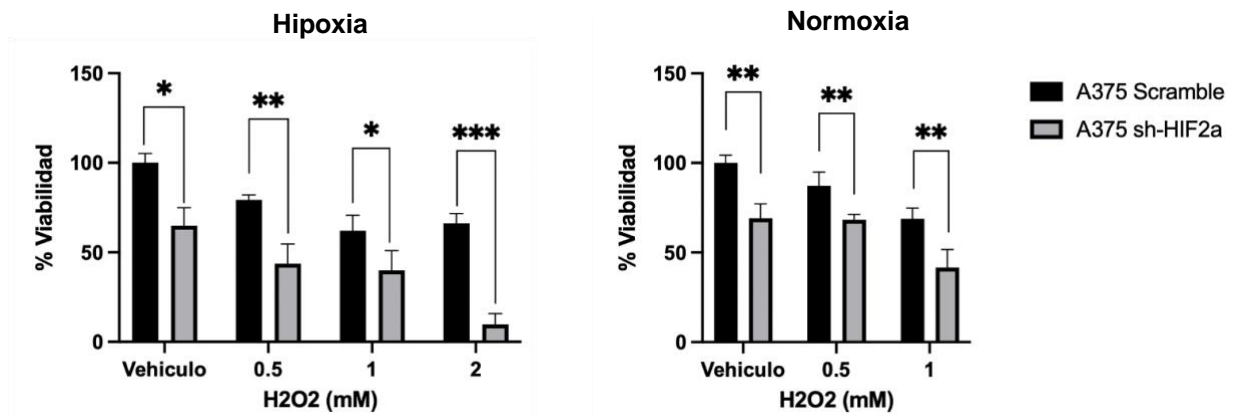


Figura 8. Viabilidad celular de células A375 (Scramble y sh-HIF-2 α) de melanoma en condiciones basales y expuestas a H₂O₂.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de una isoforma de menor tamaño para HIF-2 α no ha sido reportada previamente en la literatura. Sin embargo, la capacidad de HIF-3 α de formar isoformas por *splicing* alternativo sugiere que tanto HIF-1 α como HIF-2 α tienen el potencial de generar isoformas. Se realizó un Western Blot para determinar la expresión de HIF-2 α cuando las células están expuestas a H₂O₂ en normoxia. En condiciones de normoxia, sólo se observa la expresión de la banda de menor tamaño (60kDa) para HIF-2 α (Figura 4). Se observó un incremento en la expresión de HIF-2 α (60 kDa) para las células Sh-Scramble cuando se exponen a H₂O₂. Sin embargo, la expresión de HIF-2 α disminuyó para las células Sh-HIF-2 α cuando se exponen a H₂O₂ (Figura 9), lo que sugiere que esta banda sí corresponde a la expresión de una isoforma de menor tamaño de HIF-2 α y que el bloqueo con shRNA es parcialmente efectivo.

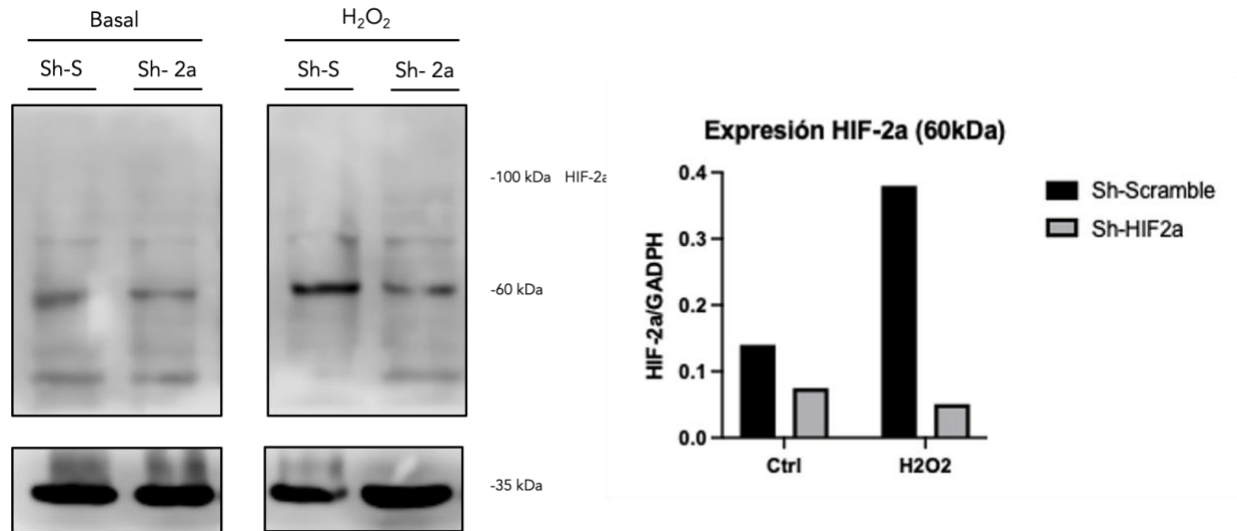


Figura 9. Expresión de HIF-2 α (60 kDa) en condiciones basales y cuando expuestas a H₂O₂. Sh-S: A375 Sh-Scramble, Sh-2a: A375 Sh-HIF-2 α

8.4 El bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α resulta en una disminución en la proliferación celular y en la capacidad clonogénica de células de melanoma

Los factores inducibles por hipoxia promueven la capacidad proliferativa de las células cancerosas, facilitando su adaptación a las bajas concentraciones de oxígeno y favoreciendo la formación de colonias de las células malignas y por tanto el crecimiento y dispersión del tumor. El bloqueo de la expresión de HIF-2 α disminuyó la capacidad clonogénica de células de cáncer de mama in vivo e in vitro (36).

Para investigar el papel que juega HIF-2 α y HIF-3 α en la capacidad clonogénica de las células de melanoma, se realizó un ensayo de formación de colonias con células A375 Scramble, sh-HIF-2 α y sh-HIF-3 α . En el presente estudio se observó que el bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α disminuyó de forma significativa la capacidad clonogénica de las células de melanoma (Figura 10), así como el tamaño de las colonias formadas, sugiriendo una disminución en la proliferación celular, así como en la auto-renovación.

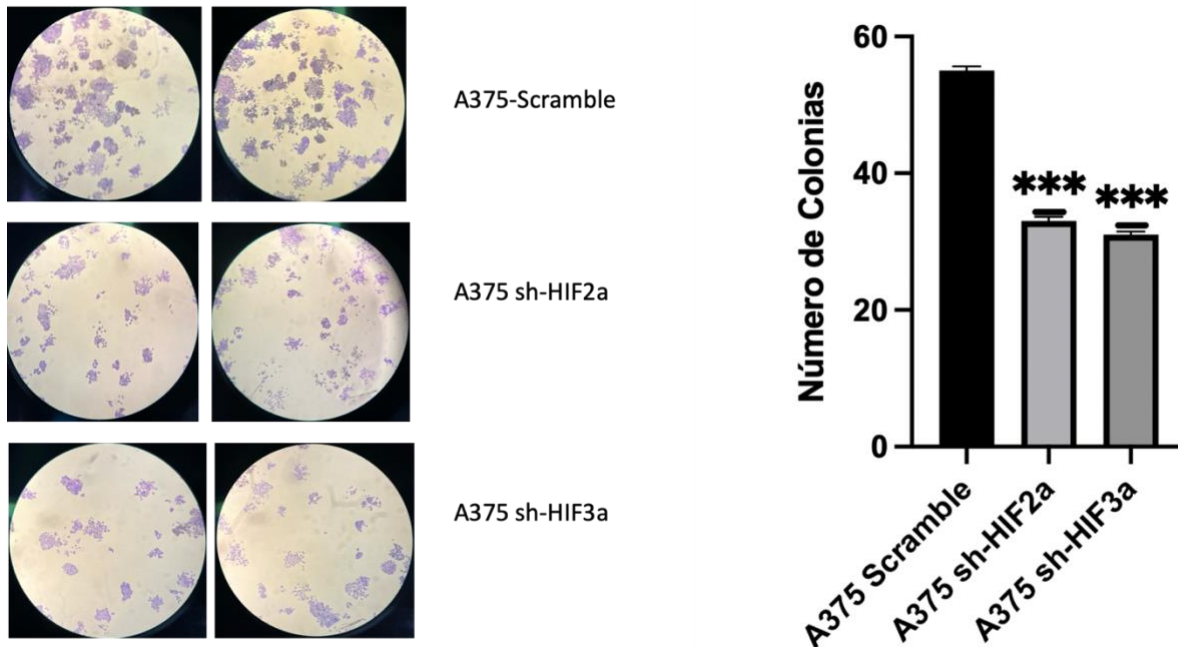


Figura 10. Capacidad clonogénica basal de células A375 de melanoma (Scramble, sh-HIF-2 α y sh-HIF-3 α).

8.5 El bloqueo HIF-2 α y HIF-3 α resulta en una disminución en la capacidad migratoria de células de melanoma

La capacidad migratoria de las células cancerosas es una característica del fenotipo maligno que demuestra el potencial que tienen las células de diseminarse a otras partes del cuerpo en un proceso conocido como metástasis. Con el objetivo de determinar la función de HIF-2 α y HIF-3 α en la capacidad migratoria de las células de melanoma, se realizó un ensayo de cierre de herida para comparar la migración de células A375 Scramble con células sh-HIF-2 α y sh-HIF-3 α de forma basal en un tiempo de 48 horas. Se observó una disminución significativa en la capacidad migratoria de las células cuya expresión de HIF-2 α o HIF-3 α fue bloqueada (Figura 11), lo que sugiere que el bloqueo de la expresión de HIF-2 α y HIF-3 α inhiben de manera contundente la capacidad invasiva de las células de melanoma y por tanto el potencial de metástasis.

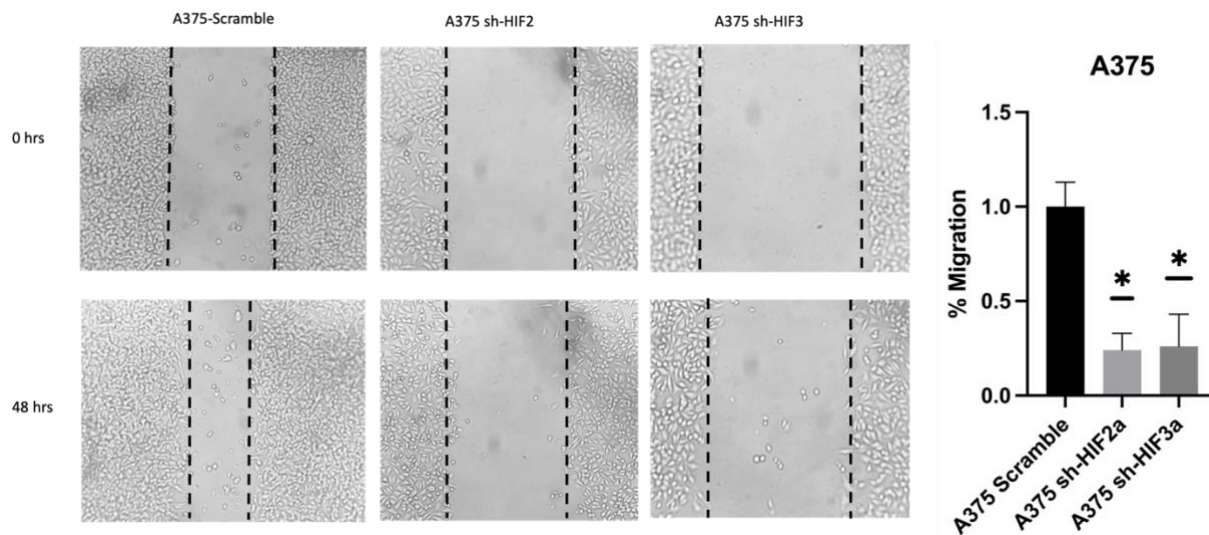


Figura 11. Capacidad migratoria basal de células A375 de melanoma humano (Scramble, sh-HIF-2 α y sh-HIF-3 α).

9. Discusión

La acción de los factores inducibles por hipoxia se ha clasificado como un factor clave de la carcinogénesis, permitiendo la adaptación de las células tumorales a las concentraciones hipóxicas del MT y fomentando la expresión de diversas características del fenotipo maligno. El papel preponderante que juega HIF-1 α en la carcinogénesis se ha establecido en numerosos modelos (37,38) e incluso se le atribuía la mediación de la respuesta a hipoxia en su totalidad. Sin embargo, recientemente se descubrió la existencia de dos isoformas adicionales, nombradas HIF-2 α y HIF-3 α . Como consecuencia, el papel que juegan estos dos factores apenas comienza a ser estudiado. Aunque se ha determinado que ambos juegan un papel importante en la regulación y expresión de características del fenotipo maligno (21,39), la expresión y el papel que éstos juegan en el desarrollo de melanoma humano no ha sido estudiado.

En el presente estudio se presentan los efectos funcionales del bloqueo de HIF-2 α y HIF-3 α en algunas de las características clave del fenotipo maligno de células de melanoma humano. La

isoforma completa de HIF-2 α se encuentra sobre-expresada en las células de melanoma humano comparado con la expresión en melanocitos normales, sugiriendo que su expresión es importante para las células malignas. En cuanto a HIF-3 α , no se observa una diferencia significativa en la expresión de la banda completa, sin embargo, es importante estudiar a detalle la expresión de las isoformas derivadas de splicing alternativo a mayor resolución para estudiar una posible alteración en la expresión de ellas. De forma aparente, las células malignas expresan HIF-3 α de una forma similar a las células normales y es importante mencionar que los melanocitos se encuentran en un ambiente fisiológico de hipoxia *in vivo*, y por tanto existe la posibilidad de que uno o varios mecanismos de respuesta a hipoxia crónica estén activos de manera constitutiva en estas células.

De manera muy interesante, se observó la expresión de una isoforma no reportada para HIF-2 α de aproximadamente 60 kDa, peso que nos permite descartar un doblete por modificación postraduccional. Esta isoforma parece ser exclusiva de las células cancerosas y también estar relacionada con un perfil alto de agresividad, siendo la línea celular VMM425, una línea altamente metastásica, la que mostró la expresión más alta de esta banda y perdiendo casi por completo la expresión de la banda completa reportada de 100 kDa. La expresión de isoformas por splicing alternativo se ha reportado anteriormente para HIF-3 α (22,31,33) pero no para HIF-2 α , sin embargo, la similitud estructural de los HIFs y la capacidad de HIF-3 α de generar variantes por este mecanismo, además de evidencia bioinformática, sugiere que tanto HIF-1 α como HIF-2 α son capaces de generar variantes por splicing alternativo. Consistente con esto, se ha reportado que las células cancerosas son capaces de activar mecanismos de splicing alternativo y generar variantes que promueven el fenotipo maligno (40,41). Lo anterior sugiere que las células de melanoma pueden activar mecanismos que generen variantes de splicing alternativo de los HIFs para promover la tumorigénesis.

Anteriormente se ha reportado que HIF-2 α fomenta la expresión de diversas características del fenotipo maligno en cáncer de mama (36), colon (42,43), neuroblastoma, carcinoma renal, glioblastoma, entre otros (39). En cuanto a melanoma, se reportó que HIF-2 α promueve el fenotipo de célula troncal mediante la acción del microRNA 363-3p/p21(Cip1/Waf1) (44). Se ha observado que el bloqueo de HIF-2 α resulta en la disminución de la expresión de las características del

fenotipo maligno en glioblastoma (45), cáncer de mama (36) entre otros, y en nuestro laboratorio demostramos que el bloqueo específico de HIF-2 α , pero no de HIF-1 α , solo o combinado con quimioterapia, revierte la resistencia a agentes citotóxicos en cáncer de colon (43).

En el presente estudio se observó que el bloqueo de HIF-2 α disminuye de forma significativa la viabilidad de células de melanoma humano de forma basal y también cuando se exponen al agente oxidativo H₂O₂. Esto se observó tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, con un efecto más evidente en hipoxia. La expresión de HIF-2 α aumentó en presencia de H₂O₂, lo que es esperado ya que los HIF, y particularmente HIF-2 α (43) también participa en la respuesta a estrés oxidativo actuando como un protector de las células a este tipo de estrés. Este efecto se abatió mediante el bloqueo de HIF-2 α tanto en normoxia como en hipoxia. Lo anterior sugiere que HIF-2 α juega un papel clave en la supervivencia de las células cancerosas de melanoma y que bloquear a HIF-2 α sensibiliza a las células a muerte celular de manera basal y aún más cuando se exponen a un agente oxidante.

El bloqueo de HIF-2 α resultó también en una disminución en la capacidad clonogénica de las células, reduciendo tanto el número de células como el tamaño de las colonias. Esto sugiere que HIF-2 α juega un papel crucial en la modulación del ciclo celular y la proliferación de las células de melanoma humano. Por último, el bloqueo de HIF-2 α resultó en una disminución en la capacidad migratoria de las células de melanoma humano, sugiriendo la participación de HIF-2 α en procesos de migración, factor clave en la transición epitelio-mesenquimal, invasividad y capacidad de metástasis de las células cancerosas. Estos resultados muestran que HIF-2 α es un factor clave responsable de mediar procesos de la tumorigénesis y características del fenotipo maligno de las células de melanoma humano como son viabilidad y proliferación celular, capacidad clonogénica y migración.

El papel que juega HIF-3 α ha sido el menos estudiado de los tres HIFs y es la isoforma más compleja de estudiar debido a las diferentes variantes por splicing alternativo que han sido reportadas. Anteriormente se ha observado que HIF-3 α ejerce la acción de factor de transcripción, pero también es un regulador de HIF-1 α y HIF-2 α (46). HIF-3 α se encuentra sobre-expresado en

diferentes tipos de cáncer (47) y que promueve la expresión de características del fenotipo maligno (48–50).

En el presente estudio se observó que el bloqueo de la expresión de HIF-3 α resultó en la disminución de la capacidad clonogénica de las células de forma significativa y similar a la del bloqueo de HIF-2 α . Esto sugiere que HIF-3 α juega un papel clave en la capacidad replicativa y de auto-renovación de las células de melanoma humano. También se observó que el bloqueo de HIF-3 α disminuyó de forma significativa la capacidad migratoria de las células, sugiriendo la interferencia con procesos de invasividad y metástasis de las células de melanoma humano. En conjunto, nuestros datos sugieren que HIF-3 α juega un papel crucial en la expresión de las características del fenotipo maligno de células de melanoma humano y que por tanto es clave en la formación y desarrollo de melanoma.

10. Conclusión

Determinar el papel que juegan los factores inducibles por hipoxia HIF-2 α y HIF-3 α en el cáncer de piel más agresivo y con una alta tasa de metástasis es crucial para entender la acción de estos factores en la tumorigénesis y en la expresión de diversas características del fenotipo maligno. Al día de hoy se conoce el papel preponderante que juega HIF-1 α en diversas etapas del cáncer de piel más agresivo que es el melanoma. Sin embargo, se sabe poco del papel que juega HIF-2 α y aun menos del papel que juega HIF-3 α en estos procesos. En este estudio se determinó que tanto HIF-2 α como HIF-3 α juegan un papel crucial en la viabilidad celular, la capacidad clonogénica y la capacidad migratoria de las células de melanoma humano. Esto posiciona a HIF-2 α y a HIF-3 α como proteínas de interés y posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de melanoma, hoy el cáncer de piel más letal que existe y con una incidencia que incrementa anualmente en el mundo.

11. Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
2. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature*. 2001;411:355–65.
3. Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *The Molecular Basis of Human Cancer* [Internet]. New York, NY: Springer; 2017 [cited 2023 Sep 5]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-458-2>
4. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2022;23:74–88.
5. Grumolato L, Aaronson SA. 2 - Oncogenes and Signal Transduction. In: Mendelsohn J, Gray JW, Howley PM, Israel MA, Thompson CB, editors. *Mol Basis Cancer Fourth Ed* [Internet]. Fourth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 2015. page 19-34.e3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455740666000020>
6. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22:9667.
7. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *CELL Metab*. Cambridge: Cell Press; 2022;34:355–77.
8. Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Nov 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532243/>
9. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12:31–46.
10. CIUCIULETE A-R, STEPAN AE, ANDREIANA BC, SIMIONESCU CE. Non-Melanoma Skin Cancer: Statistical Associations between Clinical Parameters. *Curr Health Sci J*. 2022;48:110–5.
11. Bedogni B, Powell MB. Skin hypoxia: a promoting environmental factor in melanomagenesis. *Cell Cycle Georget Tex*. 2006;5:1258–61.
12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;
13. Jeon S, Jeon M, Choi S, Yoo S, Park S, Lee M, et al. Hypoxia in Skin Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023;24:4430.
14. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1:15003.

15. D'Aguanno S, Mallone F, Marengo M, Del Bufalo D, Moramarco A. Hypoxia-dependent drivers of melanoma progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40:159.
16. Zbytek B, Peacock DL, Seagroves TN, Slominski A. Putative role of HIF transcriptional activity in melanocytes and melanoma biology. *Dermatoendocrinol.* 2013;5:239–51.
17. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer.* 2018;124:3490–9.
18. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33:207–14.
19. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2011;14:191–201.
20. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2011;12:9–22.
21. Martin AS, Castaneda Patlan MC, Robles Flores M. The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance. *J Cell Signal [Internet].* 2017 [cited 2023 May 24];02. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/the-role-of-hypoxia-inducible-factors-in-cancer-resistance.php?aid=92396>
22. Zhang P, Yao Q, Lu L, Li Y, Chen P-J, Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* 2014;6:1110–21.
23. Malekan M, Ebrahimzadeh MA, Sheida F. The role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and its signaling in melanoma. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2021;141:111873.
24. Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, et al. HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:893–904.
25. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-Induced Angiogenesis. *Genes Cancer.* 2011;2:1117–33.
26. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Res Int.* 2015;2015:549412.
27. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology - Kierans - 2021 - *The Journal of Physiology - Wiley Online Library [Internet].* [cited 2023 Nov 27]. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP280572>

28. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, Mesropian L, Gradin K, Jamora C, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell*. 2008;133:223–34.
29. Ene CD, Nicolae I. Hypoxia-Nitric Oxide Axis and the Associated Damage Molecular Pattern in Cutaneous Melanoma. *J Pers Med*. 2022;12:1646.
30. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999;59:5830–5.
31. Pasanen A, Heikkilä M, Rautavuoma K, Hirsilä M, Kivirikko KI, Myllyharju J. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:1189–200.
32. Tolonen J-P, Heikkilä M, Malinen M, Lee H-M, Palvimo JJ, Wei G-H, et al. A long hypoxia-inducible factor 3 isoform 2 is a transcription activator that regulates erythropoietin. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77:3627–42.
33. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol-Cell Physiol*. American Physiological Society; 2016;310:C260–9.
34. Xia T, Cheng H, Zhu Y. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces proliferation, induces apoptosis and attenuates the aggressive phenotype of retinoblastoma WERI-Rb-1 cells under hypoxic conditions. *Ann Clin Lab Sci*. 2014;44:134–44.
35. Lv Y, Zhao S, Han J, Zheng L, Yang Z, Zhao L. Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *OncoTargets Ther*. 2015;8:1941–8.
36. Wang Y, Liu X, Wang M, Wang Y, Wang S, Jin L, et al. UBE3B promotes breast cancer progression by antagonizing HIF-2 α degradation. *Oncogene*. 2023;42:3394–406.
37. Jin X, Dai L, Ma Y, Wang J, Liu Z. Implications of HIF-1 α in the tumorigenesis and progression of pancreatic cancer | *Cancer Cell International* | Full Text. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 16];20. Available from: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-020-01370-0>
38. Zhao Y, Xing C, Deng Y, Ye C, Peng H. HIF-1 α signaling: Essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies. *Genes Dis*. 2024;11:234–51.
39. Davis L, Recktenwald M, Hutt E, Fuller S, Briggs M, Goel A, et al. Targeting HIF-2 α in the Tumor Microenvironment: Redefining the Role of HIF-2 α for Solid Cancer Therapy. *Cancers*. 2022;14:1259.
40. Farina AR, Cappabianca L, Sebastiano M, Zelli V, Guadagni S, Mackay AR. Hypoxia-induced alternative splicing: the 11th Hallmark of Cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39:110.

41. Zhang Y, Qian J, Gu C, Yang Y. Alternative splicing and cancer: a systematic review. *Signal Transduct Target Ther.* Nature Publishing Group; 2021;6:1–14.
42. Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, García-Zepeda EA, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in canonical Wnt signaling. *PloS One.* 2014;9:e112580.
43. Saint-Martin A, Martínez-Ríos J, Castañeda-Patlán MC, Sarabia-Sánchez MA, Tejeda-Muñoz N, Chinney-Herrera A, et al. Functional Interaction of Hypoxia-Inducible Factor 2-Alpha and Autophagy Mediates Drug Resistance in Colon Cancer Cells. *Cancers.* 2019;11:755.
44. Hao T, Li CX, Ding XY, Xing XJ. MicroRNA-363-3p/p21(Cip1/Waf1) axis is regulated by HIF-2 α in mediating stemness of melanoma cells. *Neoplasma.* 2019;66:427–36.
45. Nusblat LM, Tanna S, Roth CM. Gene silencing of HIF-2 α disrupts glioblastoma stem cell phenotype. *Cancer Drug Resist.* 2020;3:199–208.
46. Yang S-L, Wu C, Xiong Z-F, Fang X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep.* 2015;12:2411–6.
47. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017;357:eaan2507.
48. Zhou X, Guo X, Chen M, Xie C, Jiang J. HIF-3 α Promotes Metastatic Phenotypes in Pancreatic Cancer by Transcriptional Regulation of the RhoC–ROCK1 Signaling Pathway. *Mol Cancer Res.* 2018;16:124–34.
49. Wei L, Yuan N, Chen Y, Gong P. Aberrant expression of HIF3A in plasma of patients with non-small cell lung cancer and its clinical significance. *J Clin Lab Anal.* 2021;35:e23889.
50. Gao Q, Ren Z, Jiao S, Guo J, Miao X, Wang J, et al. HIF-3 α -Induced miR-630 Expression Promotes Cancer Hallmarks in Cervical Cancer Cells by Forming a Positive Feedback Loop. *J Immunol Res.* 2022;2022:5262963.