

## Hipoxia y cáncer

Consuelo Boticario Boticario<sup>1</sup> y María Cascales Angosto<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

<sup>2</sup> Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Recibido el 16 de septiembre de 2010.

### RESUMEN

La hipoxia o deficiencia en el aporte de oxígeno a los tejidos, caracteriza una serie de situaciones fisiopatológicas, incluido el cáncer. El medio hipóxico activa una cascada señalizadora que induce o reprime la transcripción de muchos genes implicados en la angiogénesis, la metástasis, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia/muerte celular. El responsable de esta respuesta es un factor de transcripción heterodimérico, el factor inducible por hipoxia (HIF-1), que consiste en una subunidad alfa, sensible al oxígeno (HIF- $\alpha$ ) y una subunidad constitutiva beta (HIF- $\beta$ ), que facilita la adaptación a la privación de oxígeno. El HIF es un regulador positivo del crecimiento tumoral y su inhibición produce la supresión tumoral. En muestras tumorales de pacientes, el HIF se encuentra elevado, elevación que se relaciona con mal pronóstico. La identificación de nuevas moléculas dirigidas a la terapia del cáncer, está dando énfasis a las moléculas pequeñas para inhibir eficientemente las vías señalizadoras alteradas en el cáncer.

**Palabras clave:** Hipoxia; Factor inducible por hipoxia; HIF-1; Terapia del cáncer.

## ABSTRACT

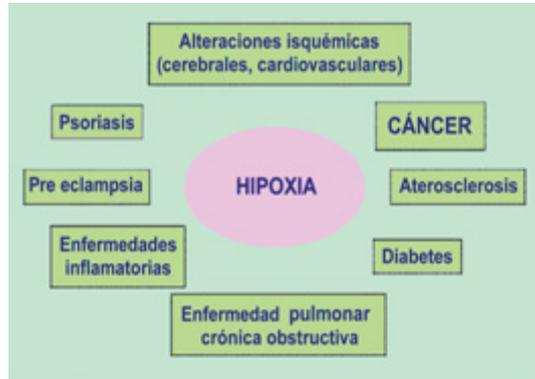
### Hypoxia and cancer

Hypoxia or deficient oxygen supply to tissues characterize a serie of pathological situations, included cancer. Hypoxic environment activates a signaling cascade that induces or represses the transcription of a multitute of genes involved in angiogenesis, metastasis, glucose metabolism and cell surviving. The responsible of the hypoxia-induced transcriptional response is the hypoxia-inducible factor (HIF-1), an heterodimeric transcription factor, consisting of an oxygen-sensitive alpha subunit (HIF- $\alpha$ ), and a constitutive beta subunit (HIF- $\beta$ ), that facilitate both oxygen deprivation. HIF pathway is a positive regulator of tumor growth as its inhibition often results in tumor suppression. In clinical tumor samples, HIF is found elevated and correlates with poor patient prognosis in a variety of cancers. The identification of novel molecules targets for cancer therapy, has led to a shift in drug development, with more emphasis on small molecules that can efficiently inhibit the signaling pathways deregulated in cancer.

**Key words:** Hypoxia; Hypoxia inducible factor; HIF-1; Cancer therapy.

## 1. INTRODUCCIÓN

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células de mamíferos. La deficiencia en este suministro caracteriza aquellas situaciones fisiopatológicas en las cuales existe insuficiente flujo sanguíneo para proporcionar la oxigenación necesaria (Figura 1). El medio hipóxico activa una cascada señalizadora que promueve la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como la angiogénesis (neo-vascularización), metabolismo de la glucosa y supervivencia/muerte celular, etc. La clave de esta respuesta a la hipoxia se encuentra en un factor de transcripción, el factor inducible por hipoxia (HIF). Este factor se sobreexpresa en gran cantidad de cánceres mediante mecanismos dependientes e independientes de la hipoxia y su expresión se asocia con un mal pronóstico en los pacientes.



**Figura 1. Fisiopatología de la hipoxia.** La hipoxia o presión parcial de oxígeno baja ( $pO_2$ ), originada por vascularización defectuosa es una característica de una serie de enfermedades (1).

El HIF es un factor de transcripción  $\alpha/\beta$ -heterodimérico que regula la adaptación celular a la falta de oxígeno. Los niveles bajos de oxígeno son una característica de los tumores sólidos y las respuestas a la hipoxia contribuyen sustancialmente al fenotipo maligno. La transcripción de genes inducida por hipoxia promueve la angiogénesis, invasión, metástasis, desdiferenciación y aumento en el metabolismo glucolítico. Estos efectos están mediados, al menos en parte, por genes cuya expresión se activa por el factor inducible por hipoxia (HIF). El HIF funciona como un heterodímero que comprende una subunidad  $\alpha$  lábil, que depende del oxígeno, y una subunidad  $\beta$  estable no dependiente del oxígeno, también denominada ARNT (transportador nuclear del receptor de hidrocarburos).

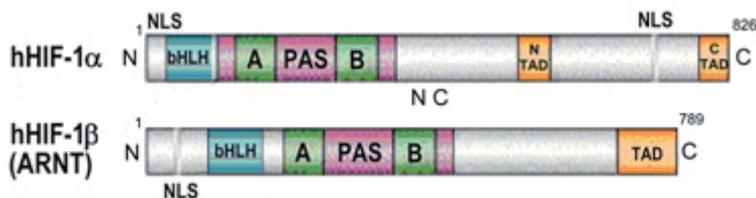
El HIF funciona cuando el nivel de oxígeno en los tejidos es bajo y no funciona cuando dicho nivel se eleva. Ciertas condiciones fisiopatológicas, tales como la isquemia y el cáncer muestran baja oxigenación local tisular debida a vasculatura defectuosa o insuficiente. Las células tumorales muy proliferativas forman rápidamente masas, que al estar localizadas lejos de los vasos sanguíneos, no alcanzan el aporte necesario de oxígeno y nutrientes. En tales condiciones el HIF se activa y, a su vez, activa o reprime la expresión de una amplia variedad de genes que inician la formación de nuevos vasos sanguíneos y modifican el metabolismo, estableciendo así las condiciones favora-

bles para el desarrollo de la masa tumoral y su proliferación. La modulación de los genes estimulados por el HIF, implicados en el metabolismo tumoral y en el control del pH intracelular, puede ser también de gran utilidad en la terapia del cáncer. Sin embargo, antes de intentar profundizar en la aplicación clínica es esencial poseer mayor conocimiento básico de las vías señalizadoras, de los mecanismos moleculares que regulan el HIF y de las consecuencias biológicas de su acción en el metabolismo tumoral, crecimiento e invasión (1, 2).

## 2. ESTRUCTURA DEL HIF-1

Los estudios sobre el elemento de respuesta a la hipoxia del gen de la eritropoyetina condujeron a Semenza y Wang, en 1992 (3), al descubrimiento del HIF-1 y en 1995 (4) a su aislamiento y purificación. La HIF-1 humana es una proteína compuesta por dos subunidades hHIF-1 $\alpha$  y hHIF-1 $\beta$  (ARNT). La estructura de cada subunidad se muestra en la Figura 2.

La estructura muestra dos proteínas HIF bHLH-PAS implicadas en la respuesta a la hipoxia que poseen motivos bHLH y PAS, necesarios para la dimerización, cuya región básica es la que proporciona la unión específica al HRE (elemento de respuesta a la hipoxia), en la secuencia de reconocimiento 5 T/A/G-CGTGH-3 (Figura 2) (4). La presencia de un sitio de unión al DNA para HIF-1 es necesaria, pero no suficiente, para dirigir la expresión de genes en respuesta a la hipoxia, lo que sugiere que el HIF-1 ha de interactuar con otros factores de transcrip-



**Figura 2. Estructura de las dos subunidades que forman el factor inducible por hipoxia humano (HIF-1).** Los motivos bHLH y PAS son esenciales para la dimerización y unión al DNA. bHLH, dominio básico hélice-vuelta-hélice; PAS (PerANRT-Sim) dominio con repeticiones A y B. NLS, señales de localización nuclear; TAD, dominios de transactivación (modificado de (4)).

ción que se unan al DNA en sitios adyacentes. PAS es un dominio Per-Arnt-Sim con sus repeticiones A y B, que se encuentra en ambas subunidades. TAD, el dominio de transactivación, se encuentra en ambas subunidades en el extremo C-terminal, pero la subunidad hHIF-1 $\alpha$ , posee otro dominio N-TAD más cercano al terminal N. Esta bicefalia en el dominio TAD no es corriente entre los factores de transcripción. El C-TAD del HIF-1 $\alpha$  es el lugar de hidroxilación de la asparagina por el factor inhibidor del HIF (FIH), que inhibe la actividad transcripcional de esta subunidad. Ambas subunidades poseen también motivos NLS o señales de localización nuclear en el terminal N, y el hHIF-1 $\alpha$ , posee otro NLS cercano al C terminal.

### 3. HOMEOSTASIS DEL OXÍGENO

El HIF es el principal factor implicado en las respuestas adaptativas a cambios en la oxigenación de los tejidos. Es un  $\alpha/\beta$  heterodímero que consiste en una subunidad, HIF-1 $\beta$ , expresada constitutivamente y otra subunidad, HIF-1 $\alpha$ , cuya expresión se encuentra enormemente regulada. La expresión de esta última la determina el ritmo de su síntesis y degradación. La síntesis del HIF-1 $\alpha$  está regulada por mecanismos independientes del oxígeno, mientras que su degradación se regula principalmente por mecanismos que dependen del oxígeno. Hasta la fecha se han identificado más de 100 genes cuya expresión se activa por el HIF.

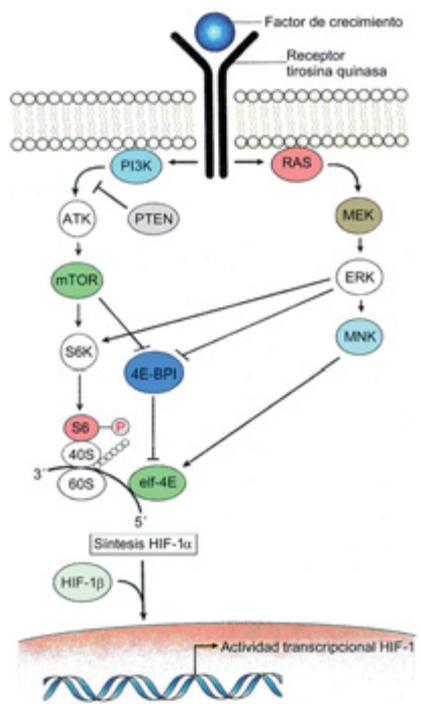
Son de importancia relevante para el cáncer, cuatro grupos de genes cuya expresión se induce por el HIF-1 y codifican las siguientes proteínas: factores angiogénicos, transportadores de la glucosa y enzimas glucolíticos, factores de supervivencia y factores de invasividad.

La expresión de varios de los genes objetivo de HIF-1, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (*vegf*), se induce por hipoxia en la mayoría de tipos celulares. Sin embargo, para la mayoría de los genes objetivo de HIF-1, la expresión se induce por hipoxia de manera específica al tipo celular. Como la actividad del HIF-1 se induce por hipoxia en casi todos los tipos celulares, está claro que el HIF-1 por sí solo, no puede explicar la expresión génica específica, más bien, es la interacción funcional del HIF-1 con otros factores de transcripción lo que determina el subgrupo de genes objetivo de HIF-1 que se

activa en cualquier célula hipóxica particular. El HIF-1 puede ser considerado como un mensajero que se traslada al núcleo para activar la respuesta a la hipoxia a nivel transcripcional. Los detalles de esta respuesta están determinados por la programación del pasado (desarrollo) y el presente (fisiología) de cada célula. Quizás del 1 al 5% de todos los genes humanos se expresan en respuesta a hipoxia en uno o más tipos celulares de manera dependiente del HIF-1. La heterogeneidad en la expresión de dichos genes se observa incluso entre líneas celulares que han derivado de cánceres del mismo tipo histológico. Similares hallazgos se han descrito para la expresión génica dependiente de p53. Un factor adicional es la existencia de la proteína relacionada HIF-2 $\alpha$ , que puede también dimerizar con HIF-1 $\beta$ . Los heterodímeros que contienen HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  tienen especificidades diferentes que se solapan, con respecto a inductores fisiológicos y a la activación de genes. Una tercera proteína relacionada es la HIF-3 $\alpha$ , que parece funcionar inhibiendo la HIF-1 $\alpha$  (1, 2).

#### **4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL HIF-1 $\alpha$**

Los organismos aeróbicos están constantemente obligados a consumir oxígeno. Cuantas más células están presentes en un tejido más oxígeno se necesita. Cuando una célula se divide y da lugar a dos células hijas, el consumo de oxígeno se eleva, por tanto no sorprende que las vías principales que transducen señales proliferativas y de supervivencia a partir de receptores de factores de crecimiento, también han de inducir la expresión de HIF-1 $\alpha$  como estrategia para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno. Las células proliferantes expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que estimula la angiogénesis con el objeto de proporcionar la perfusión adicional requerida para mantener la oxigenación de un número mayor de células. Además las células proliferantes para generar ATP utilizan la ruta glucolítica en lugar del metabolismo oxidativo. La inducción de la angiogénesis y la glucólisis, paralela con la proliferación celular, está mediada en parte por activación de la síntesis del HIF-1. La elevación del HIF-1 en respuesta al estímulo de receptores de factores de crecimiento, difiere de la elevación del HIF-1 $\alpha$  en respuesta a la hipoxia en dos aspectos importantes. Primero, mientras la hipoxia eleva HIF-1 $\alpha$  en todos los tipos celulares, el estímulo mediante factores de crecimiento



**Figura 3. Regulación de la síntesis de la proteína HIF-1 $\alpha$ .** La unión de un factor de crecimiento al receptor tirosina quinasa activa las vías fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). PI3K, a su vez, activa la serina/treonina quinasa (ATK) y mTOR. En la vía MAPK, la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), se activa por la quinasa MAP/ERK (MEK). ERK, a su vez, activa MNK. ERK y mTOR fosforilan la p70S6 quinasa (S6K), que fosforila a la proteína ribosómica S6, y a la proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (eIF-4E), (4E-BP1). La unión de 4E-BP1 a eIF-4E inactiva a la última, al inhibir la traducción dependiente de mRNA. La fosforilación de 4E-BP1 previene su unión a eIF-4E y estimula su actividad directamente. El efecto de la señalización por el factor de crecimiento se refleja en un incremento en el ritmo al cual un subgrupo de mRNA en la célula, incluyendo HIF-1 $\alpha$  mRNA, se traduce en proteínas (modificado de (5)).

induce la expresión de HIF-1 $\alpha$  de manera específica del tipo celular. Segundo, mientras la hipoxia se asocia con la menor degradación del HIF-1 $\alpha$ , los factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas señalizadoras estimulan la síntesis de HIF-1 $\alpha$  vía activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) o de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Figura 3) (5). Estudios con células de cáncer de

mama (MCF-7) estimuladas con heregulina mostraron un incremento en la síntesis de HIF-1 $\alpha$ , que fue inhibida por tratamiento con rapamicina, un antibiótico macrolido que inhibe el objetivo en mamíferos de la rapamicina quinasa (mTOR), que funciona más allá de la PI3K y la AKT (6). El efecto de la heregulina estuvo mediado vía la región 5 - no traducida del mRNA HIF-1 $\alpha$ . Los objetivos conocidos para la fosforilación por mTOR son reguladores de la síntesis proteica (Figura 3). No obstante, no se sabe si la fosforilación de estas proteínas por mTOR es necesaria o suficiente para el incremento de la síntesis de HIF-1 $\alpha$ . La traducción de varias docenas de diferentes mRNA está regulada por esta vía. Las secuencias específicas en la región 5 - no traducida, puede determinar el grado al cual la traducción de cualquier mRNA puede modularse por mTOR (2, 5).

La expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  es muy sensible a cambios en su ritmo de síntesis debido a su vida media extremadamente corta en condiciones no hipóxicas. Además de los efectos sobre la síntesis de HIF-1 $\alpha$ , se ha demostrado que la activación de la vía señalizadora RAF-MEK-ERK estimula la función del dominio de transactivación de HIF-1 $\alpha$ . Este efecto se debe, al menos en parte, a la fosforilación por ERK del coactivador p300, con el cual interaccionan los dominios de transactivación. A diferencia de la hipoxia, que induce la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  en todos los tipos celulares, la regulación de la actividad HIF-1 por señalización por factores de crecimiento es específica de la célula. Por ejemplo, en células MCF-7, la heregulina induce la síntesis proteica de HIF-1 $\alpha$ , pero no induce la función del dominio de transactivación, mientras que el tratamiento de células de cáncer de próstata (PC-3) con rapamicina inhibe la estabilidad y la función del dominio de transactivación del HIF-1 $\alpha$ . Las mutaciones oncogénicas que activan las vías de transducción de señales, inducen la actividad de HIF-1 $\alpha$  por varios mecanismos.

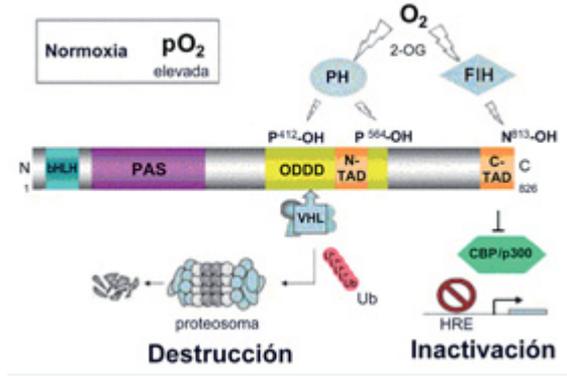
Las mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores se asocian con mayor actividad del HIF-1. La pérdida de la función VHL origina una elevación notable en la actividad HIF-1 en condiciones no hipóxicas, debido a la alteración en la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma del HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ . Aunque la regulación, dependiente del O<sub>2</sub>, de la transactivación está todavía intacta, HIF-1 puede llegar a ser limitante en condiciones de sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , que conducirían a un incremento en HIF-1

transcripcionalmente activo, en condiciones no hipóxicas, en células carentes de VHL. Para algunos otros oncogenes y genes supresores de tumores, la mutación no solo tiene un efecto marcado en la progresión al cáncer, sino también sobre la actividad del HIF-1. Algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2) y el factor transformante del crecimiento alfa ( $TGF\alpha$ ), son también genes objetivo de HIF-1. La unión de estos factores a sus receptores -el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), respectivamente- activan vías de transducción de señales que conducen a la expresión del HIF-1 $\alpha$  y a la proliferación y supervivencia celulares. Por tanto, el HIF-1 contribuye a las vías de señalización autocrinas que son cruciales para la progresión al cáncer. Los mecanismos que conducen a los elevados niveles de HIF-1 $\alpha$  han sido esclarecidos mediante experimentos en líneas celulares cancerosas y se han complementado con demostraciones inmunohistoquímicas de sobreexpresión del HIF-1 $\alpha$  en biopsias de cáncer humano (2).

## 5. CAMBIOS POST-TRADUCCIONALES EN EL HIF-1 $\alpha$

La señalización vía factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  requiere múltiples modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son las que regulan la vida media del HIF-1 $\alpha$  y van a mediar su desestabilización y degradación. Entre estos cambios post-traduccionales cabe citar: las prolina hidroxilasas, la unión a la proteína VHL, la hidroxilación de la asparragina, la acetilación de la lisina y la acción de las quinasas (7).

Dos prolina hidroxilasas (PH) dependientes de oxígeno, que hidroxilan la subunidad alfa del heterodímero HIF  $\alpha/\beta$ , determinan su estabilidad y actividad. La hidroxilación de los residuos de prolina en el dominio de degradación, dependiente de oxígeno (ODDD) del HIF-1 (prolinas 402 y 564 del HIF-1 $\alpha$  humano), señala la unión del HIF-1 $\alpha$  a un complejo ubiquitina ligasa E3 que contiene la proteína von Hippel-Lindau (VHL) (Figura 4). VHL junto con un grupo de proteínas, elongina B elongina C, Cul 2 y Rbx-1, regula la vida media de HIF-1 $\alpha$  en células bien oxigenadas. La interacción del HIF-1 $\alpha$  con VHL se acelera por acetilación del residuo lisina en 532, mediante una acetil transferasa (ARD1). La eliminación del HIF-1 $\alpha$  ocurre median-



**Figura 4. La hidroxilación es la clave de la regulación del HIF- $\alpha$ .** En condiciones normóxicas (niveles elevados de pO<sub>2</sub>) la prolin hidroxilasa (PH) y el factor inhibidor de HIF-1 (FIH) son activos. Estas dioxigenasas usan oxígeno y 2-oxoglutarato (2-OG), para hidroxilar dos residuos prolina situados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) y un residuo asparragina en el dominio de activación transcripcional C-terminal (C-TAD). La hidroxilación de las prolinas señala la unión a la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que contiene el complejo ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina al HIF-1 $\alpha$  marcándolo para su destrucción por el proteosoma. La hidroxilación del residuo asparragina promueve la interacción con un co-activador el CBP/p300 que modula la respuesta del HIF-1 $\alpha$  (modificado de (2)).

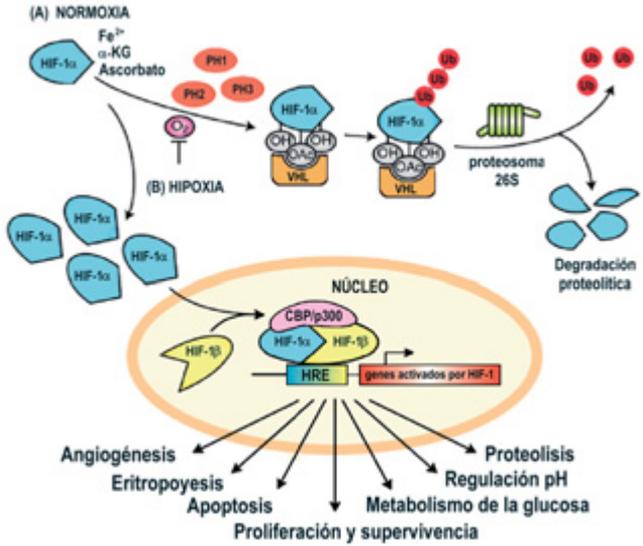
te la ubiquitinación post traduccional y posterior reconocimiento por la maquinaria destructora del proteosoma (Figura 4). Así que, en presencia de oxígeno y pocos minutos después de su síntesis, la subunidad HIF-1 $\alpha$  sufre hidroxilaciones, se ubiquitina y se degrada por el proteosoma (2, 8, 9).

Las mutaciones en el gen *vhl*, que conducen a la pérdida de su función, se asocian con el carcinoma de células renales (RCC) y con la enfermedad VHL, un síndrome familiar. El HIF-1 $\alpha$  es, por tanto, estable y activo en estas patologías e induce la transcripción de genes cuyos productos actúan promoviendo la vascularización en los tumores. Estas observaciones dan buena cuenta de la estrecha conexión existente entre HIF, angiogénesis y tumorigénesis (10, 11).

La PH, de la que existen tres isoformas, se regula a varios niveles. La concentración de oxígeno, no solo determina la actividad PH sino también su expresión, ya que los genes *phd2* y *phd3*, pero no *phd1*, se regulan por hipoxia/HIF (12). Esta regulación *feedback* asegura la rá-

vida intervención cuando la concentración de oxígeno se restablece a un nivel elevado. Al igual que ocurre con el HIF-1 $\alpha$ , la PH está sometida a la degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma, pero por diferentes ubiquitina E3 ligasas, Siah1 y Siah2, las cuales a su vez, se regulan también por el HIF (13). Además de oxígeno elevado, las PH requieren 2-oxoglutarato (2-OG) como cosustrato y ascorbato y Fe<sup>2+</sup> como cofactores. El 2-OG es un metabolito del ciclo tricarboxílico (TCA), cuya concentración está regulada por el propio ciclo TCA. Para añadir otro nivel de complejidad, el succinato producido por la reacción hidroxilasa y por el ciclo TCA, actúa como inhibidor. Es interesante destacar que las mutaciones en enzimas del ciclo TCA, tales como la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarato hidratasa o fumarasa (FH), se encuentran conectadas con la tumorigénesis (12). Tanto la SDH como la FH se han identificado como supresores de tumores y la pérdida de su función por mutaciones, conduce a la acumulación de succinato y fumarato, respectivamente. En estas condiciones el HIF-1 $\alpha$  es estable y el HIF-1 activa o reprime genes.

Si por cualquier razón el flujo de eventos que conduce a la destrucción del HIF-1 $\alpha$  no se completara o fuera defectuoso, y alguna proteína HIF-1 $\alpha$  escapara de la degradación, la actividad HIF-1 $\alpha$  sería, no obstante, inhibida por otra hidroxilasa dependiente de oxígeno, denominada factor inhibidor del HIF-1 (FIH). La hidroxilación por este enzima se verifica en un residuo asparragina (813), situado en el dominio de activación transcripcional, que se encuentra en el terminal C (C-TAD) de la subunidad HIF-1 $\alpha$ , con la inhibición resultante de la interacción con las proteínas de unión (CBP) a los coactivadores transcripcionales (CREB) y p300. Así que, las células han desarrollado un mecanismo adicional en el caso de malfuncionamiento de la PH, aunque esto puede reflejar también un mecanismo para la inducción selectiva de genes. En presencia de bajos niveles de oxígeno (hipoxia), o en condiciones de elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (14), estos enzimas no funcionan y el HIF-1 $\alpha$  es estable y tiene la capacidad de translocarse al núcleo donde interacciona con la subunidad beta que, se expresa de manera constitutiva no influenciada por la concentración de oxígeno. El complejo  $\alpha/\beta$  HIF se une entonces a los elementos responsables de la hipoxia (HRE) de los genes cuya transcripción va a ser regulada. Cada vez son más los genes identificados, y se ha demostrado que al menos 70



**Figura 5. Regulación de la actividad de la HIF-1 $\alpha$  por hidroxilación de las prolinas catalizada por las PH.** (A) En las condiciones de normoxia la PH hidroxila los residuos de prolina 402 y 504. Esta hidroxilación causa la unión del HIF-1 $\alpha$  al supresor tumoral VHL (Von-Hipel-Lindau) y promueve la ubiquitinación del HIF-1 $\alpha$  y su degradación por el proteosoma. (B) En condiciones de hipoxia HIF-1 $\alpha$  se estabiliza, se trasloca al núcleo donde heterodimeriza con HIF-1 $\beta$  y se une al HRE donde activa la expresión de genes implicados en la angiogénesis, eritropoyesis, apoptosis, proliferación y supervivencia, proteolisis, regulación del pH y metabolismo de la glucosa (modificado de (12)).

son activados por el complejo HIF. Los más investigados son aquellos implicados en la angiogénesis, vasodilatación, eritropoyesis, metabolismo anaeróbico de la glucosa, apoptosis proliferación y supervivencia (Figura 5), pero también interesan los genes implicados en otras funciones como la inflamación y diferenciación en el desarrollo embrionario. Aunque el HIF aumenta la actividad transcripcional de la mayoría de genes, también puede reprimir la transcripción de otros, mediante mecanismos aún poco estudiados. HIF-1 $\alpha$  se encontraría en situación estable, se traslocaría al núcleo, donde al formar complejo con el HIF-1 $\beta$  y unirse al HRE, realizaría su misión de activar/reprimir genes.

## 6. SELECTIVIDAD DE LA INDUCCIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE HIF

El factor HIF puede inducir selectivamente diferentes genes mediante dos mecanismos que dependen: (a) de la isoforma o (b) del dominio de activación transcripcional (TAD) (2).

### 6.1. Selectividad dependiente de la isoforma

La subunidad HIF- $\alpha$  existe en células humanas como tres isoformas expresadas por *locus* individuales. Existe gran similitud en las secuencias proteicas de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  (total, 48%; bHLH, 85%; PAS-A, 68%; PAS-B, 73%) y ambas están sometidas a la misma regulación post traduccional. La menos estudiada es la HIF-3 $\alpha$ , que parece jugar un papel dominante negativo en la respuesta hipóxica. Según datos consultados parece que HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  pueden ser selectivos en los genes que inducen o reprimen. Por ejemplo, el gen que codifica la anhidrasa carbónica 9, se induce predominantemente por la subunidad HIF-1 $\alpha$ , mientras que el de la HIF prolina hidroxilasa 3 (*phd3*) se induce por HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ . El que ciertos genes sean inducidos por una u otra subunidad o la especificidad del tipo celular con expresión dominante de una u otra es algo todavía no esclarecido (12).

### 6.2. Selectividad dependiente de la activación transcripcional

Ambos HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  poseen dos dominios de activación transcripcional (TAD). Esta característica bicéfala no es corriente en los factores de transcripción; la mayoría de ellos tiene solo un TAD. Los TAD NH<sub>2</sub> y COOH-terminales: N-TAD y C-TAD del HIF-1 $\alpha$  humano no presentan más que un 20% de similitud en la secuencia proteica, mientras que la secuencia proteica N-TAD de HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  comparten un 60% de identidad con la HIF-1 $\alpha$  humana, respectivamente. La HIF-1 $\alpha$  C-TAD humana está bien conservada cuando se compara con la HIF-2 $\alpha$  C-TAD humana (más del 70%). Además, ambos dominios N-TAD y C-TAD muestran elevada conservación de la secuencia proteica entre las especies (más del 90%). Como se mencionó anteriormente, la actividad transcripcional de HIF se inhibe por la

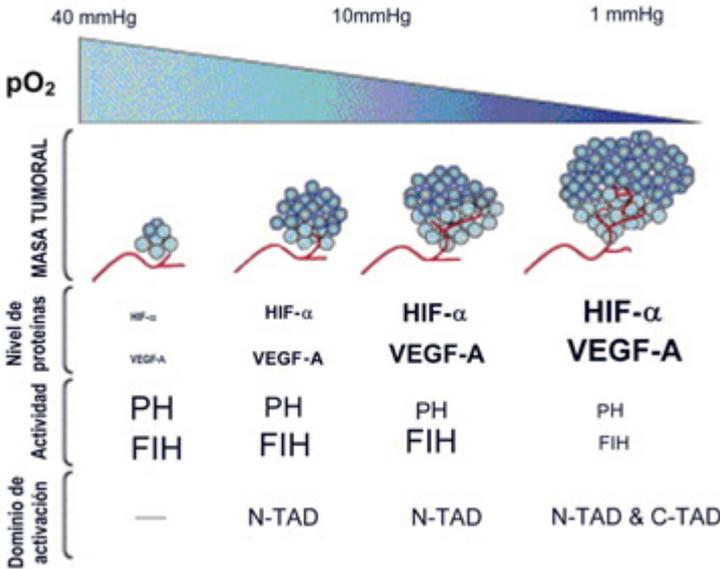
hidroxilación del residuo asparragina del dominio C-TAD por la FIH. Así que, la modulación del nivel de expresión, hacia arriba o hacia abajo, de la FIH conduce respectivamente a afianzar o eliminar la actividad C-TAD. Con este procedimiento se ha demostrado la existencia de dos grupos de genes, inhibidos o no inhibidos por FIH y conducidos respectivamente por el C-TAD (con o sin el N-TAD) o el N-TAD. Dado que los dos sensores del oxígeno la PH y la FIH tienen diferente  $K_m$  para el oxígeno, y que la PH requiere para su actividad mayor concentración de oxígeno que la FIH, se ha postulado que en áreas cercanas a los vasos sanguíneos, donde las células están más oxigenadas, la PH estará activa lo que ocasionará la completa degradación del HIF-1 $\alpha$ . Una caída en la presión de oxígeno inactivará primero a la PH, lo que origina la estabilización del HIF-1 $\alpha$ , no obstante con el mantenimiento de la actividad C-TAD, la FIH continuará activa (Figura 6). Con una posterior caída en oxígeno, la inhibición total de los dos sensores, conllevará a la estabilización completa de HIF-1 $\alpha$  y a una total liberación de C-TAD, capacitándole para interactuar con los cofactores (2, 16).

Así que, la liberación de C-TAD se producirá solo en condiciones de severa hipoxia cuando la FIH se inhiba totalmente. Por tanto, la expresión de genes dependientes de N-TAD y C-TAD o N/C-TAD estará mediada por el gradiente del oxígeno en los tejidos. En condiciones suaves de hipoxia se expresarán los genes dependientes solo de N-TAD. Por el contrario en hipoxia severa se llegará a la total activación de los genes sensibles a la familia de C-TAD o N/C-TAD.

## 7. METABOLISMO TUMORAL EN HIPOXIA

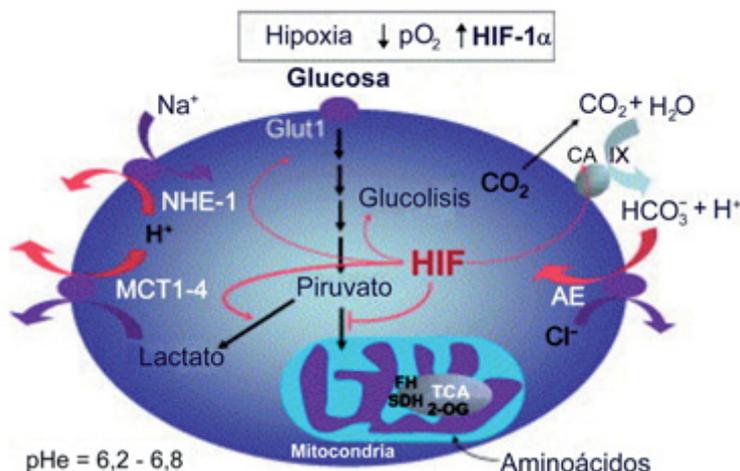
La estabilización y activación de HIF tiene efectos profundos sobre el metabolismo, en particular sobre la utilización de la glucosa (glucolisis) y la síntesis proteica. Esto, a su vez, repercute en el destino celular que conduce a la supervivencia o muerte celular y posible metástasis.

La glucosa se metaboliza siguiendo una cadena de reacciones que van, desde el transporte de la glucosa, glucolisis, ciclo tricarbóxico y fosforilación oxidativa (Figura 7). La última etapa, la fosforilación oxidativa en la mitocondria es la vía principal que utiliza la célula



**Figura 6. Selectividad del dominio de activación transcripcional de la transcripción dependiente de HIF.** La  $pO_2$  cae progresivamente en tanto en cuanto el tumor se distancia de los vasos sanguíneos y la masa tumoral se expande. Se detecta una elevación paralela en el nivel de HIF-1 $\alpha$  estable y en el efector VEGF-A. Las prolinas hidroxilasas (PH) son más sensibles a una caída en  $pO_2$  que el factor inhibidor del HIF-1 (FIH), como se sugiere por la determinación in vitro de las  $K_m$ . Así que las PH se inhiben antes que las FIH cuando disminuye el oxígeno. A concentración moderada de oxígeno se acumulará algún HIF-1 $\alpha$  estable, pero los genes dependientes de su C-TAD no se inducirán totalmente debido a la restricción impuesta por la actividad FIH. Sin embargo, los genes que requieren solo N-TAD serán inducidos. Una posterior caída en  $pO_2$  prevendrá la hidroxilación por FIH y eliminará la inhibición de C-TAD permitiendo la unión del co-activador transcripcional CBP/p300, condiciones en las que HIF-1 conseguirá la completa actividad funcional (modificado de (2)).

para generar ATP, y es dependiente del oxígeno. Por tanto, las células hipóxicas han de encontrar una vía alternativa para obtener suficiente ATP para sobrevivir. La glucólisis citoplasmática también produce ATP, pero 18 veces menos. Aumentando el ritmo de incorporación de glucosa y de la glucólisis, mediante la activación mediada por HIF de la expresión de los transportadores de la glucosa y enzimas de la vía glucolítica citoplasmática, las células hipóxicas elevan el suministro de ATP. De esta manera, la glucólisis en las células hipóxicas compensa la menor producción de ATP debida a la menor fosforilación oxi-



**Figura 7. Metabolismo tumoral en hipoxia.** Las células tumorales responden al medio hipóxico elevando la expresión de transportadores de glucosa Glut1 y enzimas de la glucólisis. En células normales, el piruvato generado en la glucólisis se metaboliza mediante el ciclo tricarbóxico (TCA) y la fosforilación oxidativa, muy eficiente en la producción de energía. Sin embargo, en condiciones hipóxicas el piruvato se convierte en lactato debido a la limitación de la fosforilación oxidativa. Como esta opción es menos eficiente en la producción de energía, las células tumorales lo compensan incrementando la incorporación y el metabolismo de la glucosa. La acumulación de lactato contribuye a la acidosis, característica de los tumores. Para mantener el equilibrio entre el pH extra e intracelular, el lactato tiene que salir de la célula vía el transportador H<sup>+</sup>/lactato monocarboxilato (MCT1-4), mientras que el H<sup>+</sup> sale por intercambiador activable por factor de crecimiento y sensible al amilórido Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE-1). El CO<sub>2</sub> generado se convierte en ácido carbónico por el ectoenzima unido a membrana la anhidrasa carbónica (CA) IX o XII y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, una base débil, se incorpora a la célula por transportadores dependientes de Na<sup>+</sup> e independientes de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> lo que consigue elevar el pH intracelular. El co-sustrato 2-oxoglutarato (2-OG) requerido para la actividad de las hidroxilasas PH y FIH se genera en el ciclo TCA. El catabolismo de los aminoácidos es también una fuente de 2OG. La producción de succinato o fumarato por enzimas de ciclo TCA, succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa o fumarasa (FH) conduce a la inhibición “feedback” de estas hidrolasas (modificado de (2)).

dativa en la mitocondria. El elevado ritmo de incorporación de la glucosa en tumores puede visualizarse utilizando la tomografía de emisión de positrones (PET) después de la inyección a los pacientes de glucosa radioactiva no metabolizable [fluor-18] 2-desoxi-2-fluoro-d-glucosa, detectando su acumulación en tumores sólidos, lo cual es

predictivo de tumores agresivos. Se sabe que los tumores tienen una elevada tasa de glucolisis, incluso cuando la concentración de oxígeno es favorable para la fosforilación oxidativa (2, 17).

En el *metabolismo glucolítico*, una molécula de glucosa se convierte en dos de piruvato y se generan dos moléculas de ATP y NADH. El NADH se utiliza para reducir el piruvato a lactato. En el *metabolismo oxidativo*, el piruvato, derivado de la glucosa, entra en la mitocondria y en el ciclo TCA se convierte en acetil Coenzima A y  $\text{CO}_2$ . El NADH y el  $\text{FADH}_2$  generado en este proceso proporcionan electrones a los citocromos de la cadena respiratoria y por último al oxígeno, generando ATP. La oxidación completa de una molécula de glucosa origina 36 moléculas de ATP.

No obstante, oncogenes tales como *c-myc* y *akt*, que se consideran implicados en la proliferación y supervivencia celular en cáncer, activan también el metabolismo glucolítico citoplasmático y pueden actuar en concierto con el HIF. Otra conexión interesante entre cáncer y disfunción mitocondrial se demostró con el hallazgo que la última etapa de la cadena electrónica mitocondrial concerniente a la citocromo c oxidasa, depende de p53 (2).

Otra característica de los tumores, reconocida desde hace tiempo, es su *bajo pH intersticial*. Las células tumorales producen principalmente dos ácidos: ácido láctico y ácido carbónico, resultantes del metabolismo de la glucosa. El piruvato producido en la glucolisis en células hipóxicas, en lugar de entrar en el ciclo TCA, se reduce a ácido láctico (18). Esta reacción está promovida también por el HIF mediante la activación del gen que codifica la lactato deshidrogenasa A y mediante la restricción de la actividad piruvato deshidrogenasa. El número de  $\text{H}^+$  producidos por molécula de ATP es seis veces mayor en la glucolisis anaerobia que en la glucolisis-ciclo TCA-fosforilación oxidativa. Por consiguiente, la concentración tisular de  $\text{CO}_2$  se eleva así como los  $\text{H}^+$  que generan y son tamponados con bicarbonato. Para mantener la homeostasis del pH las células tienen que recurrir a la acción de una serie de bombas, intercambiadores y transportadores (Figura 7). La familia de proteínas transportadoras de monocarboxilato (MCT) excretan lactato y  $\text{H}^+$ , mientras que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que se activa por factores de crecimiento y es sensible al amilórido (NHE-1), intercambia el  $\text{H}^+$  intracelular por el  $\text{Na}^+$  extracelular.

Las anhidrasas carbónicas (CA) son ectoenzimas unidos a membranas, que se inducen por hipoxia. Las CA IX y CA XII, transforman rápidamente el  $\text{CO}_2$ , que se difunde a través de la membrana, a ácido carbónico. Los intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  dependientes e independientes de  $\text{Na}^+$  (AE) contribuyen a la alcalización del pH intracelular. De esta manera, una sobrecarga en la salida de la célula de los ácidos láctico y carbónico llevará a una bajada en el pH extracelular (acidosis). La modulación de la acidosis tumoral en fibroblastos transformados por Ras, por disminución de la expresión de los genes *nhe1* o *pgi* (fosfogluco isomerasa, enzima de la ruta glucolítica), ha mostrado tener capacidad de inhibir la tumorigénesis. La expresión y actividad del NHE-1 y la expresión de la isoforma MCT4 se regulan por hipoxia y la CA IX es uno de los productos genéticos más intensamente inducidos por HIF (2).

Los suministros de oxígeno y nutrientes van siempre unidos, ya que ambos son transportados a los tejidos por el sistema vascular, y las limitaciones de uno (hipoxia) o de los otros (escasez de nutrientes), origina la inhibición de la vía mTOR, que controla la síntesis proteica y el crecimiento. La activación de mTOR se verifica en presencia de factores de crecimiento, hormonas, aminoácidos y componentes extracelulares, a través de vías señalizadoras tales como las Ras/ERK y PI3K/Akt que convergen en el complejo TSC1/2 anterior a mTOR. Por otro lado, la represión de mTOR en hipoxia, ocurre directamente mediante la activación del complejo TSC1/2, que depende, a su vez, de activación de la proteína REDDI/RTP801, dependiente de HIF. Hay que destacar que las mutaciones en el supresor tumoral TSC1/2 conducen a la esclerosis tuberosa compleja (TSC), un síndrome caracterizado por la formación de tumores benignos denominados hamartomas. TSC1/2 se regula también por el gen supresor tumoral *pten* (*fosfatasa y tensina*), cuando las mutaciones de pérdida de función en *pten* originan acumulación del HIF-1 $\alpha$  posiblemente vía activation de mTOR. Una conexión reguladora entre hipoxia y metabolismo tumoral puede existir a través de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por mTOR. La hipoxia y la escasez de nutrientes inhiben la clásica traducción cap-dependiente, pero el mRNA que contienen los sitios de entrada del ribosoma interno (IRES), puede todavía ser traducido. Ambos HIF-1 $\alpha$  y su gen objetivo *vegf-A* contienen secuencias tales, que en condiciones de estrés, mantienen la inducción de la angiogénesis (2).

La respuesta metabólica de las células a la *hipoxia* y a la *escasez de nutrientes* es una estrategia que permite a las células adaptarse y sobrevivir, pero cuando las condiciones se vuelven extremas hay que buscar otras tácticas. La última en supervivencia es la macroautofagia, un mecanismo en el cual las células se alimentan de si mismas para enfrentarse a la falta de nutrientes. La macroautofagia comprende la degradación del grueso de las proteínas celulares por un sistema lisosómico/vacuolar. Sorprende que la macroautofagia esté regulada por la vía PI3K/Akt/mTOR. Este proceso es de gran importancia para la tumorigénesis por la implicación del objetivo genético proapoptótico del HIF, la proteína 2 que interacciona con *Bcl-2/adenovirus E1B* (BNIP3). Además, la muerte celular mediada por BNIP3, requiere la eliminación de factores de crecimiento, acidosis o privación de glucosa. Así que, dependiendo de la intensidad y duración de la exposición de las células al estrés hipóxico y su respuesta metabólica, las células pueden seguir la vía de la supervivencia o de la muerte (2).

La hipoxia y la acidosis tumoral resultante pueden influenciar no solo la tumorigénesis sino también la *metástasis*. La metastasis implica la alteración de la unión célula-célula y de los contactos célula-matriz, que promueven la migración celular a través de las membranas basales y del estroma de los tejidos, hacia la circulación sanguínea y el sistema linfático. Un número importante de proteínas implicadas en la metástasis se inducen por HIF: vimentina, fibronectina, queratinas 14, 18, 19, metaloproteinasas de la matriz 2, catepsina D y el receptor de la uroquinasa activadora del plasminógeno. El microambiente ácido de los tumores puede modular la actividad de las proteasas y se han encontrado concentraciones elevadas de lactato que se relacionaron con la incidencia de metástasis. También, la E-cadherina, que juega un papel clave en la adhesión celular y la transición epitelio mesenquima, está reprimida por la activación de HIF en células de cáncer renal. La represión ocurre mediante la estabilización y activación del factor nuclear Snail. El producto de gen objetivo de HIF, la lisina oxidasa 2, induce un cambio conformacional en Snail, que conduce a su parcial estabilidad por represión de la expresión de la E-cadherina y así la invasión se conecta con la hipoxia/HIF en células de carcinoma renal. Ciertos factores que promueven la migración celular son también genes objetivo del HIF tales como el *factor*

*de motilidad autocrina* (que codifica la fosfoglucoasa isomerasa), el protooncogen que codifica el receptor tirosina quinasa c-MET y el receptor de citoquinas CXCR4.

## 8. HIF-1 EN LA TERAPIA DEL CÁNCER

El HIF-1 juega un papel clave en la reprogramación del metabolismo en el cáncer al activar los genes que codifican los transportadores de la glucosa y los enzimas glucolíticos, que incorporan la glucosa y la convierten en lactato; la piruvato deshidrogenasa quinasa 1, que desvía el piruvato fuera de la mitocondria; y el BNIP3 que desencadena la autofagia selectiva mitocondrial. El desvío del metabolismo oxidativo hacia metabolismo glucolítico, es lo que permite el mantenimiento de la homeostasis redox y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia prolongada (19, 20).

La hipoxia intratumoral se ha considerado una fuerza que conduce a la progresión tumoral con pronóstico negativo en los pacientes. El descubrimiento de los HIF, que median las respuestas transcripcionales a los cambios en la concentración de oxígeno, ha renovado el interés por descubrir y desarrollar terapias dirigidas en base al microambiente hipóxico tumoral. Las células cancerosas están expuestas a un gradiente de oxígeno que fluctua en tiempo y espacio, el cual desencadena la activación de vías de supervivencia que no se inducen normalmente en tejidos normales y que pueden ser potencialmente dirigidos para propósitos terapéuticos (21, 22).

## 9. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DEL HIF-1 $\alpha$

Un gran número de agentes que inhiben la expresión y actividad del HIF-1, pueden proporcionar medios útiles para su desarrollo clínico (Figura 8). De acuerdo con su mecanismo de acción estos inhibidores del HIF pueden ser clasificados como agentes que modulan lo siguiente: expresión del mRNA del HIF-1 $\alpha$ , traducción del HIF-1 $\alpha$ , degradación del HIF-1 $\alpha$ , unión al DNA del HIF-1 $\alpha$  y actividad transcripcional del HIF-1 $\alpha$  (23, 24).

### 9.1. Inhibidores de la expresión del HIF-1 $\alpha$ mRNA

El acúmulo del HIF-1 $\alpha$  se controla principalmente a nivel de su síntesis o degradación y la mayor parte de los inhibidores, identificados hasta la fecha, de la actividad del HIF-1 $\alpha$  se dirigen a estas vías. Sin embargo, parece ser que en condiciones de hipoxia la concentración del HIF-1 $\alpha$  mRNA puede ser un factor limitante que afecte la traducción de la proteína (25) y se cree que moléculas pequeñas inhibitoras pueden afectar la expresión del HIF-1 mRNA y como consecuencia la traducción del HIF-1. Un hecho interesante que puede añadir especificidad a la inhibición del HIF-1 $\alpha$  es el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos al HIF-1 $\alpha$  (EZN-2698) (26). El EZN-2698 es muy específico y se une al HIF-1 $\alpha$  mRNA con elevada afinidad causando la inhibición de su expresión y por consiguiente la reducción de la concentración de HIF-1 $\alpha$ , tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento con EZN-2698 *in vitro* inhibió el crecimiento de células tumorales, inhibió la expresión

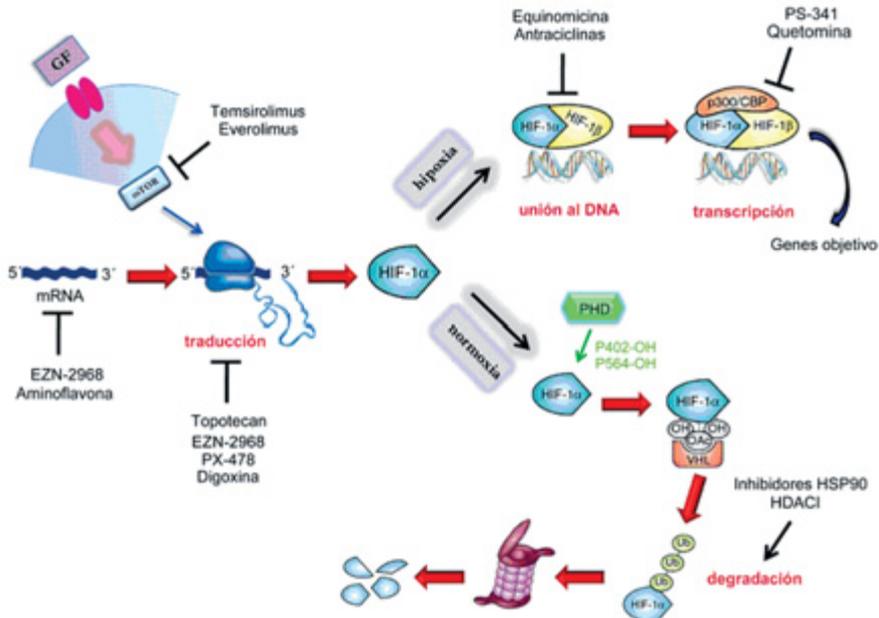


Figura 8. Mecanismos de acción propuestos de los inhibidores del HIF-1 (modificado de (21)).

de los genes objetivo del HIF-1 $\alpha$  y alteró la capacidad de las células HUVEC de formar tubos. La administración de EZN-2968 *in vivo* disminuyó la concentración del HIF-1 $\alpha$  endógeno y la del VEGF mRNA en hígado de ratón normal y mostró actividad antitumoral en modelos trasplantados de cáncer humano de próstata (DU145). Resultados preliminares en pruebas clínicas en fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados indican que el EZN-2968 puede administrarse sin efectos adversos y que su actividad se ha observado en un paciente con carcinoma metastático renal (RCC). Sin embargo, se requieren más estudios que aseguren la limitación de los oligonucleótidos antisentido sobre los tejidos tumorales.

Otro agente que parece afectar la expresión del HIF-1 $\alpha$  mRNA es la aminoflavona (AF), un ligando del receptor aril-hidrocarburo (AhR), que se encuentra en la actualidad en la fase I de las pruebas clínicas en pacientes con cáncer metastático. Como el AhR dimeriza con el HIF-1 $\alpha$ , ha sido interesante probar si la activación farmacológica de la vía AhR usando AF, podía afectar la concentración del HIF-1 $\alpha$ . Estos estudios han demostrado que la AF inhibe la acumulación del HIF-1 $\alpha$ , pero de una manera independiente del AhR. El mecanismo propuesto, aunque no el exacto de la inhibición del HIF-1 por la AF es la modulación de la expresión del HIF-1 $\alpha$  mRNA (21).

## 9.2. Inhibidores de la traducción de la proteína HIF-1 $\alpha$

Aunque son todavía poco conocidos los mecanismos implicados en la regulación de la hipoxia sobre la traducción del HIF-1 $\alpha$ , diversos agentes se han descrito que pueden afectar la síntesis de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Uno de los primeros agentes descritos es el topotecan, un agente quimioterapéutico aprobado por la FDA, usado en la actualidad como terapia de segunda línea en pacientes con cáncer de células pequeñas o cáncer de ovario. El topotecan es un análogo de la camptotecina que inhibe la topoisomerasa I al inducir la formación de complejos estables Top1-DNA, los cuales en el caso de replicación del DNA generan roturas en la doble cadena y citotoxicidad. Hay que destacar que el topotecan inhibe la traducción del HIF-1 $\alpha$  por un mecanismo dependiente de Top1, pero independiente de la lesión al DNA, lo que sugiere que la citotoxicidad y la inhibición del HIF-1 $\alpha$  están mecanísticamente separadas (27). Además, la administración diaria

de dosis bajas de topotecan en un modelo de ratón con trasplante de glioma, inhibió la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , la angiogénesis y el crecimiento tumoral. La administración diaria de topotecan en combinación con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, ejerce actividad antitumoral sinérgica en modelos de trasplantes, lo que proporciona una prueba para el desarrollo clínico de esta estrategia combinatoria (28). Un estudio piloto en el que se administre topotecan a diario por vía oral a pacientes con cáncer metastático refractario proporcionaría evidencia de si este agente es capaz de afectar la señalización de HIF-1 en tejido tumoral. La capacidad de inhibir la traducción de HIF-1 $\alpha$  parece estar compartida por todos los agentes que inhiben Top1. Como el topotecan tiene una vida media corta, cuando se administra a pacientes, es lógico pensar que otros inhibidores de la topoisomerasa I con farmacocinéticas más favorables pueden ser más idóneos para la supresión crónica de la vía HIF-1. En este aspecto un agente interesante es el EZN-2208, una forma PEGilada de SN38, el componente activo CPT-11 (Irinotecan Pfitzer, New York, NY, USA; Yakult Honsha, Tokyo, Japan), que se caracteriza por mejorar la farmacocinética y por una notable actividad antitumoral en modelos pre-clínicos de tumores humanos sólidos y linfomas, incluyendo tumores resistentes CPT-11. La actividad de EZN-2208 ha sido demostrada en tumores refractarios CPT-11, por su capacidad de inhibir la acumulación del HIF-1 $\alpha$ , actuando así sobre el microambiente del tumor más que sobre las células cancerosas (29). El EZN-2208 se encuentra en pruebas clínicas en fase I y II en estudios en combinación. Los glucósidos cardiacos son otra clase de agentes que afectan la traducción HIF-1 $\alpha$ . En particular la digoxina se ha identificado como un inhibidor potente de la actividad del HIF-1 (30), porque inhibe la traducción del HIF-1 $\alpha$  por un mecanismo independiente de mTOR y mostró actividad antitumoral en modelos trasplantados. Así que, la digoxina, utilizada para el tratamiento del fallo cardiaco y arritmias, se está analizando en una fase I de pruebas clínicas como potencial agente anticáncer. De acuerdo con estos resultados, el fraccionamiento de un extracto con solvente orgánico de la planta *Crossosoma bigelovii* llevó al descubrimiento de un nuevo glucósido, la estrofantidina que también inhibió la actividad transcripcional de HIF-1 (31). Otro inhibidor del HIF-1, que se encuentra en fase I de pruebas clínicas en pacientes con cáncer metastático avanzado, es el PX-478. Este agente mostró actividad antitumoral notable en una variedad de mo-

delos trasplantados con tumores humanos, la cual parece relacionarse con niveles de expresión del HIF-1 $\alpha$  (32). El PX-478 inhibió la expresión de HIF-1 $\alpha$  de manera independiente de pVHL y p53. La inhibición ocurre a muchos niveles, ya que se han propuesto tres mecanismos que pueden contribuir a aminorar la acumulación del HIF-1 $\alpha$ . También se ha sugerido que el PX-478 inhibe la desubiquitinación del HIF-1 $\alpha$ , lo que conlleva mayor degradación del HIF-1 $\alpha$  poliubiquitinado, reducción de la expresión del HIF-1 $\alpha$  mRNA que afecta la traducción del HIF-1 $\alpha$  (33). Una vía señalizadora, implicada en la inducción de la traducción de HIF-1 $\alpha$ , dependiente de factores de crecimiento es mTOR. Sin embargo, mTOR y la síntesis global de proteínas se inhiben en casos de hipoxia severa, y por esto, la contribución de estas vías a la traducción del HIF-1 $\alpha$  bajo hipoxia se conoce aún muy poco (34). Varios inhibidores de mTOR, como el temsirolimus y el everolimus, agentes aprobados por el FDA para el tratamiento del cáncer renal, inhiben la actividad del HIF-1 $\alpha$ . Las pruebas clínicas han demostrado la eficacia de estos agentes en el tratamiento del RCC. En un estudio clínico de fase III, el temsirolimus administrado como único agente, mejoró significativamente la supervivencia total de pacientes con RCC avanzado y mal pronóstico, comparado con el tratamiento con IFN $\alpha$  (35). La administración de everolimus a pacientes con RCC metastático, que progresó después de terapias dirigidas al VEGF, prolongó la supervivencia frente al placebo en una prueba clínica de la fase III randomizada (36). Están en curso ensayos clínicos para evaluar el potencial de los inhibidores de mTOR como agentes únicos o en combinación, para el tratamiento de otros cánceres sólidos. Si la inhibición del HIF-1 $\alpha$  puede contribuir a la actividad terapéutica de esta clase de agentes en otros cánceres que el renal, es algo que tiene que ser establecido.

### **9.3. Inhibidores que afectan la vía de degradación del HIF-1 $\alpha$**

La estabilidad del HIF-1 $\alpha$  resulta afectada por su interacción con la Hsp90 (heat shock protein 90), ya que en presencia de inhibidores de la Hsp90, el HIF-1 $\alpha$  sufre degradación por el proteosoma, independiente del VHL (37). Esto es debido a que el heterodímero HIF-1 no puede adquirir su propia conformación y fracasa al reclutar los cofactores requeridos para su actividad transcripcional. El desarrollo de

los inhibidores de la Hsp90 se inició con el descubrimiento del producto natural la geldanamicina, un antibiótico benzoquinona ansamícinica que inhibe la Hsp90 compitiendo con el sitio de unión al ATP. La geldanamicina induce la degradación del HIF-1 $\alpha$  en varias líneas celulares, en condiciones tanto hipóxicas como normóxicas (38). Los primeros inhibidores de la Hsp90 que entraron en pruebas clínicas fueron los 17-AAG y 17-DMAG y en la actualidad un gran número de inhibidores de la Hsp90 de segunda generación están en pruebas clínicas como agentes anticáncer. Sin embargo, dado al rango de proteínas que pueden ser afectadas por la inhibición de la Hsp90, es difícil determinar hasta que grado su actividad antitumoral puede relacionarse con la inhibición del HIF, más aún en ausencia de prueba clínica que asegure los efectos específicos de la inhibición de la Hsp90 sobre las vías señalizadoras del HIF-1. Los inhibidores de la histona desacetilasa se han implicado también en la regulación de la actividad del HIF-1 por varios mecanismos potenciales, que incluyen la inducción de la degradación del HIF-1 $\alpha$  y la regulación de la actividad transcripcional del HIF-1 (39). Aunque permanece controvertido un papel directo de la acetilación en la regulación del HIF-1 $\alpha$ , evidencias recientes indican que la sirtuina 1 (Sirt1), una desacetilasa sensible a los cambios redox, estimula selectivamente la actividad del HIF-2 $\alpha$  durante la hipoxia. Los inhibidores de la histona desacetilasa se están evaluando en tumores sólidos como agentes únicos o en combinación.

#### 9.4. Inhibidores de la unión del HIF-1-DNA

La inhibición de la unión HIF-1-DNA al elemento responsable de la hipoxia (HRE), un paso requerido para la inducción de la transcripción, es un mecanismo potencial mediante el cual las moléculas pequeñas pueden inhibir la actividad del HIF. La evidencia de que este mecanismo puede inhibir la actividad transcripcional del HIF-1 fueron conseguidas por identificación de la equinomicina, un péptido cíclico de la familia de los antibióticos de la quinoxalina, aislado originalmente del *Streptomyces echinatus*, el cual se une al DNA de una manera específica. El desarrollo clínico de la equinomicina se inició en los últimos ochenta, después de amplias pruebas como agente citotóxico en fases I-II, que fracasaron (21, 40).

Se ha observado que las antraciclinas, agentes quimioterapéuticos efectivos para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, inhiben la actividad HIF-1 al ejercer su actividad citotóxica por mecanismos que incluyen la intercalación en el DNA. Recientes evidencias indican que la doxorubicina (DXR) y la daunorubicina (DNR) inhiben la actividad transcripcional del HIF-1 $\alpha$  por bloqueo de su unión a la secuencia HRE. La administración de DXR o DNR a ratones trasplantados con cáncer de próstata humano, inhibió significativamente el crecimiento tumoral y la vascularización, a la vez que disminuyó las células angiogénicas circulantes. La movilización de estas células en la sangre estuvo mediada por los genes, inducidos por el HIF-1, que codificaban citoquinas pro-angiogénicas, cuya transcripción fue inhibida selectivamente en ratones tratados con antraciclinas. Esto demuestra que las antraciclinas pueden ejercer actividad antitumoral al inhibir la actividad del HIF-1 y la angiogénesis y que la inhibición del HIF-1 puede ser uno de los mecanismos potenciales que contribuyen a la actividad de la quimioterapia metronómica (21, 41).

### **9.5. Inhibidores de la actividad transcripcional del HIF-1 $\alpha$**

La quetomina se identificó originalmente como un inhibidor de la actividad transcripcional del HIF-1 al interferir la interacción del HIF-1 $\alpha$  con el co-activador p300. Sin embargo, debido a su toxicidad, el desarrollo de este fármaco no ha tenido el éxito deseado. La inhibición del proteosoma conduce al acúmulo normóxico del HIF-1 $\alpha$ . Paradójicamente, el HIF-1 $\alpha$  que se acumula cuando se bloquea el proteosoma es transcripcionalmente inactivo. El Bortezomib (PS-341) es un inhibidor del proteosoma, aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple, pacientes con linfoma y en pacientes que han sufrido al menos una terapia previa. La actividad antitumoral del bortezomib puede relacionarse con su capacidad para reprimir la actividad transcripcional del HIF-1 $\alpha$  (42). A concentraciones nanomolares el bortezomib fue capaz de alterar la interacción con p300-HIF-1 $\alpha$  al intensificar la unión del FIH al HIF-1 $\alpha$  (43). La FIH es una dioxigenasa que hidroxila la asparragina 803 en el dominio de transactivación C-terminal del HIF-1 $\alpha$ , previniendo así el reclutamiento del co-activador p300. Es un hecho que las concentraciones de bortezomib capaces de inhibir la actividad del HIF-1 $\alpha$  son mucho más

bajas que las requeridas para alterar la función del proteosoma, lo que hace pensar que el mecanismo de inhibición del HIF por el bortezomib es independiente de la inhibición del proteosoma (21).

## 10. CONCLUSIONES

El conocimiento de la biología del HIF-1 y de la regulación del HIF-1 $\alpha$  ha experimentado una notable expansión en los últimos años. El bloqueo molecular de la actividad del HIF-1, cuando se dispone de suficiente oxígeno, implica una cascada de eventos inducidos por enzimas, entre los que se incluye las hidroxilaciones de la prolina y la asparragina, y la ubiquitinación que elimina la subunidad HIF-1 $\alpha$ . En caso de hipoxia estos eventos mediados por enzimas, se inhiben y el HIF-1 activo puede promover la transcripción de multitud de genes, cuya expresión puede ser beneficiosa o perjudicial para el organismo dependiendo de su estado fisiopatológico. El desarrollo de planteamientos farmacológicos que inhiban al HIF puede proporcionar estrategias terapéuticas contra el cáncer. La inhibición farmacológica de las vías inducidas por hipoxia está siendo validada en pruebas clínicas por determinados agentes que puedan ser utilizados por sí solos o en estrategias combinatorias.

## 11. AGRADECIMIENTOS

A Adoración Urrea Salazar por la colaboración prestada en la preparación del manuscrito, en la realización del ajuste electrónico de las figuras y en la búsqueda de bibliografía.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Boticario, C. & Cascales, M. (2008) Factor inducible por hipoxia (HIF-1) y cáncer. En: Innovaciones en cáncer. Editoras Boticario, C. & Cascales, M. UNED. Madrid pp 391-414.
2. Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. (2007) Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochem. Pharmacol.* 73: 450-457.
3. Semenza, G. L. & Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds the human erythropoietin gene at enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5447-5454.

4. Wang, G. L. & Semenza, G. L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237.
5. Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 721-732.
6. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* 11: 353-361.
7. Brahimi-Horn, C., Mazure, N. & Pouyssegur, J. (2005) Signaling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell. Signal.* 17: 1-9.
8. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 617-626.
9. Kaelin, Jr. W. G. (2003) The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2703-2711.
10. Coleman, M. L. & Ratcliffe, P. J. (2010) Angiogenesis escape from hypoxia. *Nature Med.* 15: 491-493.
11. Maxwell, P. H. (2005) The HIF pathway in cancer. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16: 523-530.
12. Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M. *et al.* (2004) Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J. Cell. Biochem.* 92: 491-501.
13. Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M. *et al.* (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell.* 117: 941-952.
14. Pouyssegur, J. & Mechta-Grigoriou, F. (2006) Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* 387: 1337-1346.
15. Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. (2009) HIF at a glance. *J. Cell. Sci.* 122: 1055-1057.
16. Manalo, D. J., Rowan, T., Lavoie, L. *et al.* (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 105: 659-669.
17. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high anaerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer.* 4: 891-899.
18. Walenta, S. & Mueller-Klieser, V. F. (2004) Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin. Radiat. Oncol.* 14: 267-274.
19. Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H. *et al.* (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60: 7075-7083.
20. Semenza, G. L. (2010) HIF-1 upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20: 51-56.
21. Onnis, B., Rapisarda, A. & Melillo, G. (2009) Development of HIF1 inhibitors for cancer therapy. *J. Cell Mol. Med.* 13: 2780-2786.
22. Brown, J. M. & Wilson, W. R. (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 437-447.
23. Melillo, G. (2006) Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol. Cancer Res.* 4: 601-605.
24. Giaccia, A., Siim, B. G. & Johnson, R. S. (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 803-811.
25. Young, R. M., Wang, S. J., Gordan, J. D. *et al.* (2008) Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosomal entry site-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 283: 16309-16319.

26. Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filpula, D. *et al.* (2008) A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor alpha EZN.2968 inhibits tumor cell growth. *Mol. Cancer Ther.* 7: 3598-3608.
27. Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Sordet, O. *et al.* (2004) Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor alpha protein accumulation, angiogenesis and tumor growth by topotecan in US51-HRE glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* 64: 6845-6848.
28. Rapisarda, A., Hollingshead, M., Uranchimeg, B., *et al.* (2009) Increased anti-tumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* 8: 1867-1877.
29. Sapra, P., Zhao, H., Mehlig, M. *et al.* (2008) Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11 refractory model. *Clin. Cancer Res.* 14: 1888-1896.
30. Zhang, H., Qian, D. Z., Tan, Y. S. *et al.* (2008) Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-alpha synthesis and block tumor growth. *PNAS.* 105: 19579-19586.
31. Klausmeyer, P., Zhou, Q., Scudiero, D. A. *et al.* (2009) Cytotoxic and HIF-alpha inhibitory compounds from *Cromosoma bigelovii*. *J. Natl. Prod.* 72: 805-812.
32. Welsh, S., Williams, R., Kirkpatrick, L. *et al.* (2004) Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478 an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* 3: 233-244.
33. Koh, M. Y., Spibak-Kroizman, T., Venturini, S. *et al.* (2008) Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* 7: 90-100.
34. Wouters, B. G. & Koritzinski, M. (2008) Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature Rev. Cancer.* 8: 851-864.
35. Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. A. *et al.* (2002) Interferon-alpha as a comparative treatment for clinical trials and new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 20: 289-296.
36. Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S. *et al.* (2008) Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* 372: 449-456.
37. Neckers, L. (2007) Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.* 32: 517-530.
38. Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mimnaugh, E. G. *et al.* (2002) HSP90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia inducible factor-1alpha-degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 29936-29944.
39. Ellis, L., Hammers, H. & Pili, R. (2009) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett.* 280: 145-153.
40. Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G. *et al.* (2005) Echinomicin, a small molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA binding activity. *Cancer Res.* 65: 9047-9055.
41. Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S. *et al.* (2009) Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *PNAS.* 106: 2353-2358.

42. Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) Bortezomib (PS-341): a novel, first in class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*. 10: 361-369.
43. Shin, D. H., Chun, Y. S., Lee, D. S. *et al.* (2008) Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia inducible factor-1. *Blood*. 111: 3131-3136.

**\*Información de Contacto:**

Dra. María Cascales Angosto

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Email: mcascales@insde.es

**Abreviaturas:** **ARNT**, transportador del receptor nuclear de hidrocarburos; **bHLH**, básico-hélice-vuelta-hélice (*basic-helix-loop-helix*); **BNIP3**, proteína 3 que interacciona con Bcl-2/adenovirus E1B de 19kDa; **CITED**, CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2; **CBP**, proteína que se une a CREB; **4E-BP1**, proteína de unión al elf-4E; **elf-4E**, factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E; **Epo**, eritropoyetina; **FIH**, factor que inhibe a HIF-1; **FH**, fumarato hidratasa (fumarasa); **HIF**, factor inducible por hipoxia; **HO-1**, hemo oxigenasa; **HRE**, elemento de respuesta a hipoxia; **HSP**, heat shock protein; **iNOS-2**, óxido nítrico sintasa 2 inducible; **IRES**, sitio de entrada al interior del ribosoma; **mTOR**, objetivo de la rapamicina en mamíferos; **NHE1**, intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*); **2-OG**, 2-oxoglutarato; **ODDD**, dominio dependiente de la degradación del oxígeno; **PAS**, Per-Arnt-Sim; **PGI**, fosfoglucosa isomerasa; **PTEN**, fosfatasa y tensina; **PH**, prolina hidroxilasa; **SDH**, succinato dehidrogenasa; **TAD**, dominio de activación transcripcional; **TCA**, ácido tricarbóxico; **VEGF**, factor de crecimiento vascular endotelial; **VHL**, von Hippel-Lindau, proteína supresora.