

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Càncer

Amb aproximadament 2.9 milions de nous casos diagnosticats (54% d'homes i 46% de dones) i 1.7 milions de morts l'any 2004 (56% d'homes i 44% de dones), el càncer segueix sent un problema de salut pública a Europa, i més si es té en compte que l'envelliment de la població farà augmentar encara més les xifres. La variant amb major incidència és el càncer de pulmó (13.3% del total), seguit del càncer colorectal (13.2%) i el de mama (13%) [1]. Als Estats Units les xifres no són millors, ja que segons l'ACS (American Cancer Society), aquesta malaltia és la segona causa de mortalitat al país. Considerant aquestes dades, es fa patent la importància de conèixer els mecanismes que la controlen.

1.1.1. Biologia del càncer

Considerar el càncer com una malaltia provocada per unes poques mutacions és una simplificació, ja que les alteracions genètiques varien segons el tumor. A més, altres factors, com la influència de les cèl·lules de l'estroma (Figura 1), també afecten la progressió tumoral. Així, és més acurat definir el càncer com un gran grup de malalties classificades segons el teixit afectat.

La inestabilitat genòmica és una característica de la cèl·lula tumoral [2] adquirida per la inactivació dels sistemes de reparació de mutacions en el DNA, i provoca la variabilitat genètica que, per pressió selectiva, promou la progressió tumoral. Amb el temps, aquest procés genera una extensa heterogeneïtat genòmica entre les cèl·lules d'un tumor, però els permet també adquirir una sèrie de capacitats favorables al seu creixement, que es poden trobar en tots els tipus de càncer (revisat per Hanahan i Weinberg [3]):

- Autosuficiència en senyals de creixement. Les cèl·lules tumorals sintetitzen factors de creixement i poden estimular-se autocrinament per a mantenir la proliferació. Així mateix, mutacions en els receptors d'aquests factors i en les rutes bioquímiques que controlen, permeten mantenir la senyalització independentment de qualsevol estímul exogen. Les cèl·lules de l'estroma també poden ser una font de factors de creixement, i de fet, aquells tumors que adquireixen la capacitat d'induir i aprofitar l'estimulació per part de les cèl·lules adjacents, són les que tenen un major avantatge proliferatiu [4].

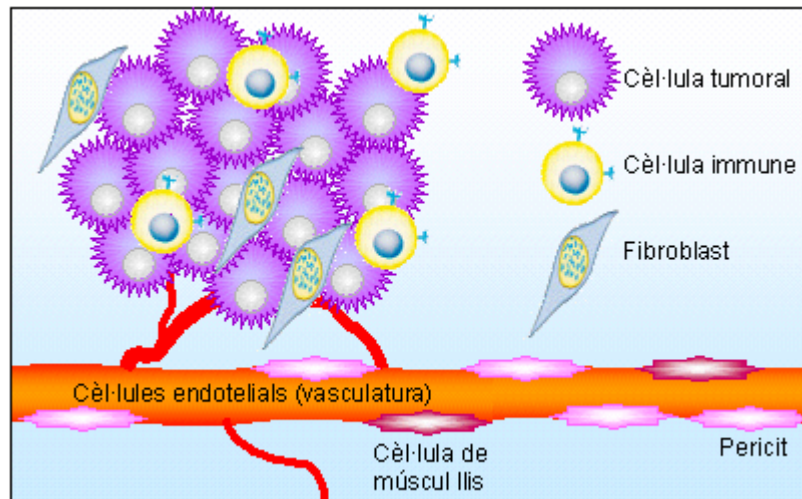


Figura 1. A més de les cèl·lules tumorals, la massa cancerosa està formada per altres tipus cel·lulars que intervenen també en el desenvolupament del tumor, i que conformen l'anomenat estroma: cèl·lules immunes amb activitat inflamatòria, antitumoral i antiangiogènica (limfòcits, neutròfils, fagòcits mononuclears, cèl·lules dendrítiques), o secretores de factors de creixement i proangiogènics (macròfags, monòcits); fibroblasts, que sintetitzen components de la matriu extracel·lular i regulen proteases, factors de creixement i molècules d'adhesió; cèl·lules endotelials, pericits i cèl·lules de múscul llis, que formen la vasculatura tumoral.

- Insensibilitat a senyals de diferenciació i d'aturada del creixement. Aquests senyals, que promouen un estat quiescent, impedeixen la proliferació cel·lular. En canvi, la majoria de tumors es mantenen actius. Això és perquè els punts de control

del cicle cel·lular, com per exemple Rb/E2F^a, es troben inhibits. Així mateix, la sobreexpressió d'ongogens com Myc^b evita la diferenciació cel·lular.

- Evasió de l'apoptosi. La capacitat d'expansió d'un tumor ve determinada no només per la seva velocitat de proliferació, sinó també pel grau de mort cel·lular. Per a evitar l'apoptosi, les cèl·lules tumorals aprofiten la pèrdua de funció de reguladors positius del procés, com p53 [5], sobreexpressen proteïnes amb activitat antiapoptòtica, com bcl-2 [6], o activen rutes de supervivència com PI3K/Akt [7].

- Potencial replicatiu ilimitat. Les cèl·lules normals poden realitzar un nombre finit de replicacions abans d'entrar en senescència: amb cada cicle replicatiu els telòmers cromosomals es van desgastant, i els extrems del DNA queden desprotegits, provocant en darrer terme la disfuncionalitat genètica i mort cel·lular. Les cèl·lules tumorals, en canvi, es multipliquen ilimitadament, ja que són capaces de mantenir la longitud dels seus telòmers dins d'uns límits permissius per a continuar la replicació [8].

- Invasió de teixits i metastasi. Mitjançant mutacions o canvis en l'expressió de molècules d'adhesió, i per desregulació de proteases, s'altera la unió de les cèl·lules tumorals al seu medi extracel·lular. Això els permet envair els teixits adjacents, així com desplaçar-se cap a llocs més distants per a formar nous nuclis tumorals (metastatitzar).

- Angiogènesi mantinguda. La necessitat de generar nous vasos és comú a tots els tumors; fins i tot la leucèmia, que no és un tumor sòlid, indueix angiogènesi en la medul·la òssia per a estimular el seu creixement [9]. Aquest tema es tracta més extensament en el següent capítol.

^a Rb (Retinoblastoma) s'uneix al factor de transcripció E2F i bloqueja la seva activitat, impedit l'entrada a la fase S del cicle cel·lular.

^b Myc és un inductor de l'entrada a fase S del cicle cel·lular.

1.2. Angiogènesi tumoral

Es defineix l'angiogènesi com el creixement de nous vasos a partir de vasculatura preexistent. Aquest procés és diferent de la vasculogènesi, que és el desenvolupament del sistema arterio-venós en l'estat embrionari, a partir de precursors mesodèrmics pluripotents. L'angiogènesi és un procés pràcticament inexistent en l'organisme adult, excepte durant el cicle reproductiu femení, però es dona en situacions patològiques com la curació de ferides i fractures, l'artritis, la isquèmia cardiovascular i cerebral i el càncer.

En unes condicions on l'aportació d'oxigen i nutrients estigui limitada, la divisió i la mort cel·lular es donen a velocitats iguals i no hi ha creixement tumoral. Així, els tumors primaris i les metàstasis no superen un volum de 1-2 mm³ sense tenir subministrament sanguini [10]. Per tant, i segons la hipòtesi de Folkman, els nous vasos creats en un tumor són essencials per a la seva expansió [11]. De fet, l'activació de l'angiogènesi permet un creixement tumoral ràpid, i promou les propietats invasives i metastàtiques que defineixen el fenotip cancerígen letal [12]. Com que els vasos tumorals són més permeables que els normals [13], es facilita l'entrada de les cèl·lules canceroses al torrent sanguini, aportant una ruta eficient de sortida del lloc primari per a establir metàstasis. Així, per a molts tipus de tumors hi ha una correlació estadísticament significativa entre angiogènesi, potencial metastàtic i menor supervivència de pacients [14]. De fet, gairebé tots els inhibidors de l'angiogènesi impedeixen també la formació de metàstasis; la talidomida [15], el TNP-470 [16], la trombospondina [17] o l'endostatina [18] són exemples.

Tot i que hi ha varis mecanismes mitjançant els quals un tumor pot proveir-se de vasculatura, com la inserció de teixit intersticial en el lumen de la vasculatura existent ("intussusception"), la captació de precursors endotelials (vasculogènesi) [19], o fins i tot el mimetisme vascular de les cèl·lules tumorals [20], el mecanisme predominant és l'angiogènesi ("sprouting"). Aquest procés es pot dividir en tres etapes (Revisat per Conway et al. [21]) (Figura 2):

a) Inducció-iniciació. Les cèl·lules tumorals i les cèl·lules accessorïes reclutades secreten inductors angiogènics (factors de creixement i citoquines) per a atraure les cèl·lules endotelials i aquestes, a la vegada, produeixen factors de creixement per al tumor. L'equilibri entre inductors i inhibidors de la neovascularització és tan delicat com

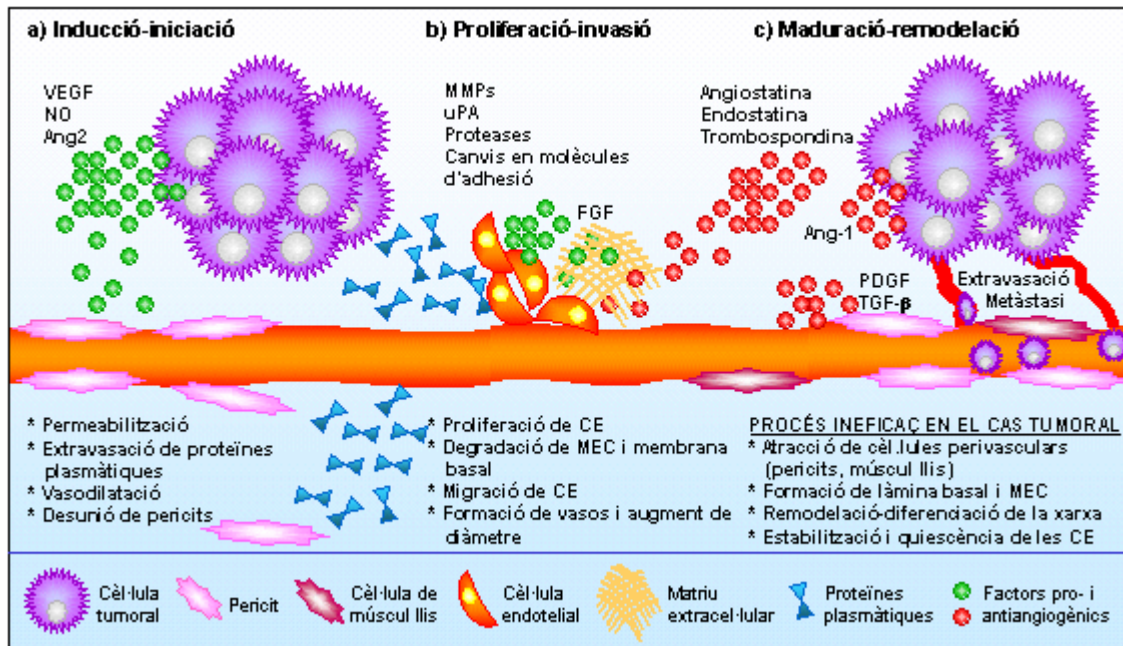


Figura 2. Etapes de l'angiogènesi tumoral i factors implicats.

a) Inducció-iniciació. La secreció de VEGF, NO i Ang2 per part de les cèl·lules tumorals, augmenta la permeabilitat vascular, provoca vasodilatació, i allibera la cobertura de pericits respectivament. Les proteïnes plasmàtiques extravasades com a resultat d'aquests processos serviran de matriu provisional per a la migració de les cèl·lules endotelials.

b) Proliferació-invasió. Les cèl·lules endotelials (CE) responen als factors angiogènics proliferant. També modifiquen l'expressió de les seves molècules d'adhesió (selectines, proteïnes de la família de les immunoglobulines, cadherines i integrines), i secreten proteases (serina proteases com uPA, metaloproteases de matriu (MMPs) i cisteïna proteases (catepsines B i L)), que degraden la membrana basal i la matriu extracel·lular, aportant un ambient idoni per a la seva migració. Així mateix, l'acció de les proteases allibera factors proangiogènics retinguts a la matriu extracel·lular (MEC), com FGF, que mantenen actiu el procés, o factors antiangiogènics com l'angiostatina, l'endostatina o la trombospondina, que actuaran sobre les cèl·lules endotelials provocant el pas a la següent etapa de maduració.

c) Maduració-remodelació. Els factors antiangiogènics promouen l'aturada de la proliferació de les cèl·lules endotelials. Aquestes, a més, secreten PDGF i TGF- β per a atraure i promoure la diferenciació de les cèl·lules perivasculars, que sintetitzen la làmina basal i la matriu extracel·lular dels nous vasos. Es produeix la seva remodelació i la diferenciació en fenotip arterial o venós, i Ang-1, secretada per les cèl·lules tumorals, estabilitza la cèl·lula endotelial, la fa menys permeable i promou la seva entrada en quiescència. Aquests darrers passos, però, es troben desregulats en el cas tumoral, i no s'arriba a un fenotip madur i perfectament funcional, el que, a més, facilita l'extravasació de les cèl·lules cancerígenes i l'establiment de metàstasi.

important, ja que exerceix el control absolut sobre tot el procés d'angiogènesi: mentre les cèl·lules normals secreten quantitats baixes d'inductors i quantitats altes d'inhibidors, a mesura que progressen cap a la malignicitat, les cèl·lules tumorals inclinen aquest equilibri cap al fenotip angiogènic, fenòmen que es coneix com a "angiogenic switch" [22]. Aquest es produeix de forma puntual durant el desenvolupament tumoral, generalment en els moments inicials (tot i que pot variar segons el tipus de tumor i el microambient), i és un pre-requisit per a la ràpida expansió clonal associada a la formació de tumors macroscòpics. Diversos senyals provoquen l'"angiogenic switch": l'estrés metabòlic (hipòxia, acidosi o hipoglucèmia), l'estrés mecànic (per exemple, la pressió generada per les cèl·lules proliferatives), la resposta immune/inflamatòria (infiltració de cèl·lules immunes en un teixit) i les mutacions genètiques (activació d'oncogens o deleció de supressors de tumors que controlen la producció de reguladors de l'angiogènesi).

b) Proliferació de les cèl·lules vasculares i invasió de la massa tumoral. La proliferació induïda pels factors de creixement, junt amb canvis en les seves molècules d'adhesió, així com la sobreexpressió d'enzims que degraden la matriu extracel·lular, permeten a les cèl·lules endotelials posar en marxa processos d'adhesió i migració a través de l'estroma, facilitant la invasió de la massa tumoral [23].

c) Maduració-remodelació. En un procés angiogènic normal, es produeix una parada en la proliferació, es forma l'estructura tubular i el lumen dels vasos, es desenvolupen la làmina basal i la matriu extracel·lular i el nou vas recluta cèl·lules murals (pericits i cèl·lules de múscul llis) i fibroblasts, donant lloc a una estructura madura. Així mateix, es produeix una diferenciació de les cèl·lules endotelials en arterials o venoses, i es conforma la morfologia òptima de la xarxa vascular per remodelació de les ramificacions (regressió, si és necessari), de manera que el flux sanguini arriba en la mesura necessària a cada punt del teixit. En el cas de l'angiogènesi tumoral, en canvi, hi ha un desequilibri de reguladors angiogènics, i la maduració no es completa mai. Els nous vasos són molt defectuosos, irregulars i

tortuosos; tenen canvis arteriovenosos i extrems tancats, i tenen alineaments endotelials, membranes basals, múscul llis i inervacions incomplets, així com menor abundància de pericits, que també s'hi troben units més feblement [24]. Això dóna lloc a una vasculatura excessivament permeable, funcionalment incompleta i immadura, i en contínua proliferació, el que afecta també a la quantitat i gruix dels vasos. La morfologia final, però, depèn del tipus de tumor i de l'òrgan on aquest està creixent, perquè les cèl·lules de l'estroma són variables segons el teixit, i produeixen també diferents factors pro- i antiangiogènics [25].

1.2.1. Factors angiogènics

1.2.1.1. VEGF

VEGF és un mitogen i factor de supervivència de cèl·lules endotelials i un promotor de permeabilitat vascular. Degut a aquestes propietats, actua com a potent inductor de la vasculogènesi i l'angiogènesi *in vivo* [26]. En resposta a diversos estímuls (com la hipòxia), les cèl·lules tumorals n'augmenten la producció i secreció; llavors s'uneix als seus receptors en la superfície de les cèl·lules endotelials vasculares i posa en marxa una cascada de senyalització intracel·lular que inicia la formació de nous vasos i manté la seva viabilitat [27].

Es coneixen 5 membres de la mateixa família [28]: VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. Els seus receptors, amb activitat tirosina quinasa (VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/flk-1/KDR i VEGFR-3/flt-4), s'expressen pràcticament només en la superfície de les cèl·lules endotelials vasculares (revisat per Tammela [29]) (Taula 1 - Apèndix 1).

1.2.1.2. Tie i angiopoietines

Els Tie són una família de receptors amb activitat tirosina quinasa que s'expressen exclusivament en cèl·lules endotelials [30]. S'han descrit quatre lligands de la família de les angiopoietines que s'uneixen bàsicament només a Tie-2: Ang-1

[31], Ang-2 [32], Ang-3 i Ang-4 [33]. Aquesta interacció té un paper crucial en l'angiogènesi, ja que controla la remodelació i maduració vascular.

Ang-1, secretada per la cèl·lula tumoral, estimula l'activitat quinasa del receptor Tie-2, i exerceix funcions antiinflamatòries, antiapoptòtiques [34] i de segellament dels vasos; aquesta activitat manté la quiescència i estabilitat de la vasculatura madura. Ang-2, secretada per la cèl·lula endotelial en els llocs de remodelació vascular, actua autocrinament com a antagonista d'Ang-1, unint-se al receptor Tie-2 però sense induir la seva fosforilació, i bloquejant l'estabilització i la maduració dels vasos [32]. Així, les cèl·lules endotelials passen a un estat més plàstic, de manera que poden patir una regressió o respondre a nous estímuls angiogènics, com el VEGF; de fet, la cooperació entre aquest i les angiopoietines és crítica per a la remodelació de la vasculatura durant l'angiogènesi tumoral [35]. Ang-3 i Ang-4 exerceixen funcions anàlogues a Ang-2 i Ang-1, respectivament. Ang-3 té activitat antiangiogènica i antimetastàtica; és inhibidora de la proliferació i supervivència de les cèl·lules endotelials, i atenua la senyalització d'Ang-1 i VEGF [36]. Ang-4 pot substituir Ang-1 en la inducció d'angiogènesi per hipòxia [37].

1.2.1.3. FGF

Aquesta família de factors de creixement (9 isoformes) es caracteritza per tenir una unió amb molta afinitat a l'heparina. Hi ha formes àcides i bàsiques, i s'uneixen a receptors de les cèl·lules endotelials (almenys 4 tipus) que són tirosina quinases transmembranals [38]. Degut a la seva afinitat per l'heparina, els FGFs queden segrestats a la matriu extracel·lular fins que els enzims proteolítics la degraden durant l'angiogènesi. Són mitògens i factors quimiotàctics per a les cèl·lules endotelials.

1.2.1.4. Altres

Altres factors amb activitat angiogènica descrita són TGF- α i β , TNF- α , PDGF, EGF, angiogenina, interleuquines, prostaglandines, nicotinamida, i leptina [39-46].

1.2.2. Factors antiangiogènics

La trombospondina, component de la matriu extracel·lular, actua com a inhibidor de l'angiogènesi *in vitro* i *in vivo* per unió a CD36, receptor transmembranal de les cèl·lules endotelials amb efectes antiproliferatius i proapoptòtics. La seva expressió es troba inhibida en tumors amb p53 inactivat.

L'angiostatina, derivada del plasminogen, i l'endostatina, fragment proteolític de la col·làgena, bloquegen la proliferació endotelial sense afectar les cèl·lules tumorals, que són les seves productores.

PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor), proteïna inicialment identificada com a factor neurotròfic, també mostra activitat antiangiogènica.

L'estructura i activitat d'aquests i altres factors antiangiogènics ha estat revisada extensament per Nyberg i Kalluri [47].

1.3. L'estrés hipòxic

Les cèl·lules tumorals presenten una elevada proliferació i un consum de nutrients i oxigen que supera la capacitat d'aport de la vasculatura local existent (les distàncies capil·lar - cèl·lula superen la distància màxima de difusió de l'oxigen, 150 µm) (Figura 3). A més, com s'ha dit, els vasos de nova formació que apareixen degut al procés d'angiogènesi tumoral són molt defectuosos, i això fa que el fluxe sanguini sigui irregular, fent la distribució d'oxigen i nutrients menys eficient que la dels teixits normals. Com a resultat, apareixen zones amb nivells baixos d'oxigen (hipòxia) en la majoria de tumors sòlids [48,49], arribant-se a valors del 3 al 10% respecte la pressió d'oxigen en un teixit normal (per exemple, 12.5 mmHg en càncer de mama front als 65 mmHg en un teixit de mama normal).

El resultat principal d'aquesta oxigenació deficient és, en la resposta aguda, la modificació post-traducciona de proteïnes per reaccions redox, fosforilacions, etc., i en la resposta crònica, un canvi en la transcripció dels gens implicats en l'adaptació a

aquesta situació, per una banda per a intentar millorar la quantitat d'oxigen disponible (activant l'eritropoesi (amb eritropoietina) i l'angiogènesi (amb VEGF)) i per l'altra per a activar la glicòlisi i així disminuir el consum d'oxigen en els processos d'obtenció d'energia. També es produeix una parada de la proliferació cel·lular (per activació de p16 i p27^c) [50,51], tot i que la viabilitat es manté. Si, a més d'aquests efectes transcripcionals, es té en compte que la inestabilitat genètica en cèl·lules hipòxiques és major que en cèl·lules normòxiques [52], els resultats són molt favorables a la progressió tumoral: es potencia l'angiogènesi, s'exerceix una gran pressió selectiva a favor de mutacions que promouen la resistència a apoptosi [53] i, en conjunt, això dóna també tumors més invasius i predisposats a metastatitzar [12,54].

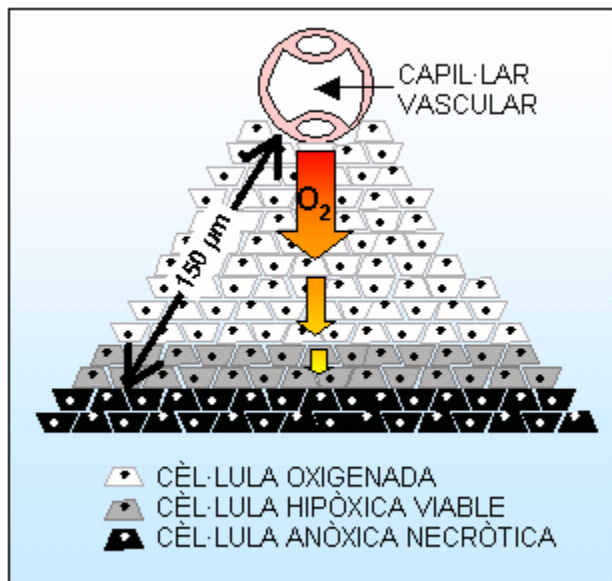


Figura 3. Distribució d'oxigen en un tumor.

L'O₂ només pot difondre de 100 a 180 μm des d'un capil·lar abans de ser completament metabolitzat. Per tant, qualsevol cèl·lula situada més lluny d'aquesta distància serà hipòxica.

1.3.1. Hipòxia i angiogènesi

La relació entre l'estrés hipòxic i l'angiogènesi és recíproca: els nous vasos formats, degut a la seva irregularitat, provoquen situacions d'hipòxia dintre de la massa tumoral, i la disminució en la quantitat d'oxigen estimula l'angiogènesi.

Aquesta estimulació es pot veure, per exemple, en la regulació positiva per part de la hipòxia de l'expressió de molts factors proangiogènics.

^c p16 i p27 són inhibidors de cdk.

Els nivells de mRNA de VEGF augmenten dràsticament en resposta a la falta d'oxigen, i retornen a la normalitat durant la reoxigenació *in vitro* [55]. Aquesta inducció està controlada per factors de transcripció clau en la resposta a l'estrés hipòxic, com HIF-1 [56], RTEF-1 [57] o altres [58], així com per estabilització del missatger [59]. També se sobreexpressa el receptor flt-1 (però no flk-1) [60], i el mRNA de la xaperona ORP150, necessària per al transport intracel·lular de VEGF (previ a la seva secreció) del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi [61].

Es produeix també un augment de l'expressió d'Ang-2, així com una inhibició d'Ang-1, de manera que el resultat final és una aturada de la senyalització per Tie-2, i en definitiva la inhibició de la maduració de la vasculatura [62].

L'angiogenina també s'indueix amb la baixada d'oxigen [63], així com el PDGF [64]. A més de la seva acció proangiogènica, aquest darrer factor té activitat timidina fosforilasa, i dóna resistència a l'apoptosi induïda per hipòxia mitjançant la degradació dels productes de la timidina [65]; així mateix, via PDGF, la hipòxia activa la ruta de supervivència de PI3K/Akt [66].

Per a promoure la degradació de la matriu extracel·lular, es produeix un augment de l'activitat metaloproteasa (associat a un fenotip metastàtic *in vivo* i *in vitro*) i de la transcripció del receptor d'uPA (uPAR) [67], i s'inhibeix l'acció dels TIMP (inhibidors de MMPs) [68].

En quant als factors antiangiogènics, la hipòxia inhibeix la seva expressió, com és el cas del PEDF i l'endostatina [69,70].

1.3.2. Factors de transcripció

Diversos factors de transcripció responen a variacions en la pO_2 , com per exemple HIF-1, AP-1, NF- κ B, MTF-1, RTEF-1, Sp1, CREB, p53 i altres (revisat per Cummins i Taylor [71]).

1.3.2.1. AP-1

El factor de transcripció AP-1 està format per hetero- i homodímers de c-fos i c-jun (Jun/Fos i Jun/Jun). Aquesta dimerització es dona per interacció de dominis “leucine zipper” de totes dues proteïnes, i és necessària per a la unió a DNA. També és necessària la reducció d'un residu cisteïna present en el domini d'unió del dímer, modificació post-traducciona que podria veure's alterada en funció de la concentració d'oxigen [72].

La hipòxia induïx els mRNAs de c-fos i c-jun, tant per activació de la seva transcripció com per estabilització del missatger [73], i promou la unió a DNA del dímer [74].

L'activitat d'AP-1 com a factor de transcripció en la resposta a hipòxia es dona en cooperació amb la d'HIF-1 (revisat per Laderoute [75]). Els gens que induïx estan implicats en el creixement i la diferenciació cel·lular, i dirigeixen la detoxificació de productes derivats del metabolisme oxidatiu [76], de manera que protegeixen les cèl·lules dels metabolits nocius generats en hipòxia, especialment de l'acumulació de ROS, que provoquen dany i mort cel·lular.

1.3.2.2. NF- κ B

NF- κ B és un heterodímer format per dues subunitats, p50 i p65. La forma majoritària es troba en un estat inactiu formant un complex amb la subunitat inhibidora I κ B α en el citoplasma. Després d'activar-se, I κ B α es fosforila i s'allibera del complex, i l'heterodímer p50-p65 es trasloca a nucli, on pot exercir la seva activitat transcripcional [77] (Figura 4).

Exposicions prolongades a hipòxia promouen la fosforilació i degradació d'I κ B α , el que provoca l'activació de NF- κ B [78], i la seva unió a DNA està modulada també per l'estat redox de la proteïna [79].

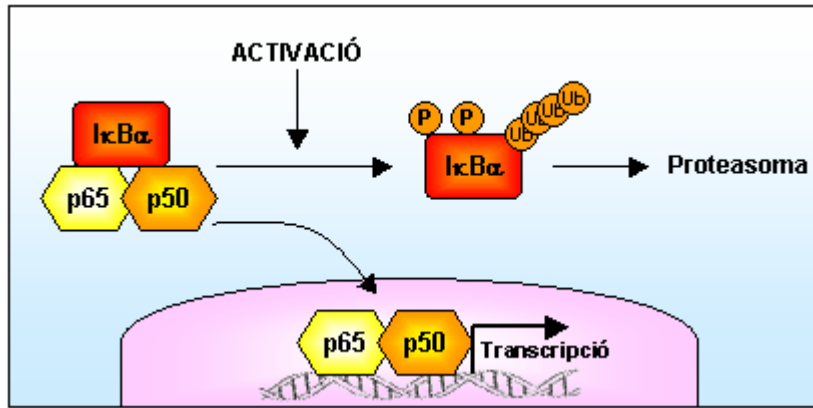


Figura 4.
Activació de NF-κB.

NF-κB juga un paper fonamental en la resposta immune i inflamatòria, la resposta a estrès (com l'estrès oxidatiu) i el control del creixement i la supervivència cel·lulars, induint l'expressió de citoquines, quimioquines, molècules d'adhesió, factors de creixement i immunoreceptors [80].

NF-κB és capaç d'interaccionar amb AP-1 (encara que aquesta interacció no s'ha demostrat en hipòxia), i això podria potenciar la transcripció dels gens diana de tots dos factors [81].

1.3.2.3. Sp1

Sp1 forma part de la família de proteïnes amb dits de zinc. El seu domini d'unió a DNA està format per tres d'aquests dits, sent la part C-terminal de cadascun d'ells l'encarregada de la interacció. Aquest factor és ubicu, i reconeix elements curts específics localitzats abans del lloc d'inici de la transcripció, les caixes GC. Sp1 actua reclutant els factors de transcripció específics per a una resposta a la zona del promotor corresponent, incrementant així l'eficiència d'iniciació de la transcripció. En la resposta a hipòxia, per exemple, coopera amb HIF-1 [82], HIF-2 [83], RTEF-1 [57] o NF-κB [84], modulant l'expressió de molts dels seus gens diana.

1.3.2.4. MTF-1

Igual que Sp1, MTF-1 interacciona amb el DNA mitjançant motius de dits de zinc. Aquest factor respon a fluctuacions en la quantitat de metalls pesants i a variacions en l'estat redox de la cèl·lula [85]. La unió als MREs (Metal Response Elements) indueix l'expressió de proteïnes de la família metalotioneïna (MT), implicades en la protecció contra la isquèmia, les espècies reactives d'oxigen i de nitrogen, els agents antineoplàsics, els mutàgens i la radiació ionitzant [86-88].

MTF-1 també respon a hipòxia [89], exercint un paper modulador general: no controla directament la transcripció gènica, sinó l'activació d'altres factors. Per exemple, regula la síntesi i/o estabilització d'HIF-1 α per hipòxia, possiblement per modulació de la via PI3K/Akt i per manteniment del correcte estat redox de la cèl·lula [90], i coopera amb aquest per a induir l'expressió de MT, així com amb NF- κ B per a activar la transcripció de PIGF; tots dos gens (*Mt* i *Pigf*), tenen expressió elevada en tumors agressius [91], el que implica MTF-1 en la progressió tumoral.

1.4. HIF-1

HIF-1 és el principal factor de transcripció regulador de les respostes adaptatives a hipòxia [92].

Els seus gens diana (Taula 2 – Apèndix 1) tenen funcions relacionades amb la glicòlisi, induint canvis metabòlics que permeten la substitució de la via oxidativa per la glicolítica, contribuint així a l'efecte Warburg [93,94] (Figura 5); amb la resposta a la baixada de pH característica dels tumors, resultat d'aquesta glicòlisi [95]; amb l'eritropoesi [96]; amb l'angiogènesi i remodelació vascular [97]; i amb la viabilitat cel·lular [98]. El subgrup de gens diana que s'activa en una cèl·lula hipòxica concreta ve determinat pel tipus cel·lular, el microambient del teixit, i les interaccions funcionals d'HIF-1 amb altres factors de transcripció.

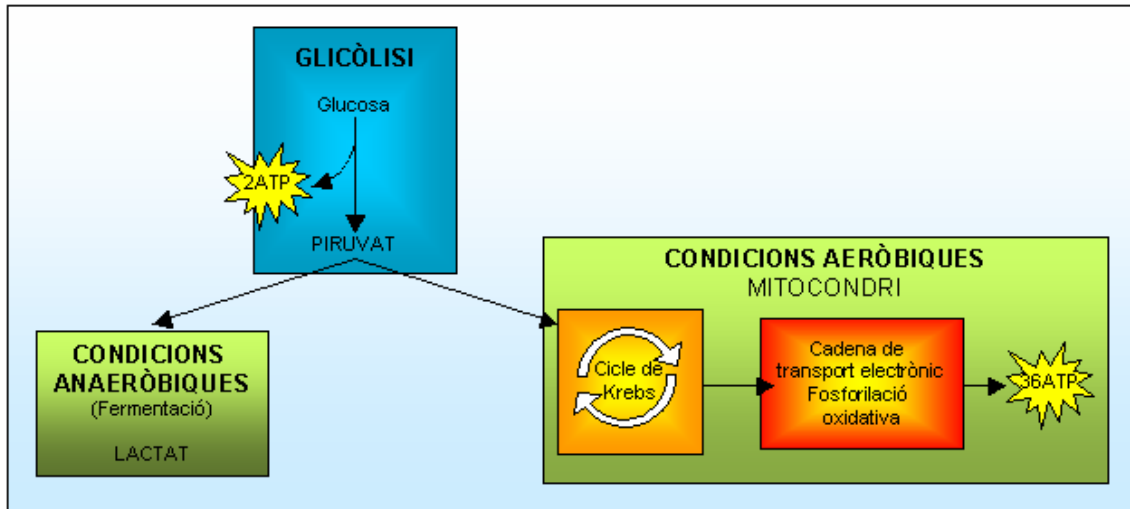


Figura 5. Tot i que el rendiment energètic de la glicòlisi anaeròbia (2 ATP) és menor que el del metabolisme aerobi (38 ATP), en presència de glucosa suficient, aquesta pot mantenir la producció d'ATP si augmenta l'activitat dels enzims glicolítics. Comparat amb les cèl·lules normals, les cèl·lules tumorals presenten un marcat augment en el metabolisme glicolític, fins i tot a concentracions normals d'oxigen, fenomen conegut com a efecte Warburg. El transport de glucosa està sobreactivat, per a proveir quantitats majors de substrat (que en cas contrari esdevé limitant) i proporciona a les cèl·lules autonomia per a la captació de nutrients, de manera que poden generar energia suficient per a la divisió i creixement cel·lular. La glucosa s'acaba convertint en lactat pels enzims glicolítics, el que crea un ambient àcid característic dels tumors que també selecciona aquelles cèl·lules que millor s'hi poden adaptar (les més resistents a apoptosi). Per tant, aquelles mutacions adquirides que potencien la glicòlisi i milloren l'adaptació a l'acidosi donen un avantatge proliferatiu i potencien la malignicitat i agressivitat. De fet, hi ha una correlació entre l'agressivitat d'un tumor i la seva augmentada capacitat per a captar glucosa. Així mateix, el metabolisme glicolític no genera tantes espècies reactives d'oxigen, que podrien danyar el DNA durant la replicació. L'adaptació a fenotip glicolític podria estar potenciada inicialment per les petites regions hipòxiques dels tumors avasculars, però un cop es dona el canvi, les cèl·lules van adquirint avantatges sobre les del voltant, proliferen més i són més invasives, i el tumor comença a créixer depenent de la glicòlisi fins i tot en presència d'oxigen. Per això s'ha proposat que l'adquisició del fenotip glicolític seria un requeriment per al creixement tumoral invasiu, i no una simple conseqüència de les mutacions.

1.4.1. Estructura

HIF-1 és un heterodímer format per dues subunitats, HIF-1 α i HIF-1 β , pertanyents a la família de les proteïnes bHLH/PAS [99]. La dimerització, indispensable per a la unió a DNA [100], es dona a través dels dominis bHLH i PAS [101]. Regions bàsiques de l'heterodímer (de la zona bHLH) fan contacte llavors amb la seqüència corresponent del DNA [102], l'anomenat HRE (Hypoxia-Response Element), A(G)CGTG, que contenen tots els gens diana d'HIF-1.

Com es mostra a la figura 6, la subunitat α consta, a més de les regions bHLH i PAS, de dos dominis de transactivació localitzats a la meitat C-terminal, el N-TAD (aminoàcids 531-575) i el C-TAD (aminoàcids 786-826). Tots dos s'activen en resposta a hipòxia [103], portant a una associació funcional amb coactivadors transcripcionals (p300/CBP, Src-1, TIF-2). Les dues senyals de localització nuclear (NLS) [104] permeten la translocació a nucli. El domini de degradació per oxigen (ODD) es troba entre els aminoàcids 401 i 603, i també es pot diferenciar entre el N-ODD i el C-ODD; les proteïnes implicades en la degradació d'HIF-1 α interaccionen amb aquesta zona.

La subunitat β té un sol NLS, un TAD, i no té domini ODD.

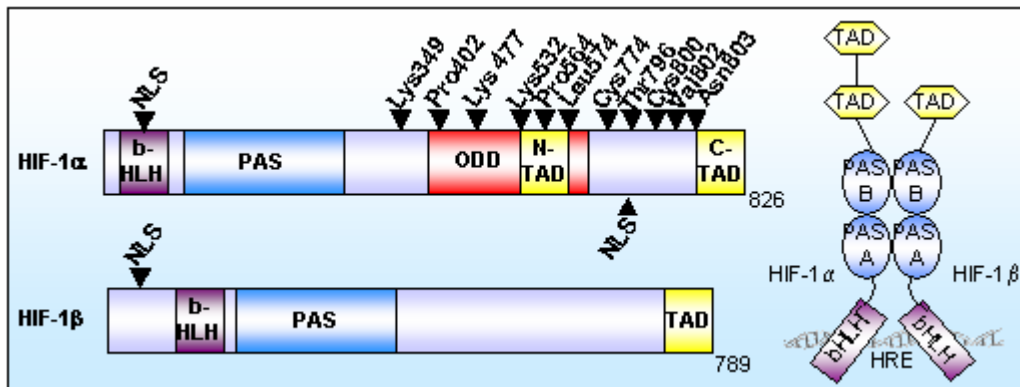


Figura 6. Estructura d'HIF-1 α i β .

Es mostren els dominis de cada subunitat, la seva interacció, i els aminoàcids reguladors de l'estabilitat i activitat de la subunitat α .

Es coneixen diverses isoformes de totes dues subunitats, codificades per loci genètics diferents: HIF-1 α , HIF-2 α (també anomenat EPAS-1, MOP2, HLF o HRF) i HIF-3 α ; HIF-1 β (ARNT1), ARNT2 i ARNT3. Les tres subunitats α intervenen en la resposta a hipòxia; d'aquestes, HIF-1 α és la millor caracteritzada i la que més participació té. HIF-1 β , en canvi, en funció de la subunitat amb la que dimeritza (HIF- α , AhR o SIM), pot regular processos transcripcionals alternatius, com la resposta a xenobiòtics [105], i pot actuar com a activador o com a repressor transcripcional [106]. El seu domini de transactivació no és essencial per a l'activitat del complex HIF-1, però

sí és important per als dímers HIF-1 β /HIF-1 β , SIM/HIF-1 β i HIF-1 α^{417} /HIF-1 β (on HIF-1 α^{417} és una variant de splicing d'HIF-1 α [107]). ARNT2 també interacciona amb HIF-1 α , controlant la resposta a hipòxia específicament en neurones [108]; en canvi, quan dimeritza amb SIM1 exerceix funcions relacionades amb el desenvolupament embrionari [109]. ARNT3, per últim, també ha mostrat activitat transcripcional dependent de HRE per dimerització amb HIF-1 α [110].

1.4.2. Regulació de l'estabilitat d'HIF-1 per la concentració d'oxigen

La subunitat β s'expressa constitutivament i manté nivells proteics constants a nucli en qualsevol condició (hipòxia i normòxia) [111].

En canvi, la subunitat α està subjecta a una forta regulació per la concentració d'oxigen (sobretot a nivell post-traducciona) i és la que controla l'activitat d'HIF-1. Tot i que l'expressió del seu mRNA també és constitutiva (està regulada bàsicament per Sp1, i en el seu promotor hi ha també presents llocs d'unió per a AP-1 i NF- κ B [112]), en condicions de normòxia la proteïna és ràpidament degradada per la via del proteasoma [113] (té una vida mitja de 5 min); en hipòxia, la subunitat α és estable i pot entrar a nucli i dimeritzar amb la subunitat β , actuant llavors com a factor de transcripció (Figura 7).

1.4.2.1. pVHL, PHDs i degradació proteasomal

El supressor de tumors pVHL [114] actua com a element de reconeixement d'HIF-1 α (també d'HIF-2 α i HIF-3 α) del complex VBC-E3 ubiquitin lligasa, que poliubiquitina les proteïnes diana per dirigir-les cap a proteasoma [115] (Figura 8). Es postula que pVHL entra a nucli, on es dona la poliubiquitinació d'HIF-1 α , i llavors promou la seva sortida a citoplasma, on es produeix la degradació proteasomal [116].

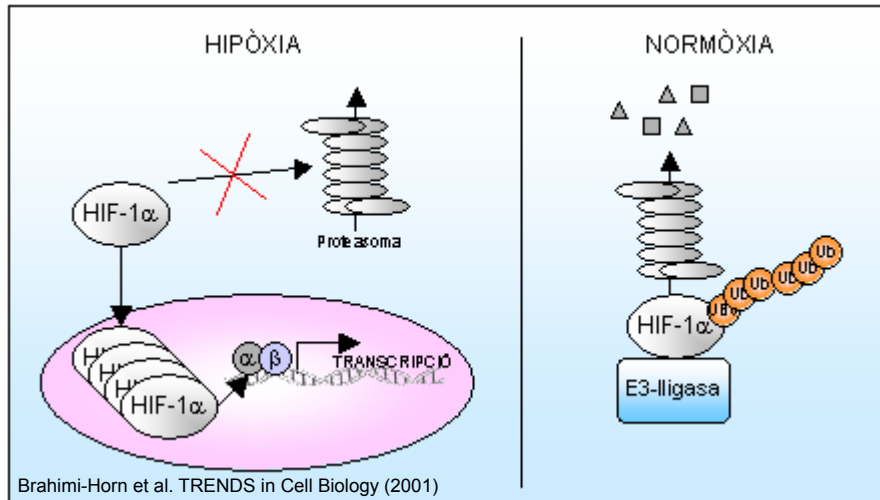


Figura 7. Degradació proteasomal d'HIF-1α.

En hipòxia, HIF-1α s'acumula i dimeritza a nucli amb HIF-1β, formant un factor de transcripció actiu. En normòxia es dona la seva poliubiquitinació i degradació proteasomal. (Ub = Ubiquitina).

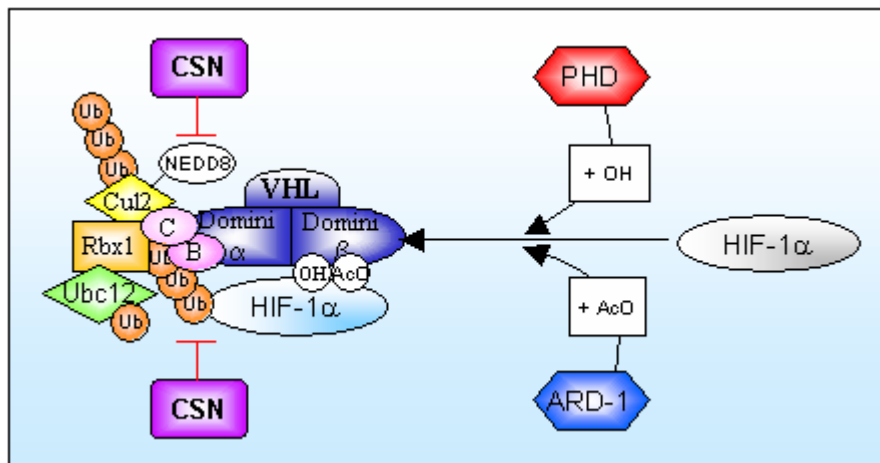


Figura 8. Complex VBC-E3 ubiquitin lligasa – HIF-1α.

pVHL, formada per dos dominis, α i β, s'uneix a Elongin B i Elongin C, formant el complex VBC, que s'encarrega del reconeixement de les proteïnes diana; Cullin-2 (Cul2) i Rbx1, que actuen com a nucli catalític, s'uneixen a VBC i recluten l'enzim Ubc12, que porta la ubiquitina conjugada i la transfereix a HIF-1α.

La unió covalent de NEDD8 (pèptid semblant a la ubiquitina) a Cul2 (neddilació) també està catalitzada per un enzim de tipus Ubc12, i requereix de l'activitat Rbx1 i de la presència de pVHL; la neddilació és necessària per al correcte funcionament de l'E3 lligasa. El complex COP9 signalosoma (CSN) és un regulador negatiu de tot el procés, ja que catalitza la deneddilació de Cul2 (activitat Nedd8 isopeptidasa), i també, en associació amb l'enzim deubiquitinant Ubp12, té activitat ubiquitin isopeptidasa. pVHL és, així mateix, una diana de neddilació, tot i que això no sembla tenir cap relació amb la seva funció en el complex VBC.

Es mostren les modificacions post-traduccionals que regulen la unió entre pVHL i HIF-1α (OH = grup hidroxil; AcO = grup carboxil).

La interacció entre pVHL i HIF-1 α només es dona en normòxia, i està governada per una modificació post-traducciona, la hidroxilació de les prolines 402 (N-ODD) i 564 (C-ODD) d'HIF-1 α [117,118], que afavoreix l'establiment de ponts d'hidrogen amb un grup d'aminoàcids del domini β de pVHL [119] (HIF-2 α té aquests dos llocs conservats; HIF-3 α només en té un, anàleg a la prolina 564). Totes dues hidroxiprolines poden interaccionar independentment amb pVHL, tot i que amb afinitat i eficiència d'ubiquitinació diferent, sent la prolina 564 el principal lloc d'unió [120].

L'enzim responsable d'aquesta modificació post-traducciona és la PHD (Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein) [121]. L'activitat d'aquest enzim depèn directament de la concentració d'oxigen (s'ha demostrat que el grup hidroxil que incorpora la prolina prové de l'oxigen molecular (O₂) [122]), de manera que en normòxia, l'enzim és actiu i dirigeix HIF-1 α cap a la degradació proteasomal, i en hipòxia s'inactiva, i HIF-1 α manté la seva estabilitat. Podria funcionar, doncs, com a putatiu element sensor dels nivells d'oxigen. S'han descrit tres isoformes d'aquest enzim, PHD1, PHD2 i PHD3, totes tres homòlogues a les prolilhidroxilases de col·làgena i que, com elles, utilitzen, a més d'oxigen molecular, 2-oxoglutarat com a cosubstrat i Fe²⁺ i ascorbat com a cofactors. La seva seqüència de reconeixement és LXXLAP, on X indica qualsevol aminoàcid, i P és la prolina acceptora; aquesta seqüència es conserva en HIF-1 α , HIF-2 α i en les isoformes d'HIF de diferents espècies [123]. Per mutació dirigida s'ha identificat un aminoàcid essencial per a la interacció entre HIF-1 α i PHD2, la Leucina 574. Substitucions d'aquest aminoàcid eviten aquesta interacció i augmenten l'estabilitat d'HIF-1 α [124].

L'activitat enzimàtica de les PHDs es regula a molts nivells:

- Per disponibilitat de substrats, O₂ bàsicament, tot i que també es pot afectar per alteracions en la quantitat de metabolits com el succinat^d [125].

^d En la reacció catalitzada per les PHDs, un oxigen de l'O₂ passa al grup hidroxil de la prolina, i l'altre a l'oxoglutarat, donant succinat. Una variació en la quantitat d'aquest compost, provocada per exemple per mutació d'algun enzim metabòlic, pot desplaçar l'equilibri de la reacció d'hidroxilació.

- També la quantitat dels cofactors Fe^{2+} i ascorbat podria ser limitant, ja que s'ha observat que la suplementació de cultius amb aquests compostos redueix els nivells d'HIF-1 α [126]. De fet, el creixement neoplàsic sol provocar un descens en la quantitat de Fe^{2+} disponible (anèmia), que s'ha associat a una menor supervivència i pitjor pronòstic de la malaltia [127].

- La caracterització enzimàtica mostra que el valor de la K_m^e és lleugerament major que la concentració d' O_2 atmosfèric, de manera que aquests enzims estan funcionant fora de l'equilibri, i fins i tot petits descensos en la $p\text{O}_2$ poden influenciar negativament la seva activitat [128].

- Degut a aquestes condicions de no-equilibri, variacions en la quantitat d'enzim tindran també un efecte regulador sobre la seva activitat. L'expressió del mRNA de PHD1 es troba disminuïda en hipòxia (predomina en normòxia), i HIF-1 β és el factor responsable d'aquesta inhibició [129]; en aquest cas, però, enlloc d'heterodimeritzar amb HIF-1 α podria estar fent-ho amb SIM, un altre membre de la família bHLH-PAS que promou la repressió transcripcional de manera depenent d'oxigen [106]. Inversament, els mRNAs de PHD2 i PHD3 són induïbles per hipòxia [130]. PHD3 és un gen diana tant d'HIF-1 com d'HIF-2. En canvi, només HIF-1 controla la inducció de PHD2, i exclusivament en casos d'hipòxia prolongada (no a curt termini) [131]. Així s'estableix un mecanisme autoregulator, ja que, com més llarg és l'estímul hipòxic, més enzim s'acumula, i al retornar a normòxia, més ràpida és la degradació d'HIF-1 α [132]. A nivell proteic, Siah2 (E3 ubiquitin lligasa) té a PHD1 i PHD3 com a dianes, provocant la seva degradació proteasomal. Aquesta activitat és pràcticament inexistent en normòxia; en canvi, en hipòxia, s'estimula la transcripció de Siah2, i això permet establir HIF-1 α , no només per inhibició de l'activitat hidroxilasa, sinó també per degradació de l'enzim [133]. Finalment, la quantitat de cada isoforma és diferent segons el tipus de teixit [134].

^e K_m és la constant de dissociació enzim-substrat ($[E][S]/[ES]$), i defineix la concentració de substrat (en aquest cas d'oxigen) on tenim $\frac{1}{2}$ de la velocitat màxima de reacció.

- La velocitat de catàlisi varia per a cada isoforma, sent PHD2 la que presenta major activitat [135].
- Les tres PHDs tenen diferents afinitats pels seus substrats, amb PHD3 incapaç d'hidroxilar la prolina 402 i PHD1 i PHD2 amb preferència per la zona del C-ODD (prolina 564). Hi ha també diferent afinitat de cada PHD per HIF-1 α i HIF-2 α [128,134,136].
- Les dues prolines, a més, tot i ser independents en la regulació d'HIF-1 α , mostren certa interactivitat, ja que la hidroxilació en el lloc 564 facilita la reacció en el lloc 402. A més, aquesta darrera prolina és més sensible a disminucions en la quantitat d'oxigen, mostrant un descens de la hidroxilació a tensions d'oxigen més elevades que la prolina 564 [136].
- La localització cel·lular, tot i que no varia en funció de la quantitat d'oxigen, és diferent per a cada isoenzim: PHD1 es troba exclusivament a nucli, PHD2 a citoplasma, i PHD3 es distribueix homogèniament per nucli i citoplasma [137].
- OS-9, que forma un complex amb HIF-1 α i PHD2 o PHD3, promou també la hidroxilació i posterior degradació proteasomal d'HIF-1 α [138].

Com que la regulació de cada PHD és diferent, s'ha proposat que tenen funcions diferents *in vivo*. Es postula que PHD2 podria ser la hidroxilasa clau per a mantenir nivells baixos d'HIF-1 α en normòxia o després d'una curta exposició a hipòxia [139]. PHD1 i PHD3, en canvi, podrien regular la quantitat d'HIF-1 α en situacions d'hipòxia crònica, i en hipòxia moderada (5%-10% O₂). A més, PHD1 i PHD3 es poden induir per altres estímuls, com els estrògens o p53 [140,141]. L'existència de tres isoformes de PHD, amb la seva corresponent regulació, i la presència de varis llocs d'hidroxilació en la subunitat α , permeten controlar finament aquesta reacció enzimàtica, i per tant la resposta a hipòxia.

A més de la hidroxilació de prolines, altres elements regulen la interacció entre HIF-1 α i pVHL. ARD1, enzim amb activitat acetil transferasa, acetila la lisina 532 d'HIF-

1 α (aminoàcid que es conserva en HIF-2 α , que també és regulable per oxigen, però no en HIF-3 α , que és estable en normòxia); aquesta modificació millora la interacció amb pVHL i la posterior degradació proteasomal de la subunitat α (sense afectar el seu mRNA). L'activitat d'ARD1, tot i no ser depenent de la concentració d'oxigen, és major en normòxia que en hipòxia. Això es podria explicar tenint en compte la disminució de l'expressió de l'enzim que s'ha reportat en aquest darrer cas [142]. Tot i això, aquest no és un fenomen observat universalment [143,144]; a més, la sobreexpressió d'ARD1 no té cap efecte sobre l'estabilitat i l'activitat d'HIF-1 α , i s'ha posat en dubte que realment s'estigui produint una acetilació, de manera que, tot i que la unió entre totes dues proteïnes sí es dona, no està clara la funció real d'ARD1 [143-145].

CSN5 (també anomenat Jab1), component del complex CSN [146] (veure peu de figura 8) i inicialment identificat com a coactivador transcripcional de c-Jun, té activitats alternatives a la deneddilació que també regulen la ubiquitinació d'HIF-1 α : en normòxia pot evitar la hidroxilació de la prolina 564, ja que interacciona directament amb el C-ODD d'HIF-1 α ; també ho fa amb pVHL, i això li permet impedir la interacció entre les dues proteïnes amb independència de l'estat d'hidroxilació [147].

VDU2 (pVHL-interacting deubiquitinating enzyme 2) catalitza la deubiquitinació d'HIF-1 α i, a la vegada, és una diana de pVHL. Així, l'equilibri entre la ubiquitinació promoguda per pVHL i la deubiquitinació controlada per VDU2 és un altre nivell de control en l'estabilització d'HIF-1 α [148].

L'acidosi, que se sol produir en hipòxia com a conseqüència de la glicòlisi anaeròbia, promou el segrestament de pVHL a nucleol, impedit així la destrucció d'HIF-1 α [149].

Finalment, pVHL augmenta la seva expressió després d'una hipòxia prolongada, de manera depenent d'HIF-1 [150]. Això aporta un nou punt

d'autoregulació negativa, que fa que a temps llargs d'hipòxia la quantitat d'HIF-1 α torni als nivells basals.

1.4.2.2. Sumoilació

El polipèptid SUMO-1, homòleg a la ubiquitina, s'uneix a les lisines 349 i 477 d'HIF-1 α en hipòxia i evita la seva poliubiquitinació i posterior degradació proteasomal; també provoca un augment de l'activitat transcripcional d'HIF-1 [151], possiblement per la regulació que exerceix sobre la localització de les proteïnes a nucli [152]. A més, l'expressió de SUMO-1 augmenta en resposta a hipòxia [153], aportant un element d'autoregulació positiva. Aquesta modificació també s'ha observat per a HIF-1 β [154], tot i que de manera independent d'oxigen, i HIF-2 α també té seqüències consens per a aquesta modificació, encara que no s'ha comprovat experimentalment.

1.4.2.3. p53

En resposta a hipòxia, el supressor de tumors p53 es fosforila i s'estabilitza, però permaneix transcripcionalment inactiu; tot i això, és capaç d'induir apoptosi. Es postula que, en aquest cas, enlloc d'actuar com a transactivador, s'associa a molècules co-repressores com les HDACs i impedeix la transcripció de gens amb funcions antiapoptòtiques [155]; aquest fenomen està en consonància amb la baixada general de la taxa de transcripció que es dona en hipòxia. Cal remarcar que aquests efectes de p53 es donen en casos d'hipòxia severa (propera a l'anòxia) o prolongada, però altres fenòmens associats, com l'acidosi provocada pel canvi metabòlic de les cèl·lules tumorals o el dany a DNA poden de fet contribuir a la seva activació transcripcional [156,157].

Un cop estabilitzada, p53 pot interaccionar amb HIF-1 α , i això porta a aquesta última a ubiquitinació i a la subseqüent degradació proteasomal per una via independent de pVHL i de la hidroxilació de prolines [158], aportant una ruta de

degradació d'HIF-1 α en cèl·lules tumorals hipòxiques. Aquesta interacció està controlada per l'estat de fosforilació d'HIF-1 α , de manera que la forma fosforilada s'uneix sobretot a HIF-1 β , i la desfosforilada a p53 [159]. CSN5/Jab1 té aquí una nova funció independent de l'activitat del CSN, bloquejant la formació del complex entre p53 i HIF-1 α [160].

Hi ha punts conflictius sobre la regulació d'aquest procés:

- Tot i que el contacte directe entre HIF-1 α i p53 s'ha demostrat [161], altres assajos ho han posat en dubte, reportant una interacció indirecta a través d'Hdm2^f [162] o d'altres proteïnes com p300 [163].

- S'ha proposat que Hdm2, via p53, és l'encarregada d'ubiquitinar HIF-1 α , però estudis recents han mostrat com la interacció entre HIF-1 α i Hdm2 en hipòxia evita la degradació de la primera i promou la seva activació independentment de la seva activitat E3 ubiquitin lligasa i de p53 [164]; de fet, Hdm2 s'indueix per hipòxia sense la participació del supressor de tumors [165]. Contràriament, el factor de transcripció Nur77, que s'indueix per hipòxia, reprimeix la transcripció d'Hdm2 [166].

- També s'han posat en dubte hipòtesis inicials segons les quals p53, per ubiquitinació preferencial d'HIF-1 α , quedaria protegida front a la degradació proteasomal, acumulant-se llavors a nucli per a actuar com a factor de transcripció [167], ja que dades experimentals han mostrat que HIF no és necessari per a l'estabilització de p53 [168]. La disparitat de resultats podria ser deguda a la diferència de condicions experimentals entre assajos.

- S'ha de tenir en compte que HIF-1 α i p53 s'estabilitzen a concentracions diferents d'oxigen. De fet, una hipòxia lleu no promou la interacció entre les dues proteïnes, sinó que permet la dimerització entre HIF-1 α i HIF-1 β (el rang òptim d'activació d'HIF-1 es troba entre el 5 i el 0.5% d'O₂, no en anòxia [169]). Però la interacció entre les dues proteïnes, que s'ha demostrat experimentalment, es podria

^f Hdm2: E3 Ubiquitin lligasa; reconeix p53 i promou la seva ubiquitinació i degradació proteasomal, mantenint-ne els nivells basals baixos. A la vegada, p53 controla positivament la transcripció d'Hdm2.

donar en el punt de solapament dels rangs de concentració d'oxigen òptims per a cada proteïna.

S'ha proposat un mecanisme segons el qual la severitat de la hipòxia pot decidir si la cèl·lula entra en apoptosi o permaneceix viable. En els primers moments, HIF-1 α s'acumula i exerceix la seva resposta promotora de la supervivència. Amb una hipòxia més severa, o a mesura que aquesta es va prolongant, p53 comença a acumular-se. Mentre els nivells de proteïna són baixos, exerceix una inhibició de la transactivació d'HIF-1 per competència per p300/CBP [163]; tot i que en hipòxia severa p53 s'associa preferentment a co-repressors més que a co-activadors, la interacció de p53 inactiu amb p300 sí s'ha observat, i també es podria donar en el cas que es produís un dany al DNA. Quan es comencen a acumular quantitats grans de la proteïna, s'estimula la degradació proteasomal d'HIF-1 α (via Hdm2 o per altres mecanismes), i p53 pot actuar com a promotora de l'apoptosi induïda per hipòxia [170].

1.4.2.4. Hsp90

Hsp90, xaperona molecular, actua a varis nivells sobre HIF-1 α : regula el seu correcte plegament, interaccionant amb el domini bHLH-PAS en normòxia i alliberant-la en hipòxia [171]; evita la seva degradació proteasomal mitjançant un mecanisme independent de pVHL, de la hidroxilació de prolines i de la concentració d'oxigen [172]; a més, és necessària per a l'obtenció d'una forma activable d'HIF-1 en hipòxia [171], modulant la conformació de l'heterodímer HIF-1 α /HIF-1 β per a afavorir la seva interacció amb el HRE [173]. El mecanisme d'aquesta modulació és desconegut, ja que Hsp90 no es co-transloca amb HIF-1 α cap a nucli i, com s'ha dit, no interacciona amb HIF-1 α en hipòxia.

1.4.2.5. Òxid nítric (NO)

El NO és una molècula de senyalització gasosa que, secretada per cèl·lules endotelials o neurones, actua de manera paracrina i autocrina com a vasodilatadora, antiinflamatòria i neurotransmissora. Concentracions baixes (fisiològiques) d'aquest gas atenuen l'estabilització d'HIF-1 α provocada per hipòxia, promovent la degradació dependent de PHDs [174]. S'hipotetitza que el NO, per inhibició de la cadena respiratòria mitocondrial, provoca una redistribució de l'O₂ cap a zones de la cèl·lula on les PHDs en poden fer ús, de manera que no perden la seva activitat encara que hi hagi una situació d'hipòxia [175]. Per altra banda, la baixada d'oxigen estimula la producció de NO, ja que HIF-1 activa la transcripció d'iNOS (NO sintasa induïble) [176], i per tant ens trobariem de nou amb un mecanisme autoregulator en el procés d'estabilització d'HIF-1 α .

En canvi, concentracions altes del gas mantenen els nivells d'HIF-1 α en hipòxia [177], sense participació de la cadena respiratòria mitocondrial, tot i que nivells tan elevats només es troben en processos patofisiològics. De fet, *in vivo*, la producció de NO en hipòxia sol ser baixa tot i que hi hagi una inducció de NOS, degut a la quantitat limitant de cofactors i d'oxigen molecular necessaris per a l'activitat de l'enzim.

1.4.2.6. mRNA

En resposta a una situació d'hipòxia, i com a mesura d'estalvi energètic, baixa la taxa de transcripció de mRNA i la síntesi de proteïnes [178,179]. De fet, fins ara, s'ha mostrat com l'augment de la quantitat de proteïna HIF-1 α en resposta a hipòxia és principalment el resultat de la inhibició de la seva degradació, no de l'activació de la seva síntesi. Tot i això, HIF-1 α és capaç de veure augmentada també la seva expressió, perquè el seu mRNA conté un IRES (Internal Ribosome Entry Site) en la

zona 5'-UTR que permet mantenir la síntesi proteica en condicions que són inhibidores per a la traducció depenent del cap^g [180].

Un efecte oposat el tenen els transcripts antisentit naturals d'HIF-1 α (aHIF) que s'han trobat en teixit fetal, adult i tumoral, i que incrementen la velocitat de degradació del mRNA d'HIF-1 α . Aquests aHIF tenen HREs en el seu promotor, el que explicaria la seva sobreexpressió en situacions d'hipòxia i donaria un nou punt d'autoregulació d'HIF-1 [181].

1.4.3. Regulació de l'activitat transcripcional d'HIF-1 per la concentració d'oxigen

Un cop HIF-1 α està estabilitzada, es produeix la seva entrada a nucli (en un procés independent de la concentració d'oxigen), on dimeritza amb HIF-1 β per a formar el factor de transcripció complet.

1.4.3.1. p300/CBP i FIH-1

Les condicions hipòxiques promouen la formació d'un complex entre HIF-1 α i els cofactors p300/CBP^h amb capacitat per a unir-se al DNA [182]. L'estat redox del domini C-TAD d'HIF-1 α afecta aquesta unió [183], sent necessària la reducció de la cisteïna 774, que la tiorredoxina i REF-1 s'encarreguen de mantenir [184].

FIH-1, enzim amb activitat hidroxilasa que també utilitza oxigen molecular (O₂) com a substrat, 2-oxoglutarat (però no ascorbat) com a cosubstrat i Fe²⁺ com a cofactor, hidroxila l'asparagina 803 d'HIF-1 α en condicions de normòxia [185]. Aquest grup hidroxil crea impediments estèrics que dificulten la interacció amb p300/CBP [186], de manera que inhibeix qualsevol activitat HIF-1 encara que alguna subunitat α escapi a la degradació proteasomal en situacions de normòxia. Tot i que no s'ha identificat una seqüència consens per a aquesta hidroxilació, la valina 802 sembla

^g La traducció depenent del cap és la ruta principal d'iniciació de la traducció en eucariotes.

^h p300 i CBP són membres d'una família de coactivadors transcripcionals que actuen de pont entre els factors de transcripció i els complexos transcripcionals. La seva acció promotora de la transcripció podria estar relacionada amb la seva activitat histona acetiltransferasa.

crítica per a la reacció [187]. Addicionalment, per a la correcta activitat d'FIH-1 es requereix la seva dimerització i l'eliminació d'una fosforilació sobre la treonina 796 d'HIF-1 α , que quan està present impedeix la reacció d'hidroxilació sobre l'asparagina 803 [188]. En hipòxia s'inhibeix l'activitat d'FIH-1, es pot donar la interacció entre HIF-1 α i p300/CBP, i per tant hi ha activitat transcripcional dependent d'HIF-1. Aquesta regulació a nivell d'hidroxilació de l'asparagina també es dona per a la subunitat HIF-2 α [189]. Tenim, doncs, un segon mecanisme relacionat amb la hidroxilació d'aminoàcids implicat en la inducció hipòxica d'HIF; el primer, la hidroxilació de prolines, regula l'estabilitat de la proteïna; la hidroxilació de l'asparagina, en canvi, regula la seva transactivació. A diferència de les PHDs, però, el mRNA de FIH-1 no és induïble per hipòxia, la localització de la proteïna és exclusivament citoplasmàtica, i presenta certa activitat fins i tot en situacions d'hipòxia lleu, ja que la seva K_m és menor que la de les PHDs (aproximadament un 40% de la concentració atmosfèrica d'O₂) [137,187,190].

Així, degut a aquestes diferències d'activitat de les dues hidroxilases, es pot idear un model segons el qual PHD i FIH-1 regulen de manera diferencial els dos TADs d'HIF-1 α (Figura 9): en normòxia, quan tots dos enzims són actius, l'activitat d'HIF-1 està completament inhibida; una petita baixada en la concentració d'oxigen augmenta de seguida els nivells de proteïna HIF-1 α per inhibició de l'activitat PHD, i només el N-TAD queda lliure per a controlar la transcripció gènica d'un primer grup de gens; però la inhibició de la transactivació en el C-TAD es manté fins que la hipòxia és major. Llavors, FIH-1 s'inactiva, i es dona la transcripció de tot el conjunt de gens regulats per HIF. Hi ha models que consideren que, a través del N-TAD, HIF-1 promou la transcripció de gens independentment del HRE (p21, hTERT, BRCA1), per desplaçament de repressors transcripcionals (com c-myc) dels promotors d'aquestes proteïnes a través d'un mecanisme independent de la transactivació [191], mentre la funcionalitat dels dos TADs activa els gens amb un HRE (VEGF, Eritropoietina, PCK).

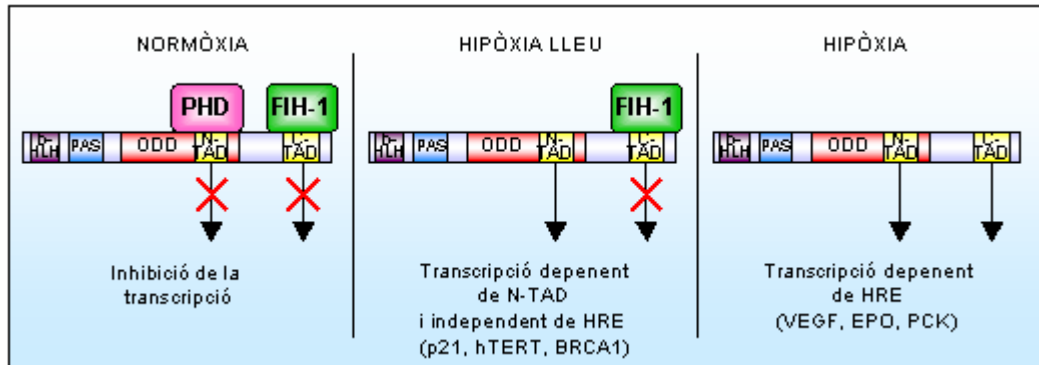


Figura 9. Activació diferencial de gens pel N-TAD i el C-TAD d'HIF-1 α , i regulació per PHD i FIH-1.

El N-TAD i el ODD estan solapats, i per tant l'activació transcripcional i l'estabilitat de la proteïna són interdependents. De fet, s'ha suggerit que en el cas del N-TAD, l'activació transcripcional s'aconsegueix simplement per estabilització de la proteïna. En canvi, el C-TAD està subjecte a moltes modificacions post-traduccionals que regulen la seva activitat (S-nitrosació, hidroxilació), que és molt més alta que la del N-TAD.

Estudis estructurals han mostrat que FIH-1 interacciona amb HIF-1 α , però també amb pVHL, formant un complex ternari [192]. S'hipotetitza que la unió de pVHL a la hidroxiprolina en normòxia acosta FIH-1 al C-TAD d'HIF-1 α , i llavors es facilita la hidroxilació de l'Asparagina (Figura 10).

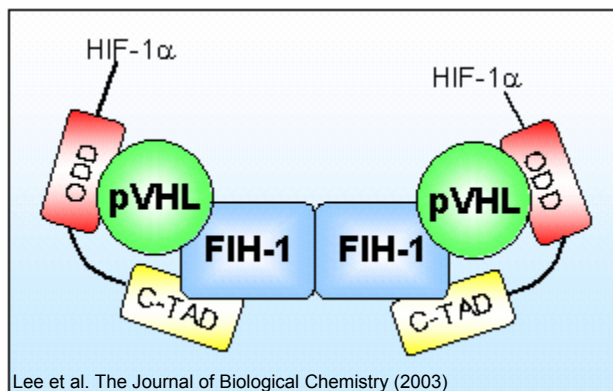


Figura 10. Complex FIH-1 - pVHL - HIF-1 α .

Hi ha dades, però, que mostren que pVHL no és essencial per a l'activitat repressora d'FIH-1 [193], de manera que, a més d'hidroxilar l'asparagina d'HIF-1 α , FIH-1 ha de tenir un nivell addicional d'actuació sobre l'activitat d'HIF-1. Aquest podria ser el recrutament d'histona-deacetilases [194].

1.4.3.2. HDACs (Histona-deacetilases)

L'acetilació de residus lisina de les histones elimina càrregues positives de les proteïnes, reduint així l'afinitat entre aquestes i el DNA. Això facilita l'accés dels factors de transcripció i la RNA polimerasa a la regió promotora. Per això, generalment, l'acetilació d'histones promou la transcripció, i la desacetilació la reprimeix.

Igual que FIH-1, i a més de promoure la degradació proteasomal d'HIF-1 α mitjançant ubiquitinació, pVHL també funciona com a repressor transcripcional per reclutament d'HDACs [194]. La proteïna VHL α s'uneix a pVHL i forma un complex amb KAP1/TIF-1 β que podria participar en aquest procés [195] (Figura 11).

HDAC7, al contrari, actua com a activadora de la transcripció: és capaç d'interaccionar amb HIF-1 α , i tots dos es transloquen a nucli en situacions d'hipòxia, formant un complex actiu transcripcionalment amb p300 [196].

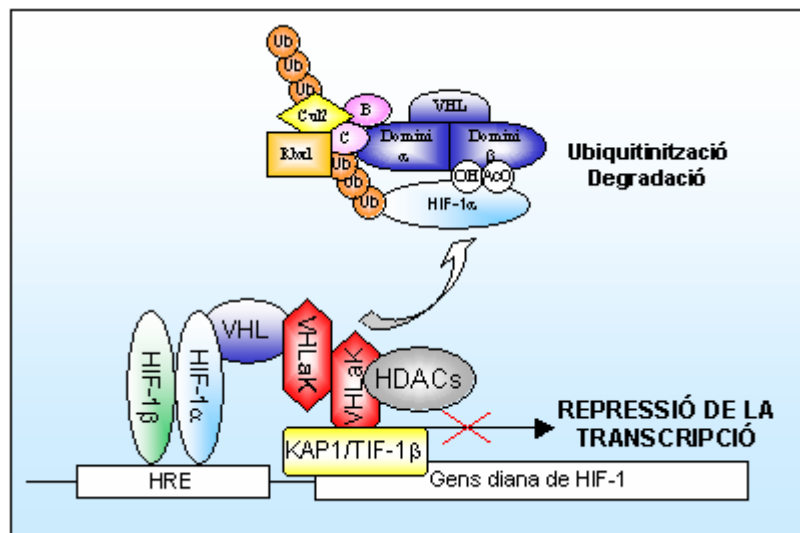


Figura 11. Repressió de la transcripció per pVHL.

1.4.3.3. Rutes quinasa

L'estabilització d'HIF-1 α i la seva interacció amb cofactors no són suficients per a activar totalment la transcripció dependent d'HIF-1: fan falta modificacions post-

traduccionals addicionals, també dependents d'hipòxia, o parcialment induïbles per ella, que completin aquesta activació (revisat per Minet et al. [197]). Les fosforilacions, per exemple (HIF-1 α és una proteïna fosforilada), contribueixen sobretot a promoure l'activitat transcripcional del factor o a activar la síntesi de la subunitat α , més que a establir la proteïna. Com s'ha esmentat anteriorment, per exemple, la fosforilació de la treonina 796 d'HIF-1 α impedeix l'activitat d'FIH-1 i per tant activa HIF-1 transcripcionalment; així mateix, HIF-1 β interacciona preferentment amb la forma fosforilada d'HIF-1 α .

Les rutes de MAPK i PI3K tenen un efecte sinèrgic sobre la síntesi i transactivació d'HIF-1 en resposta a hipòxia [198], tot i que no hi ha un acord sobre si són directament activades per la disminució d'oxigen o hi ha altres factors implicats: aquestes vies responen també a factors de creixement o citoquines, modulant igualment l'activitat d'HIF-1, i la seva activació per hipòxia no és un fenomen observat universalment [199,200]. El fet que hi hagi tantes discrepàncies es deu a que les rutes bioquímiques implicades en la transactivació d'HIF-1 poden variar segons la línia cel·lular estudiada. Algunes d'aquestes rutes podrien no formar part de la via sensora de la hipòxia, però sí actuar sinèrgicament amb ella; la intercomunicació entre les vies de senyalització permet la regulació de la resposta hipòxica específicament per a cada tipus cel·lular i fins i tot per a cada gen diana.

La via PI3K/Akt (Figura 12) activa l'expressió de la proteïna HIF-1 α i augmenta la seva estabilitat. Una diana d'aquesta ruta de senyalització és FRAP/mTOR quinasa, que activa llavors la proteïna p70^{S6K}, necessària per a l'inici de la traducció. Així mateix, mTOR fosforila (i inhibeix) la proteïna reguladora de la traducció 4E-BP, el que incrementa la velocitat de síntesi proteica. Aquest mecanisme, però, és segurament minoritari en l'establiment d'HIF-1 α per la ruta PI3K, perquè de fet mTOR s'inhibeix (esdevé hipofosforilat) en resposta a hipòxia [201]; com a resultat, baixa la síntesi global de proteïnes com a mesura d'estalvi energètic en resposta a un estrès com és

la hipòxia. També dependrà, però, de si l'existència de mutacions en la via o la influència d'altres factors poden contrarrestar aquesta inhibició. La ruta PI3K també regula negativament el factor de transcripció FOXO4, l'activitat del qual disminueix els nivells de proteïna HIF-1 α [202]. A més, promou l'expressió d'hsp90 i hsp70, necessàries per a la seva estabilització [203]. Igualment, inhibeix l'activitat quinasa de GSK3, que quan fosforila el ODD, promou la seva degradació proteasomal [204]. S'ha determinat, però, que la regulació que PI3K/Akt exerceix sobre HIF-1 α és dependent de la durada de l'estrés hipòxic, ja que a temps llargs l'activitat Akt s'atenua, així com la inhibició que aquesta fa sobre GSK3, de manera que els nivells d'HIF-1 α tornen a disminuir [205]. PTEN regula negativament aquesta via.

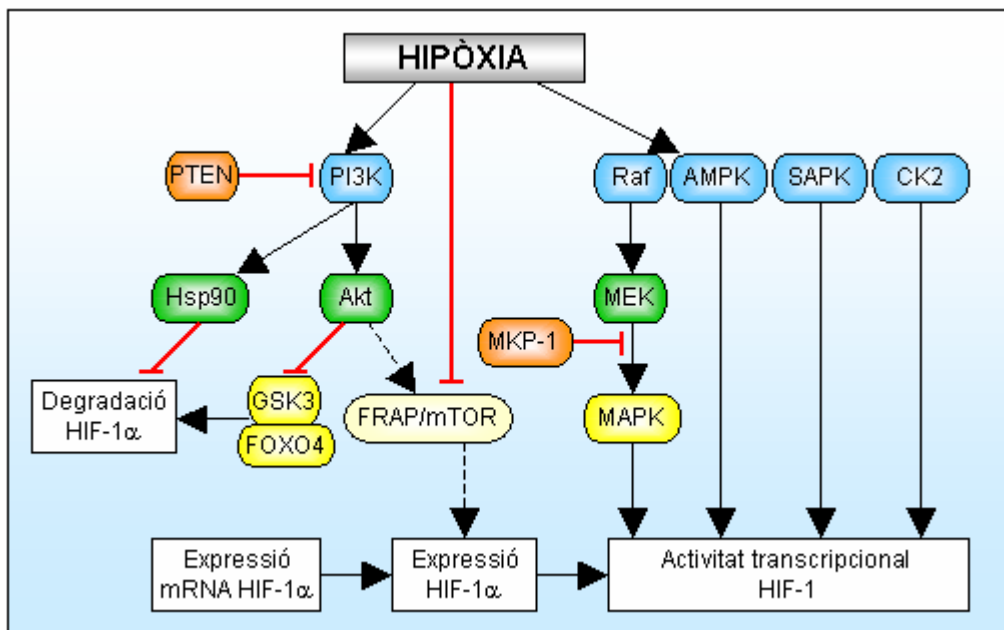


Figura 12. Senyalització per rutes de quinases i els seus efectes sobre HIF-1.

La via de les MAPK (Figura 12) sembla influir més en la transactivació del factor de transcripció que no en l'estabilització de la proteïna o en la seva unió a DNA [206], tot i que hi ha dades contradictòries sobre si hi ha fosforilació directa sobre el domini regulador d'HIF-1 α [207] no [208]; de fet, no s'han identificat els residus d'HIF-1 α fosforilats per aquesta via. Això fa hipotetitzar, per exemple, que l'acció de les MAPK es podria donar a nivell de p300/CBP, promovent la seva interacció amb HIF-

1 α . MKP-1 inactiva la via de MAPK, i regula així, negativament, l'activació d'HIF-1; aquesta proteïna augmenta la seva expressió en resposta a hipòxia [209], i per tant tenim un altre element d'autoregulació.

De la mateixa forma actuen les SAPK (JNK o p38, que podria eliminar la inhibició del domini C-terminal d'HIF-1 α) [210,211] i la AMPK [212], que estimulen l'activitat transcripcional d'HIF-1 (Figura 12).

La serina/treonina quinasa Casein quinasa 2 (CK2) (Figura 12) augmenta la seva expressió i activitat en hipòxia, i modula positivament l'activació transcripcional d'HIF-1 sense afectar l'estabilitat de la proteïna ni la seva unió a DNA. Es desconeix, però, si hi ha fosforilació directa de la subunitat α o si el que es regula són proteïnes intermediàries, com els coactivadors transcripcionals [213].

1.4.3.4. ROS (Reactive Oxygen Species)

Encara que les ROS (peròxid d'hidrogen (H_2O_2), radical hidroxil ($\bullet OH$), radical superòxid ($\bullet O_2^-$)) s'han considerat tradicionalment productes tòxics del metabolisme per la seva capacitat d'oxidar biomolècules, cada cop és més evident que quantitats baixes, no tòxiques, també poden participar en la senyalització cel·lular, interaccionant amb elements transductors de senyals; de fet, la seva generació es pot donar en resposta a factors de creixement i citoquines, com el VEGF en la iniciació de l'angiogènesi [214].

En la senyalització per a l'activació d'HIF-1 α en resposta a hipòxia també tenen un paper, tot i que no està clarament definit si és per un augment o una disminució en la seva quantitat, ja que hi ha dades que recolzen totes dues hipòtesis.

a) Disminució de ROS. L'exposició de cèl·lules endotelials a hipòxia inhibeix l'alliberació d' H_2O_2 al medi extracel·lular. Es postula que un enzim amb activitat NADPH oxidasa és l'encarregat de convertir l' O_2 en ROS, i que una disminució de la quantitat d'oxigen disponible redueix llavors la producció de ROS, eliminant-se així la

inhibició de la via de senyalització que porta a l'activació d'HIF-1 [215]. Una proteïna candidata per a aquesta funció és la NADPH-P450 reductasa, la inhibició de la qual atenua l'expressió d'eritropoietina induïda per hipòxia [216].

b) Augment de ROS (revisat per Bell et al. [217]). Encara que sembla contradictori que una disminució d'oxigen pugui provocar un augment de ROS, s'ha proposat un mecanisme que ho explica: en hipòxia es redueix la V_{\max}^i del complex citocrom c oxidasa (complex IV) de la cadena de transport electrònic mitocondrial [218], i això augmenta la vida mitja dels transportadors d'electrons reduïts (complex III), que llavors poden transferir un electró a l' O_2 , produint en darrer terme O_2^{\bullet} i H_2O_2 [219]. Segons aquesta hipòtesi, un augment de ROS activa l'estabilització d'HIF-1 α i la transcripció dependent d'hipòxia; dades experimentals que mostren com la inhibició de la cadena de transport electrònic redueix la inducció hipòxica d'HIF-1 α la recolzen [220]. Les cèl·lules sense mitocondris funcionals (ρ^0), per exemple, perden la capacitat d'induir la proteïna HIF-1 α en resposta a hipòxia [221]; tot i que també s'han obtingut resultats completament oposats [222], aquests s'atribueixen a que els assajos s'han realitzat en anòxia (condició que inhibeix completament qualsevol activitat residual de les hidroxilases d'HIF-1 α), i a l'heterogeneïtat en la preparació de les cèl·lules ρ^0 . Aquesta regulació podria donar-se, a més, a través de quinases com p38 que, per mecanismes encara desconeguts modularien l'activitat de les hidroxilases d'HIF (PHDs i FIH-1) [223].

Sigui quin sigui el model vàlid, queda clar que les ROS tenen un paper en l'activació d'HIF-1, tot i que es desconeixen les proteïnes intermediàries. Podria ser, de fet, que s'estiguessin donant tots dos mecanismes a la vegada, és a dir, un augment de la producció de ROS en mitocondri i una baixada de la producció per part d'altres oxidases; llavors, l'efecte dels ROS dependria de la quantitat total generada i de la

ⁱ Velocitat màxima de reacció

seva distribució subcel·lular. Fins i tot podria ser dependent del grau d'hipòxia, ja que per exemple en anòxia (0% d'O₂) no s'ha observat producció de ROS [224].

1.4.3.5. PHD2

PHD2 interacciona amb HIF-1 α independentment de la concentració d'oxigen. En normòxia es dona la hidroxilació de prolines i la degradació proteasomal d'HIF-1 α , com s'explica en el capítol 1.4.2.1. En canvi, quan l'oxigen és limitant, PHD2 reprimeix l'activitat transcripcional d'HIF-1 (del N-TAD) sense alterar els nivells de proteïna (ja que no té activitat hidroxilasa), per reclutament de ING4, supressor de tumors i component del complex remodelador de la cromatina. Aquest és un mecanisme autoregulator que permetria evitar una resposta hipòxica excessiva [225,226].

1.4.3.6. Altres

HIF-3 α 4, variant de splicing d'HIF-3 α , no té ODD, N-TAD ni C-TAD, i funciona com a element regulador negatiu dels HIFs, formant-hi complexos que impedeixen la seva unió a l'HRE. A més, la seva expressió està inhibida en hipòxia, aportant un mecanisme autorregulator positiu de l'activitat HIF-1 [227].

CITED2 (també anomenada p35srj) inhibeix la transactivació d'HIF-1 competint per la seva interacció amb p300/CBP, però en aquest cas se sobreexpressa en hipòxia, de manera que l'autorregulació és negativa [228]. De la mateixa forma actua CITED4, tot i que es desconeix si la seva expressió està modulada per oxigen [229].

1.4.4. Regulació d'HIF-1 independent de la concentració d'oxigen

A més de la hipòxia, altres estímuls regulen l'acumulació i activitat d'HIF-1 α en normòxia: factors de creixement (HGF, IGF, EGF, bFGF) [230-233], hormones (insulina, andrògens, hormones tiroidees) [234-236], citoquines (TNF- α , interleuquina-1 β) [234,237], mediadors angiogènics (endotelina-1) [238], òxid nítric [174], metalls de transició (cobalt, níquel, vanadat, crom, zinc) [239-242], quelants de ferro

(desferroxamina, desferriexoquelina) [243,244], mutacions que activen oncogens, inactiven gens supressors de tumors o desregulen rutes de senyalització [245] o infeccions per virus tumorals (Epstein-Barr) [246]. Els efectes d'alguns d'aquests estímuls sobre HIF poden ser també aditius als de la hipòxia [247-250], però a diferència d'aquesta, la majoria (amb excepció dels metalls de transició) indueixen HIF-1 per un augment en la transcripció d'HIF-1 α més que per una estabilització de la proteïna (per exemple per activació de rutes quinasa com PI3K), i solen ser específics per a cada tipus cel·lular.

1.4.4.1. Clorur de cobalt (CoCl₂)

L'exposició de cèl·lules a cobalt, metall de transició amb propietats carcinogèniques [251], mimetitzava la resposta a hipòxia, ja que inhibeix la ubiquitinació d'HIF-1 α i indueix la funció dels TAD.

Hi ha diverses explicacions per a aquest mimetisme (que no s'exclouen entre elles):

a) El cobalt podria ocupar el lloc d'unió del Fe²⁺ en la PHD. Alternativament, podria unir-se al transportador de ferro DMT-1 i bloquejar-lo (hi té major afinitat i la velocitat de bescanvi és menor [252]), de manera que s'inhibiria l'entrada del cofactor a l'interior cel·lular. També s'ha observat que l'exposició de cèl·lules a cobalt (i a altres metalls) provoca una depleció d'ascorbat intracel·lular i l'activació d'HIF-1 [253]. En resum, la manca de cofactors provocada pel cobalt inhibiria l'activitat PHD, i HIF-1 α podria acumular-se de la mateixa forma que ho fa en hipòxia. Així mateix, FIH-1 també s'inhibeix en presència del metall, i per tant permet l'activació transcripcional d'HIF-1 [254].

b) HIF-1 α i HIF-2 α uneixen cobalt *in vitro*, independentment del seu estat d'hidroxilació, per la zona de l'ODD per on interacciona pVHL [255,256]. Així, el cobalt trencaria la unió entre pVHL i HIF- α , i s'evitaria la degradació proteasomal.

c) El metall és capaç d'unir-se també a Cullin-2, element catalític del complex E3 ubiquitin lligasa (Figura 8), provocant la seva inactivació i, per tant, inhibint la ubiquitinació d'HIF-1 α [257].

Però, encara que tant la hipòxia com el CoCl₂ acabin alterant la interacció entre HIF- α i pVHL, les seves rutes de senyalització són diferents. En tots dos casos hi ha producció de ROS i activació de rutes quinasa [258], però amb el cobalt no hi ha participació mitocondrial [221]. A més, després de l'estabilització d'HIF- α , el mecanisme d'acció de tots dos estímuls divergeix completament, ja que, *in vitro*, el cobalt provoca una inhibició de l'angiogènesi enlloc de l'activació promoguda per la hipòxia [259].

1.4.4.2. Òxid nítric (NO)

L'acció del NO sobre HIF-1 α presenta dualitat. Com s'ha mostrat en el capítol 1.4.2.5., en hipòxia aquest inhibeix l'estabilització de la proteïna i la seva activitat transcripcional. En canvi, en normòxia, i a concentracions fisiològiques, l'estabilitza, indueix la seva síntesi i promou l'expressió del seus gens diana (a concentracions més elevades aquesta acció també es dona, però és més lenta) [260].

Aquests efectes es podrien produir per modulació de rutes de transducció del senyal [261] o per modificació post-traducciona. De fet, la cisteïna 800 d'HIF-1 α és una diana de S-nitrosació per donadors de NO i per NO endogen, i aquesta modificació promou la seva estabilització en normòxia, així com la seva interacció amb p300/CBP, promovent l'activitat transcripcional [262]. Una altra possibilitat seria que el NO competís pel lloc d'unió de l'O₂ de les PHDs, fenòmen que ja s'ha observat en altres oxigenases [263], i que per tant inhibís la seva activitat, permetent l'estabilització d'HIF-1 α .

En la figura 13 es resumeixen els efectes de NO sobre HIF-1 α .

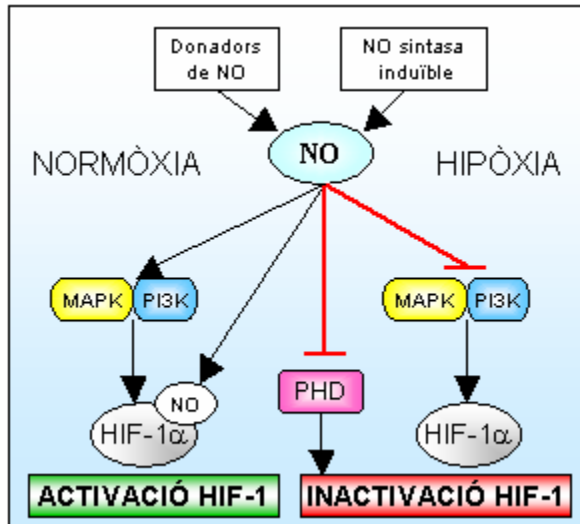


Figura 13. Efectes del NO sobre HIF-1 α .

1.4.4.3. Oncogenes i gens supressors de tumors

Tot i que en la majoria de casos la presència d'HIF en tumors correlaciona amb un baix estat d'oxigenació, moltes línies cel·lulars tumorals expressen la subunitat α constitutivament en condicions de normòxia; això mostra la influència que la càrrega genètica de cada tipus cel·lular té sobre la modulació d'HIF-1 [264].

L'expressió i activitat d'HIF-1 pot respondre a alteracions genètiques, com l'activació d'oncogenes (v-src, h-ras) o la inactivació de supressors de tumors (pVHL, p53, PTEN). En alguns casos també s'han trobat mutacions que afecten directament a HIF-1, polimorfismes del gen que poden alterar la seva estabilitat i activitat i que s'han associat amb la progressió tumoral [265-270].

a) Supressors de tumors: la seva inactivació promou l'activitat HIF-1, ja que solen ser proteïnes participants en la regulació de la subunitat α .

- pVHL. La pèrdua de funció de la proteïna pVHL està associada a la malaltia de von Hippel Lindau, síndrome cancerosa hereditària caracteritzada per una elevada predisposició a l'aparició de tumors altament vascularitzats, hemangioblastomes del sistema nerviós central i la retina, sovint en associació amb altres tumors com els carcinomes de ronyó i feocromocitomes. Degut a la regulació que pVHL exerceix sobre HIF-1 α , la seva pèrdua de funció promou l'acumulació de la proteïna per falta

d'ubiquitinació i degradació proteasomal, i estimula també la seva activitat transcripcional; això explicaria l'elevada vascularització dels tumors, donada la influència que HIF-1 exerceix sobre l'angiogènesi. La capacitat supressora de tumors de pVHL depèn completament de que aquest sigui capaç de reconèixer les seves proteïnes diana, tot i que hi ha resultats contradictoris respecte a que HIF-1 α o HIF-2 α siguin els substractes crítics inductors de l'oncogenicitat en cèl·lules deficientes en pVHL [271,272]. Tot i això, un punt calent de mutacions en pVHL és el seu lloc d'interacció amb la hidroxiprolina d'HIF-1 α [273].

- PTEN. Aquest supressor de tumors es troba inactivat en càncer de mama, pròstata, cerebral i altres [274]. La seva disfunció permet hiperactivar la via de supervivència PI3K/Akt, que promou la proliferació cel·lular i augmenta la resistència a apoptosi. A més, Akt estabilitza HIF-1 α , i per tant PTEN és un regulador de l'expressió de factors angiogènics i de gens induïbles per hipòxia [275].

- p53. En situacions d'hipòxia, la proteïna salvatge té activitat supressora de tumors, promovent l'apoptosi i inhibint l'angiogènesi dependent d'HIF-1. Però més del 50% de tots els càncers humans presenta mutacions en la proteïna [276], el que provoca la pèrdua de la seva funció; a més, aquesta inactivació també es pot donar per sobreexpressió d'Hdm2, que la porta cap a ubiquitinació i proteasoma [277]. Les cèl·lules amb p53 mutat tenen major potencial de creixement i menor capacitat apoptòtica, i com que la inactivació de p53 promou l'activitat transcripcional d'HIF-1 (veure capítol 1.4.2.3.), també tenen major potencial angiogènic i millor adaptació metabòlica. És per tots aquests avantatges que les concentracions baixes d'oxigen dels tumors seleccionen les cèl·lules que han perdut l'activitat p53.

- p14^{ARF}. Com a conseqüència de defectes en la proteïna Rb o l'expressió d'oncogens com Ras, E1A o Myc, es desregula l'activitat del factor de transcripció E2F-1, que induïx p14^{ARF}. Aquest, per inhibició de l'activitat Hdm2, estabilitza p53, i així, en els casos on p14^{ARF} no està mutat, es produeix una parada del cicle cel·lular i s'indueix apoptosi. En quant a HIF-1, p14^{ARF} inhibeix la seva activitat transcripcional,

segrestant la subunitat α en el nucleol en condicions de normòxia [278]. Per tant, si apareixen mutacions en p14^{ARF}, es promou l'activitat transcripcional d'HIF-1.

b) Oncogens: la seva activació pot resultar en l'estabilització d'HIF-1 α en normòxia, per inhibició de la hidroxilació de prolines o per mecanismes alternatius, que poden ser diferents per a cada oncogen [279].

- ras: la transformació per H-*ras* indueix l'expressió dels gens diana d'HIF-1 i augmenta els nivells de proteïna HIF-1 α [280]. L'expressió de k-*ras* s'associa a increments en la taxa glicolítica [281] i a l'angiogènesi mediada per VEGF [282]. La sobreexpressió de V12-*ras* augmenta l'expressió d'HIF-1 α i HIF-2 α mitjançant un mecanisme sinèrgic amb la hipòxia [283]. Aquests efectes podrien estar relacionats amb l'activació que l'oncogen exerceix sobre les rutes de senyalització MAPK i PI3K [284,285].

- src: la transformació per v-*src* augmenta la quantitat de proteïna HIF-1 α i l'activació dels seus gens diana, i també es podria donar per regulació de la ruta PI3K [286].

Com es resumeix a la taula 3 (Apèndix 1), HIF està subjecte a molts nivells independents de regulació. Això permetria respondre a canvis subtils en la concentració d'oxigen, i ajudaria a assegurar el control de la resposta. En la mateixa taula també s'indiquen els punts d'autorregulació (positiva i negativa). La presència d'elements reguladors negatius té sentit si tenim en compte que l'activitat HIF-1, si és massa prolongada, és nociva per a la supervivència de les cèl·lules hipòxiques [287]; de fet, la incubació mantinguda en hipòxia provoca un retorn als nivells basals d'HIF-1 α , és a dir, la seva desaparició [288]. Un grau més dintre de l'autorregulació negativa ve donat per dades recents que mostren que, en hipòxia, HIF-1 activa transcripcionalment elements necessaris per a la seva degradació independents de la ruta de pVHL/PHD [289].

En la figura 14 es resumeix també el conjunt de modificacions post-traduccionals que regulen l'estabilitat i l'activitat d'HIF.

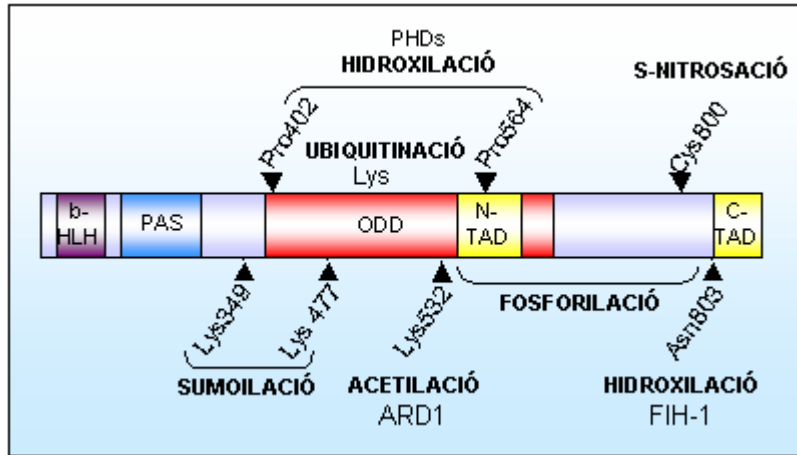


Figura 14. Resum de modificacions post-traduccionals sobre HIF-1α.

1.4.5. HIF-2α

HIF-2α, una de les isoformes d'HIF-1α, comparteix amb aquesta l'estructura en dominis (Figura 15), així com el mecanisme de regulació per oxigen i la participació en la resposta a hipòxia.

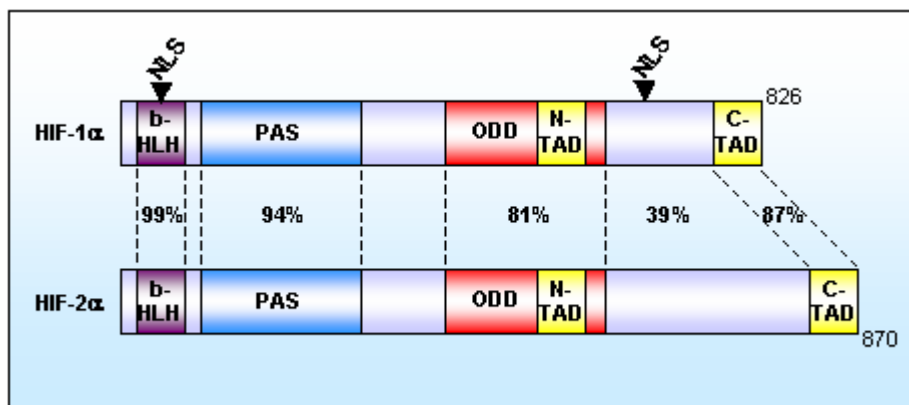


Figura 15. Comparació dels dominis d'HIF-1α i HIF-2α.

Es mostra el percentatge d'homologia de cada domini.

Tot i que HIF-1 i HIF-2 s'uneixen al mateix HRE, els seus gens diana són diferents [290], i per tant la seva acció en la resposta a hipòxia és no redundant. A

aquesta especificitat contribueix el fet que HIF-2 α mantingui estables els nivells d'expressió després d'una hipòxia prolongada mentre els nivells d'HIF-1 α baixen [288]. A més, HIF-2 α controla l'expressió dels aHIF, reguladors negatius dels HIF (veure capítol 1.4.2.6.). Aquesta trans-regulació entre HIF-1 i HIF-2 contribueix a modular encara més la resposta a hipòxia. Així mateix, la proteïna NEMO participa en el reclutament de p300/CBP per part d'HIF-2 α però no per a HIF-1 α [291]. Com que les PHDs tenen diferents afinitats per les dues isoformes α , la modulació de l'activitat PHD també podria decidir el resultat transcripcional final.

L'expressió de les dues proteïnes en resposta a hipòxia en diferents tipus cel·lulars es dona també de manera complementària però no solapada [292]: per exemple, les cèl·lules tumorals epitelials solen tenir nivells més elevats d'HIF-1 α que d'HIF-2 α ; en canvi, en macròfags i cèl·lules endotelials la proporció és inversa [293], així com en cèl·lules de neuroblastoma hipòxiques [294].

Molts gens regulats per HIF-2, a més, no presenten una activació substancial per hipòxia [295], ja que, de fet, HIF-2 participa també en altres processos fisiològics, desenvolupant, per exemple, un paper fonamental en l'adaptació a la hipoglucèmia [296].

1.4.6. HIF en els processos fisiològics no tumorigènics

A més d'en el creixement tumoral, la hipòxia juga un paper molt important en processos inflamatoris com l'artritis reumatoide, en malalties on la tensió d'oxigen és insuficient degut a una funció respiratòria deficient, com la fibrosi quística o la bronquitis crònica, en processos d'isquèmia cerebral o també en malalties proliferatives benignes com la psoriasi, la retinopatia associada a la diabetes o l'epilèpsia.

HIF-1 regula la resposta a hipòxia en aquests teixits. Per exemple, en enteròcits de la mucosa intestinal sotmesos a hipòxia a causa d'hemorràgies [297], en

cardiomiòcits [298], cèl·lules neuronals [248], en cèl·lules endotelials (la hipòxia modula el to i l'estructura vascular, l'angiogènesi i l'eritropoesi [299]), en cèl·lules de la musculatura llisa de l'artèria pulmonar [300], cèl·lules hepàtiques estelades [301], cèl·lules epitelials de pulmó [288] i en la resposta inflamatòria [302].

Així mateix, HIF-1 i HIF-2 tenen funcions complementàries però no redundants en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari [303-308]. HIF-1 participa en la placentació i en el desenvolupament dels sistemes esquelètic, immune i nerviós; HIF-2 controla la vasculogènesi; i tot dos factors regulen la cardiogènesi, l'hematopoesi, i el desenvolupament del ronyó i el sistema respiratori.

1.5. Hipòxia, HIF i càncer

Així com la hipòxia és una característica comú dels tumors, HIF-1 α també es troba sobreexpressada en molts càncers i les seves metàstasis, com els de mama, ovari, cervix, endometri, estómac, oligodendroglioma, esòfag i orofarige, i amb més freqüència en tumors malignes que benignes [309]. La presència d'HIF-1 α correlaciona en molts casos amb l'estat del tumor, la vascularització, i un pronòstic desfavorable de la malaltia [310,311], ja que sol representar un avantatge per als tumors, induint la proliferació, la invasibilitat, l'angiogènesi i la metastatització [312-315]. Tot i això, també s'han reportat casos contraris, on la sobreexpressió d'HIF-1 α s'associa a un descens en la mortalitat [316], encara que la proporció és menor. De la mateixa forma, els nivells d'HIF-2 α també s'han correlacionat amb el grau del tumor i amb una major malignicitat [317]. La importància relativa d'HIF-1 α o HIF-2 α en la progressió de la malaltia és depenent de cada tumor.

Molts gens regulats per HIF s'expressen més en càncer que en teixit normal (VEGF i gens implicats en metabolisme) i altres són isoformes associades a fenotip cancerígen (de transportadors de glucosa o enzims glicolítics, per exemple); com que

la hipòxia és una característica comú dels tumors sòlids, s'ha proposat que l'activació d'HIF podria ser, en part, la responsable del model d'expressió gènica associat a tumors [245].

Tot i que, en general, la sobreexpressió d'HIF-1 α promou l'activació de rutes que ajuden al tumor a adaptar-se a l'ambient hipòxic (vies de supervivència, antiapoptòtiques), contribuint a l'avantatge selectiu que donen les mutacions [53,318], HIF-1, i la hipòxia globalment, poden també exercir activitats proapoptòtiques o de parada del cicle cel·lular [191,319], amb efectes negatius sobre el creixement tumoral (Figura16). Els efectes finals sobre la progressió tumoral, l'equilibri entre els factors pro- i antiapoptòtics, i els gens diana activats, dependran del tipus de càncer (tipus cel·lular, tipus de teixit i microambient del tumor), de la presència o absència d'altres alteracions genètiques (context cel·lular) [320], i de la severitat de l'estrés hipòxic, així com de la quantitat de factor HIF present (en general, nivells elevats activen l'apoptosi, i nivells baixos promouen la supervivència). La selecció clonal en el tumor tendeix a seleccionar aquelles cèl·lules amb mutacions que afavoreixen les capacitats antiapoptòtiques d'HIF; l'apoptosi dependent d'hipòxia sol donar-se quan la falta d'oxigen és molt prolongada o la hipòxia és molt severa, propera a l'anòxia.

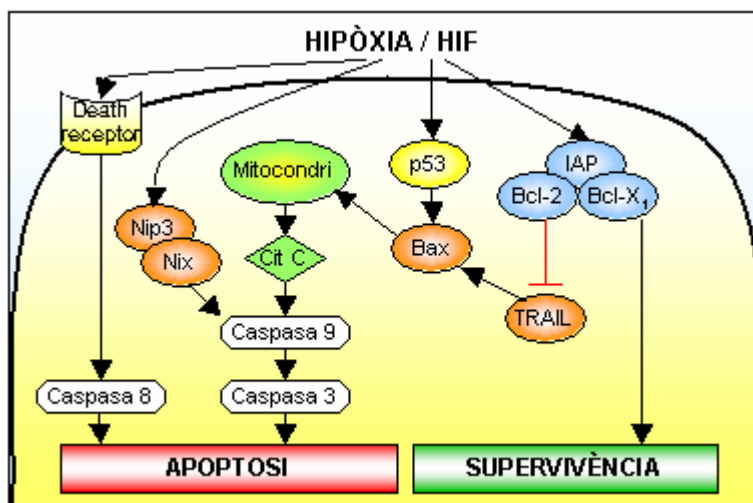


Figura 16. Efectes pro- i antiapoptòtics de la hipòxia i HIF.

(Cit C = Citocrom C; TRAIL = TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; IAP = Inhibitor of Apoptosis).

1.5.1. Aproximacions terapèutiques

La presència de cèl·lules hipòxiques en els tumors sòlids és també un problema per al tractament i evolució dels tumors, ja que són més resistents a radioteràpia i a molts agents quimioterapèutics convencionals que les cèl·lules tumorals normòxiques [321]. La baixa funcionalitat dels vasos sanguinis dificulta l'arribada de la medicació a les cèl·lules diana; les cèl·lules hipòxiques tenen radioresistència intrínseca i requereixen dosis de radiació majors per a obtenir els mateixos efectes biològics que les cèl·lules normòxiques, ja que el dany provocat pels radicals lliures generats per la radiació ionitzant sobre el DNA és major en presència d'oxigen i l'activació d'HIF-1 promou la secreció de citoquines amb efecte protector contra l'apoptosi [322]; com que també són cèl·lules menys proliferatives, els fàrmacs depenents de cicle cel·lular són més ineficaços; també s'ha de tenir en compte la resistència a apoptosi promoguda per hipòxia i HIF-1, així com la resistència adquirida a fàrmacs promoguda per l'elevada mutabilitat [323,324]. De fet, s'ha demostrat que els tumors hipòxics (i els que sobreexpressen HIF-1 α o HIF-2 α) estan associats a tractaments amb poc resultat i que hi ha una correlació amb una menor supervivència [325,326]. En alguns casos s'ha observat el contrari [316], però això és infreqüent i podria ser depenent del tipus cel·lular.

Considerant aquestes dades, es pot inferir el potencial que la inhibició d'HIF (o l'eliminació de les cèl·lules hipòxiques en general) té com a tractament anticancerígen eficaç. Aquesta aproximació, però, utilitzada com a monoteràpia, no erradica la malaltia, perquè els tumors poden créixer de manera independent d'HIF, obtenint nutrients de les cèl·lules adjacents. És per això que la millor opció és la teràpia combinada; per exemple, l'eliminació o sensibilització de les cèl·lules hipòxiques junt amb un tractament convencional amb quimioterapèutics o radiació [327]. També és una bona estratègia en el cas que s'utilitzin agents antiangiogènics, ja que la inhibició del subministrament sanguini al tumor podria seleccionar les cèl·lules tumorals capaces d'adaptar-se a un ambient hipòxic [328]. Es poden imaginar també els efectes

positius que tindria l'oxigenació tumoral sobre la millora de la sensibilitat al tractament per radiació. S'han fet aproximacions per administració d'eritropoietina i per respiració augmentada d'oxigen, però no s'han obtingut molt bons resultats. Els efectes positius es limiten a càncers de bufeta i de cap i coll per combinació de carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) amb radioteràpia (ARCON) [329].

Els tractaments dirigits específicament contra els tumors hipòxics (revisat per Brown i Wilson [330]) poden ser compostos biorreductius (actius només en un ambient sense oxigen), la teràpia gènica, o els inhibidors específics d'HIF-1 α (inhibidors directes del factor de transcripció o dels elements de la ruta de senyalització que porta a la seva estabilització i transactivació). Els càncers més apropiats per a rebre aquest darrer tipus de tractament són aquells on un alt nivell de sobreexpressió d'HIF-1 α o la presència d'hipòxia correlacionen amb una baixa eficàcia de tractament, amb una alta mortalitat o amb el desenvolupament de la malaltia.

a) Compostos biorreductius.

Són compostos inicialment inactius que són reduïts, preferencialment en absència d'oxigen, a una forma tòxica.

La metabolització de la Tirapazamina (TPZ) produeix un radical lliure que permaneceix actiu només en cèl·lules hipòxiques, provocant danys en biomolècules com el DNA; en cèl·lules normòxiques aquest radical és metabolitzat i eliminat i per tant no s'observa cap activitat. La TPZ és molt efectiva en combinació amb radioteràpia [331], reduint fins i tot la metastatització [332], i s'ha provat en assajos clínics en combinació amb quimioteràpia [333], ja que potencia els seus efectes antitumorals [334]. S'ha aconseguit una millora en la supervivència, tot i que la seva toxicitat és elevada. Actualment hi ha assajos en fase clínica II en combinació amb el quimioterapèutic cisplatin [335].

AQ4N (Novacea) s'activa en un ambient hipòxic i actua com a inhibidor de la topoisomerasa II [336]. Dades preclíniques han mostrat activitat antitumoral com a monoteràpia, i una millora dels efectes de la radiació i quimioteràpia quan s'administra

com a teràpia combinada [337]. Actualment es troba en fase clínica I i II en dos estudis diferents [338].

Una altra alternativa és la utilització de pro-fàrmacs activables per radiació en hipòxia [339]. A més de l'especificitat d'acció del fàrmac sobre la regió hipòxica, la radiació permet focalitzar el tractament i restringir-lo només a la zona tumoral. De moment, però, no s'ha trobat cap compost efectiu en la reducció de tumors.

b) Teràpia gènica.

La supressió de l'expressió d'HIF-1 α mitjançant knock down amb un DNA antisentit redueix la supervivència de cèl·lules de glioblastoma i augmenta la citotoxicitat dels agents quimioterapèutics [340]. Igualment, inhibeix la progressió de limfomes en ratolí i potencia l'activitat de la immunoteràpia [341]. La inhibició d'HIF-1 també es pot aconseguir amb vectors expressant RNAs d'interferència (siRNA) contra HIF-1 α ; amb aquesta aproximació s'ha aconseguit inhibició del creixement tumoral [342].

Tot i això, el pas limitant en aquest tipus de tractaments és el direccionament de les construccions gèniques cap a la zona tumoral hipòxica. Una aproximació amb elevada especificitat és la utilització de promotors de tipus HRE, amb els que es pot dirigir l'expressió de proteïnes amb finalitats citotòxiques exclusivament a la zona a tractar (Figura 17). Per exemple, l'expressió de Caspasa-3 només en zones hipòxiques ha mostrat reducció de la mida tumoral en ratolins sense causar efectes secundaris evidents [343]. L'enzim citosina deaminasa, capaç de convertir la 5-fluorocitosina (5-FC) en un agent citotòxic, també es pot utilitzar amb aquesta finalitat [344]. A més, es pot produir la difusió del fàrmac activat cap a les cèl·lules tumorals adjacents, augmentant l'eficàcia del tractament encara que hi hagi una baixa proporció de cèl·lules transfectades. La radioteràpia, alternativament, també es pot utilitzar com a element activant de l'expressió del gen introduït.

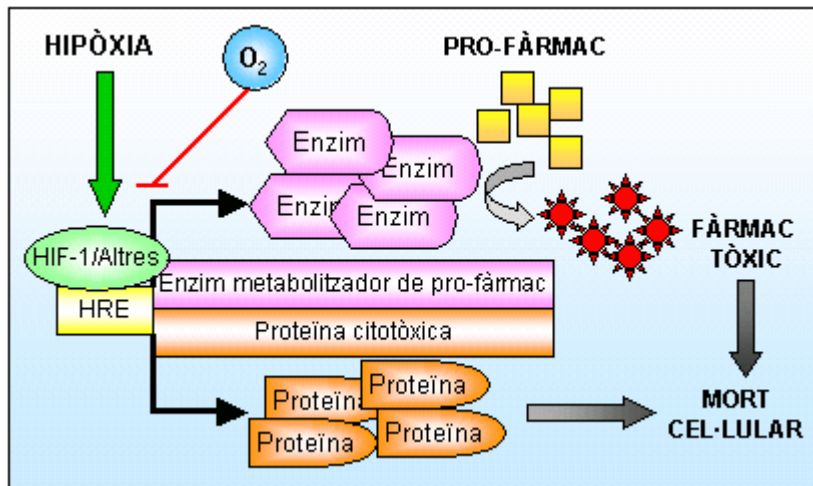


Figura 17. L'ambient hipòxic dels tumors sòlids es podria aprofitar en teràpia gènica per a expressar de manera localitzada enzims capaços de transformar un pro-fàrmac en un fàrmac actiu o per a introduir proteïnes amb activitat citotòxica només en les regions tumorals hipòxiques.

En l'eficaç distribució del tractament també intervé el vehicle utilitzat. Una possibilitat són els adenovirus [345], però la hipòxia redueix la seva taxa de replicació [346]; l'eficàcia augmenta amb l'ús de virus no replicatius en lloc de virus oncolítics^j [347]; els herpes simplex modificats amb promotors activables per hipòxia han donat també bons resultats [348]. La utilització de *Clostridium* o *Bifidobacterium longum* s'ha mostrat igualment eficaç. Aquestes soques bacterianes, que es poden transformar amb la construcció gènica terapèutica, són injectades en forma d'espores, i germinen i proliferen només en un ambient hipòxic; per tant queden localitzades en les zones tumorals a tractar [349,350]. Els macròfags, que solen infiltrar-se en tumors sòlids, i predominen en àrees d'hipòxia i necrosi, també han estat utilitzats com a vehicles [349].

c) Inhibició de l'activació d'HIF-1.

La majoria de les proteïnes participants en la ruta de senyalització d'HIF-1 són possibles dianes terapèutiques. Dos productes d'aquest grup ja han entrat en fase clínica I: el Topotecan [351] anàleg de la camptotecina i inhibidor de la topoisomerasa, té també efectes inhibidors sobre l'activitat HIF-1, i major activitat antitumoral en

^j La capacitat de propagació dels virus oncolítics depèn de la seva replicació dins la cèl·lula tumoral.

absència d'oxigen [352]; només es provarà en pacients amb nivells alts d'HIF-1 α . També el PX-478 (ProIX Pharmaceuticals) [353], que en assajos amb ratolins ha mostrat un efecte antitumoral potent en aquells casos on hi havia expressió elevada d'HIF-1, entrarà en fase clínica.

Els agents terapèutics poden inhibir l'estabilització de la subunitat α : els NSAIDs (Non-Steroideal Anti-Inflammatory Drugs) impedeixen el creixement de tumors de colon augmentant l'expressió de pVHL, i per tant la degradació d'HIF-1 α [354]. Els antagonistes d'hsp90 (geldanamicina, radicicol, 17-AAG) tenen activitat antiangiogènica *in vivo* [355], i són sensibilitzadors de cèl·lules hipòxiques, ja que promouen la degradació de la proteïna; cal remarcar, però, que aquest efecte només es dona a dosis altes del fàrmac, i que dosis menors tenen l'efecte contrari [356]. La sobreexpressió de PHD inactiva HIF-1 i inhibeix el creixement tumoral en ratolins [357]. Per tant, l'activació de PHDs, amb ciclosporina o l'inhibidor de diacilglicerol quinasa R59949, per exemple [358,359], podria ser una estratègia terapèutica per a inhibir el creixement tumoral i l'angiogènesi.

Alternativament, es pot actuar sobre l'activitat transcripcional d'HIF-1: els inhibidors d'HDACs supprimeixen l'angiogènesi induïda per hipòxia per inactivació d'HIF-1 [360] i per estimulació de supressors de tumors com p53 o pVHL [361]. El bloqueig de la interacció d'HIF-1 amb p300/CBP atenua l'expressió gènica depenent d'hipòxia i disminueix el creixement tumoral en ratolins; els inhibidors de la tioredoxina (disulfur de 1-metilpropil 2-imidazolil i pleurotin), per exemple, supprimeixen l'activitat HIF-1 i això contribuiria a la seva acció antitumoral i inhibidora del creixement [362]. Els inhibidors de PI3K (trastuzumab/herceptin [363]) i de MAPK (GL331 [364]) també tenen activitat antitumoral relacionada amb la inactivació d'HIF-1.

Altres compostos també inhibeixen HIF-1, tot i que es desconeix el mecanisme exacte. És el cas de fàrmacs amb efectes antitumorals ja descrits, com el 2-metoxiestradiol, que es troba en fase clínica I i II [365,366] o el trans-3,4,5'-trihidroxiestibè [367]; d'YC-1, que inhibeix l'activitat HIF-1 *in vitro* i bloqueja

l'angiogènesi i el creixement tumoral en ratolins [368]; o de l'anticòs monoclonal cetuximab, que ja s'utilitza per al tractament de càncer de colon [369].

Es desconeixen els efectes secundaris de la inhibició d'HIF-1 en humans. El to vascular i l'agregació de plaquetes podrien quedar alterats, i com que l'eritropoietina és un gen diana d'HIF-1, la seva inhibició prolongada podria provocar la deprivació d'oxigen en teixits normals. Les cèl·lules de la medul·la òssia també serien vulnerables, perquè solen estar exposades a baixos nivells d'oxigen i per tant podrien expressar HIF-1 en condicions fisiològiques. De totes formes, la situació en la majoria de teixits és de normòxia, i per tant els efectes secundaris haurien de ser mínims, ja que HIF-1 es troba inactivat. Tot i això, es desconeix si HIF-1 té alguna funció independent d'hipòxia en teixits normals.

Tot i que fins ara només s'ha contemplat la inhibició d'HIF com a teràpia antitumoral, cal tenir en compte la seva activitat proapoptòtica, que en alguns casos pot predominar sobre les seves propietats antitumorals [319]. En aquests casos, la inhibició d'HIF-1 seria més perjudicial que beneficiosa per a l'erradicació d'un tumor.

Altres dades mostren que la inhibició d'HIF-1 α té més efectivitat antitumoral en els estats inicials del desenvolupament de la malaltia, ja que en aquests moments s'estableix la hipòxia i s'activa la resposta dependent d'HIF-1. En estadis més avançats, l'efectivitat disminueix [370].

Una altra qüestió és la presència d'HIF-2, que és responsable del creixement d'alguns tipus de carcinomes en substitució de o en combinació amb HIF-1 [371], i fins i tot pot promoure el creixement tumoral amb major efectivitat que el seu homòleg [372]; en aquests casos, el bloqueig d'HIF-1 no tindria cap efecte sobre el tumor. Així mateix s'han de tenir en compte dades recents, que mostren una possible activitat supressora de tumors per a HIF-2 α [373]. Segons aquest estudi, la sobreexpressió d'HIF-2 α en gliomes de rata provoca un augment de l'angiogènesi (en concordància amb l'activitat proangiogènica dels HIFs), però a la vegada una reducció del volum tumoral, per activació de l'apoptosi. Aquesta és una dada a tenir en compte, ja que el

bloqueig d'HIF-2 α en tumors podria fer que sobrevisquessin clons individuals menys dependents del subministrament sanguini, i que desenvolupessin una resistència a l'apoptosi induïda per estrés, que promouria el creixement tumoral. La mateixa situació es podria donar amb HIF-1, ja que, com s'ha dit, regula rutes de senyalització proapoptòtiques, i no sempre actua com a promotor del desenvolupament tumoral. Per tant, caldria determinar la importància real d'HIF-1 per a un tumor abans d'aplicar un tractament contra aquesta ruta de senyalització, ja que la càrrega genètica pot decidir l'èxit o el fracàs de la teràpia [374].

