

**Departamento de Investigación de Enfermedades Crónico Degenerativas**

Laboratorio de Oncología Biomédica

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco**

Sistemas biológicos

Lic. Química Farmacéutica Biológica

**EFFECTOS DE LA QUIMIOTERAPIA EN LA EXPRESIÓN DE HIFs EN  
CONDICIONES DE HIPOXIA.**

**Reporte de Servicio Social**

Tutor interno: Julia Pérez Ramos

Tutor externo: Georgina Gonzalez Avila

Alumno: Marcos Rojas Martinez

Matricula: 2182044151

Periodo de SS: 05 de septiembre de 2022 al 08 de marzo del 2023

**Resumen**

El crecimiento desmedido de las células cancerígenas provoca la reducción de los nutrientes y de las concentraciones de oxígeno dentro del nicho tumoral. Como consecuencia se activan diferentes vías de señalización y así se promueve la expresión de factores inducidos por hipoxia (HIFs). En el presente trabajo se ha evaluado, la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ , en condiciones de hipoxia y normoxia a diferentes tiempos en células de adenocarcinoma pulmonar A427. Se cultivaron células A427 en condiciones de normoxia (5% CO<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) por 6, 12, 24 y 48 horas. Se extrajeron proteínas nucleares, y por Western blot y análisis densitométricos, se determinó la expresión proteica de los tres diferentes HIFs. Se observó que en condiciones de hipoxia HIF1 $\alpha$  incrementó su expresión a las 6 horas ( $p = 0.004$ ), y a 24 horas ( $p = 0.001$ ), y disminuyó a las 48 horas. La expresión de HIF2 $\alpha$  disminuyó en condiciones de hipoxia a las 6 horas ( $p = 0.001$ ) y aumentó a las 24 horas ( $p = 0.001$ ). La expresión de HIF3 $\alpha$  fue mayor en condiciones de hipoxia a las 6 horas ( $p = 0.001$ ) y a las 24 horas ( $p = 0.002$ ). Se logró determinar que existe mayor expresión de estos factores en condiciones de hipoxia a diferencia de las condiciones de normoxia en función del tiempo.

**Abstract**

The excessive growth of cancer cells causes the reduction of nutrients and oxygen concentrations inside the tumor niche. As a consequence, different signaling pathways are activated inducing the expression of hypoxia-induced factors (HIFs). In the present study, the expression of HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and HIF3 $\alpha$  has been evaluated under hypoxia and normoxia conditions at different times in A427 lung adenocarcinoma cells. A427 cells were cultured under normoxia (5% CO<sub>2</sub>) and

hypoxia (1%O<sub>2</sub>) conditions for 6, 12, 24 and 48 hours. Nuclear proteins were extracted, and Western blot and densitometric analysis were carried out to determine the protein expression of the three different HIFs. Under hypoxic conditions, HIF1 $\alpha$  expression increased at 6 hours ( $p = 0.004$ ), and 24 hours ( $p = 0.001$ ), and it decreased at 48 hours. HIF2 $\alpha$  expression decreased under hypoxic conditions at 6 hours ( $p = 0.001$ ) and increased at 24 hours ( $p = 0.001$ ). HIF3 $\alpha$  expression was higher under hypoxic conditions at 6 hours ( $p = 0.001$ ) and at 24 hours ( $p = 0.002$ ). It was possible to determine that there is a major expression of these factors in hypoxia than normoxia conditions as a function of time.

**Palabras clave:** Adenocarcinoma, Cáncer pulmonar, HIFs, Hipoxia, Normoxia.

### Introducción

El cáncer está asociado con daños en el ADN de células causado por distintos factores, resulta con la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo. El mecanismo de propagación del cáncer se denomina “metástasis” y es la causa principal de muerte por cáncer (4).

En 2020 se registraron 1,086,743 defunciones en México, de los cuales 8% (90,603) se debieron a tumores malignos (1). La tasa de defunciones aumentó de 6.18 a 7.17 por cada 10 mil personas en 10 años (Figura1).

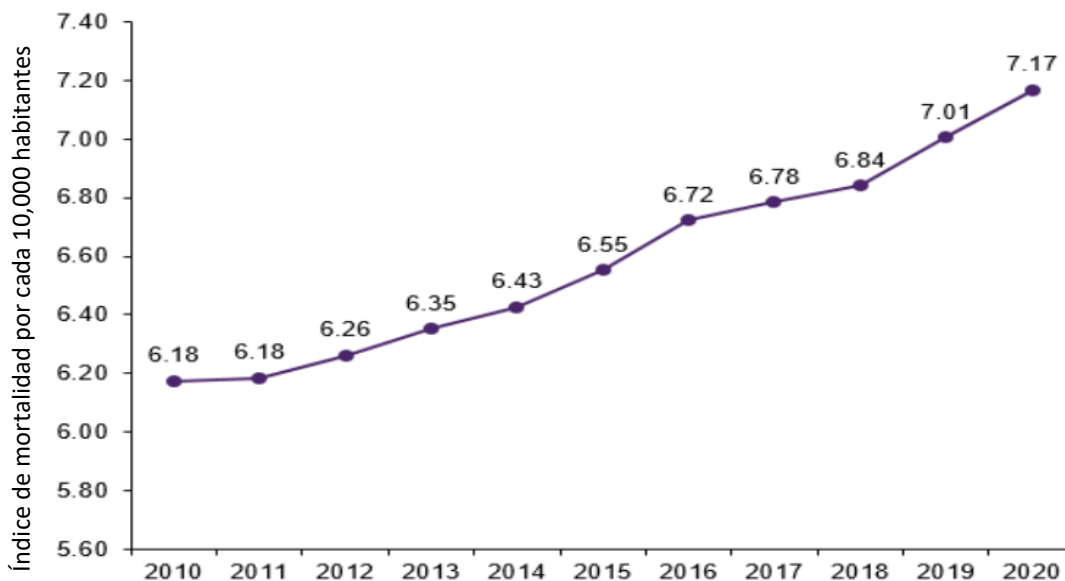


Figura 1. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro (Defunciones por cada 10 mil habitantes para cada año de registro), se logra ver un aumento gradual con el paso de los años.

Tabla 1. Numero estimado de casos incidentes y muertes México, ambos sexos, todas las edades.

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Mama	29 929	7 931
cuello uterino	9 439	4 335
Colon	11 191	6 245
Leucemia	6 955	4 786
Hígado	7 536	7 175
Pulmón	7 588	7 100
No linfoma de Hodgkin	6 840	3 071
Próstata	26 742	7 457
Estómago	8 804	6 735
Tiroides	11 227	956

Con base a las estadísticas del INEGI (Figura 1) y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (Tabla 1), se puede hacer una comparación de la tasa de defunciones que va de 4.79 a 5.7 respectivamente solo en México.

Las tasas de supervivencia a cinco años para el cáncer de pulmón siguen siendo muy bajas (<15%) en los casos de etapa tardía lo que representa un problema de salud pública muy grande no solo en México sino en todo el mundo (5).

### Cadena metastásica

La metástasis inicia cuando las células cancerosas genéticamente inestables aumentan su proliferación cambiando las características metabólicas del microambiente del tumor primario (4). Esto obliga a las células adaptarse a ese nuevo microambiente para después desprenderse del tumor primario y migrar a otros órganos, el mecanismo inicia con el agotamiento de los nutrientes y el oxígeno, en estas condiciones se induce la acción de varios factores que favorecen la formación de vasos sanguíneos (disfuncionales), mediante estos vasos sanguíneos el tumor pasa a circulación en un proceso llamado intravasación, posteriormente dentro del sistema circulatorio puede ser extravasado a otro órgano y poder iniciar de nuevo el proceso de crecimiento y proliferación tumoral (6).

### Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés) es un ambiente heterogéneo, surge con un conglomerado de células tumorales, el flujo sanguíneo es variable a través de vasos sanguíneos inmaduros con fugas que dan como resultado regiones de acidosis e hipoxia (9). Los elementos estructural y funcional en el estroma de un microambiente tumoral son; fibroblastos miofibroblastos, células neuroendocrinas, adiposas, inmunitarias e inflamatorias, las redes vasculares sanguíneas y linfáticas y la matriz extracelular (MEC), dentro del microambiente se dan procesos de angiogénesis y linfangiogénesis de aquí la importancia de la TME en la etapa premetastásico del tumor primario (10).

Dentro del microambiente tumoral existe una fragmentación en la respuesta inmunológica por parte de las células T, células B, células NK y macrófagos, neutrófilos entre otros, es decir que por un lado una respuesta inmunitaria activo dentro del microambiente es buena señal ya que se esperarí que con ayuda de estas células se puede detener la proliferación tumoral, sin embargo, no siempre es así ya que secretan IL-2 para regular la función de células NK. (15)

La hipoxia es un fenómeno común en las neoplasias sólidas. Surge cuando las demandas de oxígeno de los tejidos exceden los suministros de oxígeno debido a la formación anómala de vasos sanguíneos, las fluctuaciones en el flujo sanguíneo y el aumento de las demandas de oxígeno por la rápida expansión del tumor (9). Además, en condiciones de hipoxia se promueve la formación de una matriz rica en fibronectina, aumenta la lisil oxidasa (LOX), que modifica covalentemente los colágenos para aumentar la actividad de la cinasa de adhesión focal, migración celular y la metástasis (7).

El factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ) juega un papel clave en la progresión del tumor bajo hipoxia. HIF1 $\alpha$  es un factor de transcripción heterodimérico básico hélice-bucle, consta de una subunidad alfa y una subunidad beta, HIF1 $\beta$ . En condiciones de normoxia, HIF1 $\alpha$  se une a la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (VHL). Este complejo proteico hace que HIF-1 $\alpha$  sea el objetivo de ubiquitinación, lo que conduce a una degradación proteosomal. Pero en condiciones de hipoxia, no hay hidroxilación así que HIF1 $\alpha$  no se degrada, se une con HIF1 $\beta$  y al complejo CBP/p300, para entrar al núcleo y transactivar diversas expresiones génicas (Figura 2).

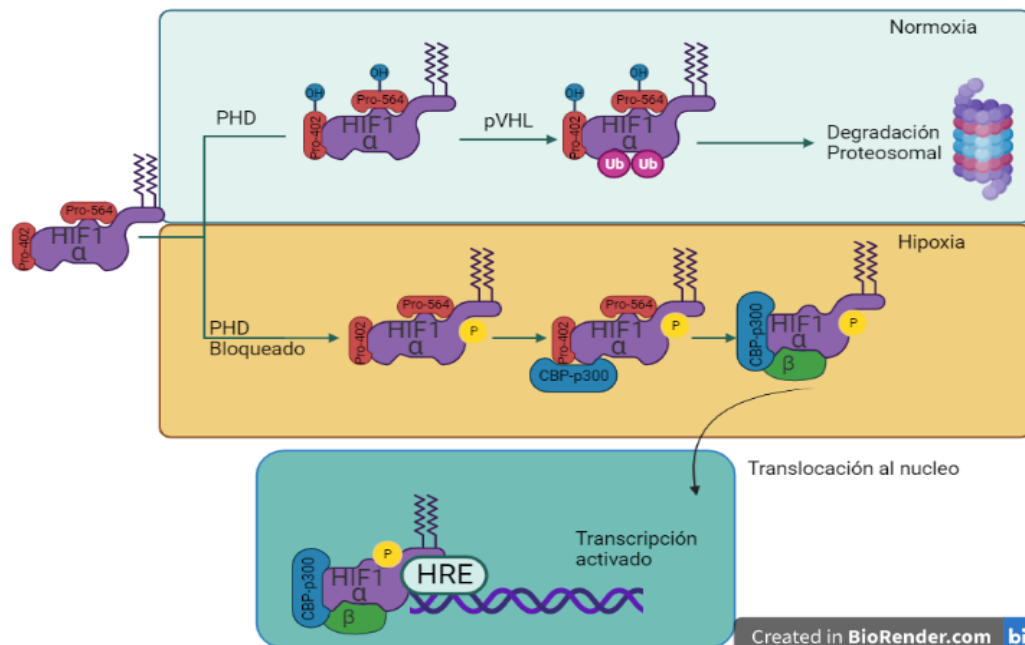


Figura 2. Mecanismos de activación y degradación de HIF1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia y normoxia.

Se han identificados dos homólogos de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ , los dos primeros son muy similares, son regulados por hidroxilación dependiente de oxígeno, pero difieren en sus dominios de transactivación. Por otro lado, HIF3 $\alpha$  carece del dominio de transactivación y puede funcionar como un inhibidor de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , en cuanto a expresión HIF1 $\alpha$  es expresado en un 69% en metástasis, comparado con tumores primarios de un 29%, HIF2 $\alpha$  es sobreexpresado en pacientes con carcinoma renal, cáncer de pulmón de células no pequeñas de cáncer pulmonar (6, 8).

HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  funcionan como moduladores de la respuesta transcripcional a la hipoxia, por otro lado, HIF3 $\alpha$  tiene diferentes variantes debido a diferentes promotores, estudios sugieren que estas variantes tienen funciones diferentes e incluso opuestas. La hipoxia aumenta los niveles de HIF3 $\alpha$  y es de interés ya que hay variantes que compiten con HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  por unirse al HIF1 $\beta$  dando un efecto de inhibición (12).

### **HIFs en la progresión del cáncer**

La Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) es un proceso biológico en el que las células epiteliales polarizadas que normalmente interactúan con su membrana basal pierden su organización y las uniones intracelulares, reprograman la expresión génica y desarrollan cambios bioquímicos, reorganización citoesqueleto, lo que lleva a una capacidad migratoria aumentada, resistencia a la apoptosis y producción elevada de componentes de matriz extracelular (11). La E-cadherina es el componente principal de las uniones adherentes de epitelio y confiere polaridad. La pérdida de E-cadherina es clave para EMT, y en condiciones de hipoxia se induce EMT dependiente de HIF como regulador de los represores de transcripción de E-cadherina como SNAIL, TWIST1, TCF3, ZEB1 y ZEB2 (6).

Estudios demuestran que la alteración de la membrana basal es promovida por la regulación de la catepsina D (CTSD) dependiente de HIF1 $\alpha$ . En estado de hipoxia también se expresa el factor de motilidad autocrina (AMF) que es otra citoquina secretada por tumores inducida por HIF1 $\alpha$  y VEGF bajo hipoxia para mejorar la proliferación, migración y angiogénesis a través de mecanismos autocrinos o paracrinos (6). HIF1 $\alpha$  aumenta la expresión del microARN miR-372/373, que se dirige a la proteína inhibidora de MMPs, RECK para promover la intravasación (6).

### **Hipótesis**

Los factores (HIF1, HIF2 y HIF3) se expresarán en mayor medida en condiciones de hipoxia, a su vez disminuirá después del tratamiento con carboplatino.

### **Objetivos**

- Identificar de HIFs en extracto de núcleos de células neoplásicas (A427, adenocarcinoma pulmonar) en condiciones de normoxia e hipoxia (O<sub>2</sub> al 1%) a 6, 12, 24, y 48 horas.

- Inhibir de la expresión de HIFs en normoxia e hipoxia por carboplatino que es un agente citotóxico que se utiliza en la quimioterapia y YCI (inhibidor específico de la expresión de HIFs).

### Metodología experimental

El desarrollo experimental se puede apreciar en la figura 2.

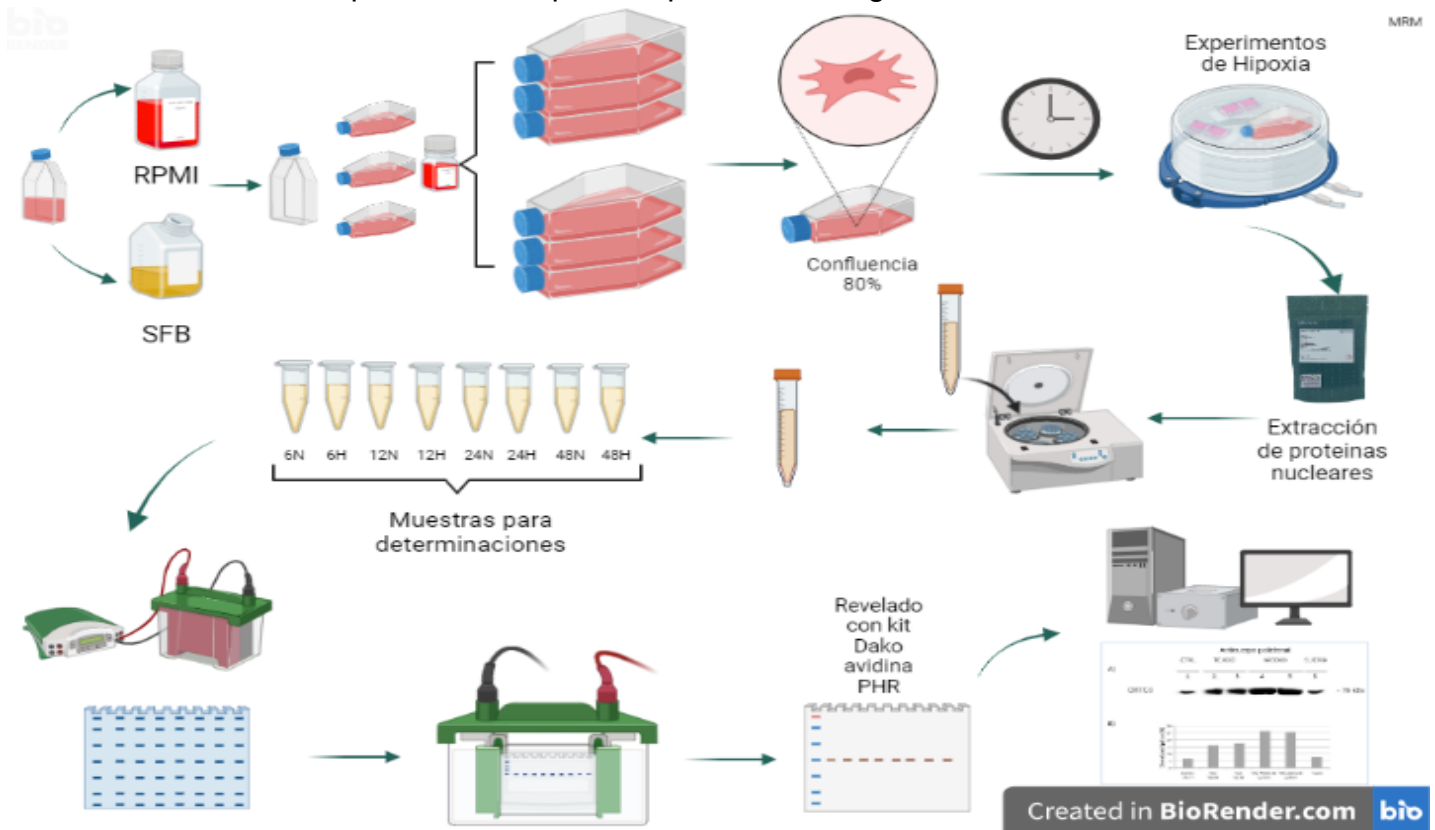


Figura 3. Metodología general esquemática del proceso experimental desde la preparación del medio de cultivo hasta el análisis estadístico.

### Cultivo celular

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular A 427, (adenocarcinoma pulmonar) de la American Type Culture Collection (ATCC). Las condiciones fueron en medio RPMI con antibiótico/antimicótico y con 10% de suero fetal bovino (SFB), suplementado con aminoácidos no esenciales, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> alcanzando una confluencia del 80%.

### Experimentos de hipoxia

Se realizó expansión a 6 cajas que ya tenían una confluencia del 80% a 24 cajas, 12 para tiempos cortos (6h, 12h) y 12 para tiempos largos (24h, 48h). Se consiguió una confluencia del 80%, posteriormente se les cambió el medio por RPMI sin suero,

después se etiquetaron de acuerdo a las condiciones en las que fueron sometidas. Las cajas se colocaron en la incubadora de CO<sub>2</sub> para las condiciones de normoxia y para las condiciones de hipoxia se colocaron dentro de las cámaras de hipoxia (1%O<sub>2</sub>) perfectamente sellados, posteriormente se incubaron a los tiempos correspondientes (6, 12, 24 y 48 horas).

### **Extracción de proteínas nucleares**

Una vez terminada los experimentos a diferentes tiempos en condiciones de hipoxia y normoxia se extrajo el medio y las células se despegaron con Dulbecco's phosphate Buffered Saline (sin CaCl y sin MgCl), posteriormente se colocaron en tubos de 15 mL, se centrifugaron a 14000rpm para obtener el pellet celular, posteriormente se retiró el PBS y se llevó a cabo la extracción de proteínas nucleares de acuerdo al manual ab113474-Nuclear Extraction Kit (Abcam, Cambridge MA, USA). Se obtuvieron las proteínas nucleares correspondientes a los diferentes tiempos y se utilizaron para hacer la determinación de proteínas de los extractos nucleares con el método del ácido bicinónico, (Pierce Chemical Co, Rockford, Ill, EE. UU.).

### **Electroforesis y Western blot**

Para la electroforesis se prepararon geles SDS-PAGE al 8%, se precorrieron a 45V por gel durante 30min, se tomaron 30µg de proteínas nucleares por cada muestra y se colocaron en tubos eppendorf, para la desnaturalización se les añadió solución desnaturalizante ( $\beta$  mercaptoetanol), buffer superior (SDS 10%, Tris 0.5M, pH 6.8), glicerol, agua dd en una relación 1:1 y se sometió a una temperatura alrededor de 95°C por 10 minutos, terminado el proceso de desnaturalización se procedió a cargar el volumen de muestra correspondiente a cada carril, se configuró la electroforesis a 90V por 2 horas con una fuente de poder de BIORAD. Para la transferencia de proteínas se utilizaron membranas de PVDF, se activaron con metanol, posteriormente se despegaron los geles resultantes de la electroforesis y colocaron en buffer de transferencia, finalmente se colocaron en orden los materiales para la transferencia y la fuente de poder se configuró a 100V por 2 horas.

Transcurridas las horas de transferencia, se procedió a bloquear las membranas con leche descremada en polvo al 2.5% en buffer TTBS (Tris-HCl 100 mM, Tween 20 al 0,1%, NaCl 150 mM, a pH 7.5) durante una hora, posteriormente se colocaron los anticuerpos primarios correspondientes a las proteínas a determinar en cada experimento por triplicado: anti-HIF1 $\alpha$  rabbit, 1:100 anticuerpo policlonal (Abcam), anti-HIF2 $\alpha$  mouse, 1:100 anticuerpo monoclonal (Abcam) y anti-HIF3 $\alpha$  rabbit, 1:100 anticuerpo policlonal (Novus Biologicals, Centennial, CO. USA.) como control del WB se usó anti-Histona3, 1:100 (Abcam). Cada anticuerpo primario se incubó por 90 minutos, después se hicieron tres lavados con TTBS en intervalos de 10 minutos,

después se añadió el anticuerpo secundario correspondiente a rabbit o mouse de VECTASTAIN Elite ABC kit, Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.), se dejó por 45 minutos, transcurrido el tiempo se realizaron los lavados para quitar el exceso de anticuerpo, 3 lavados con intervalos de 10 minutos, después se preparó el reactivo ABC (VECTASTAIN) y se dejó por 45 minutos, terminado el tiempo se lavó 3 veces por 10 minutos cada uno y finalmente se usó un método colorimétrico para el revelado con 1mL de diaminobenzidina y 2 gotas de cromógeno kit DAKO (Agilent Technologies Stevens Creek, Santa Clara, CA, EE. UU.), resultando un color marrón en las bandas correspondientes a la proteína en cuestión. Las bandas resultantes de cada experimento fueron detectadas mediante densitometría con ayuda del software de análisis de imágenes Kodak Digital Science ID, versión 2.0 (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.) que mide el área y la intensidad de las bandas. Los resultados obtenidos de cada lectura se expresaron en unidades densitometría (UD).

### **Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar correspondientes a cada lectura de la densitometría, para las comparaciones se usó la prueba U de Mann-Whitney para cada tiempo y condiciones de los experimentos. Se consideró que  $p \leq 0.05$  indicaba una diferencia estadísticamente significativa.

### **Resultados**

Como ya se mencionó anteriormente acerca del principal mecanismo de HIF1 $\alpha$ , es la translocación al núcleo y posteriormente mediante la unión con CBP/p300 induce la expresión de genes, así que es necesario extraer proteínas nucleares ya que es donde podemos encontrar con mayor concentración estos factores en función del tiempo de exposición de las células en condiciones de hipoxia.

Para verificar una óptima transferencia de proteínas, se realizó una electroforesis con las muestras obtenidas de los extractos nucleares, después de la transferencia se prosiguió a corroborar que no hubiera proteína sin transferir comparándola con el control. (Figura 4)

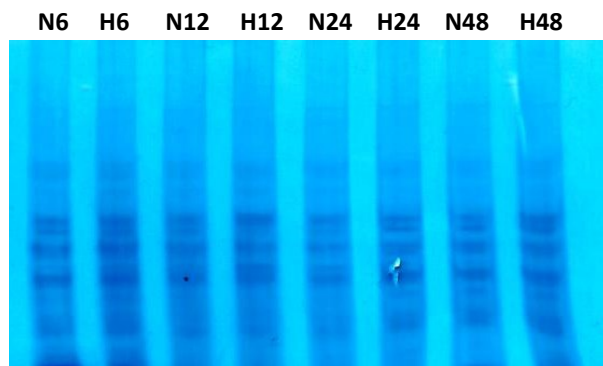


Figura 4. Se realizó una electroforesis como control para la transferencia de proteínas de cada HIF.



### Expresión de HIF1 $\alpha$ en condiciones de normoxia e hipoxia en células A427.

El Western blot mostró bandas de aproximadamente 120 kDa que corresponde a HIF1 $\alpha$  (Figura 5).

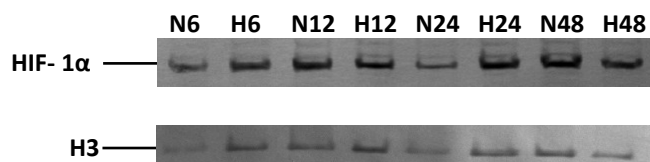


Figura 5. Western blot para HIF1 $\alpha$ . Esta técnica mostró bandas de un peso molecular de aproximadamente 120 kDa que se observaron en condiciones de normoxia (N) y en condiciones de hipoxia (H) a diferentes tiempos. Como control del Western blot se usó histona 3 (H3).

El análisis densimétrico mostró que la expresión más alta de esta molécula fue en condiciones de hipoxia a las 6 h ( $33912.7 \pm 2536.8$  U.D.), seguido por la expresión en las mismas condiciones a las 12 h ( $33288.9 \pm 358.2$  U.D.) sin que existan diferencias estadísticamente significativas (Figura 5). El análisis comparativo entre normoxia e hipoxia demostró que hay un aumento significativo en la expresión de HIF1 $\alpha$  a las 6 h ( $N6 = 22140.8 \pm 2075.4$  U.D.,  $H6 = 33913.7 \pm 2536.8$  U.D.;  $p = 0.004$ ), y a las 24 h ( $N24 = 19475.0 \pm 880.7$  U.D.,  $H24 = 1125.4$  U.D.;  $p = 0.001$ ). Posteriormente a las 48 h la expresión tiende a bajar en condiciones de hipoxia con una diferencia estadísticamente significativa ( $N48 = 24328.7 \pm 1199.1$  U.D.,  $H48 = 20022.5 \pm 842.0$  U.D.;  $p = 0.01$ ).

Por otro lado, hay un incremento significativo de la expresión de HIF1 $\alpha$  en condiciones de normoxia a 6 h y 12 h ( $N6 = 22140.8 \pm 2075.4$  U.D.,  $N12 = 30949.9 \pm 2381.7$  U.D.;  $p = 0.037$ ), después hay un descenso en la expresión a las 12 h hacia 24 h ( $N12 = 30949.9 \pm 2381.7$  U.D.,  $N24 = 19475 \pm 880.7$  U.D.;  $p = 0.001$ ). Finalmente hay un aumento significativo a las 24 h y 48 h ( $N24 = 19475 \pm 880.7$  U.D.,  $N48 = 20022.5 \pm 842$  U.D.;  $p = 0.01$ ).

En condiciones de hipoxia se logró determinar una disminución constante de 12 h a 24 h ( $H12 = 33288.9 \pm 358.2$  U.D.,  $H24 = 25096.8 \pm 1125.4$  U.D.;  $p = 0.003$ ). La expresión disminuyó aún más de 24 h a 48 h ( $H24 = 25096.8 \pm 1125.4$  U.D.,  $H48 = 20022.5 \pm 842$  U.D.;  $p = 0.01$ ) (Figura 5).

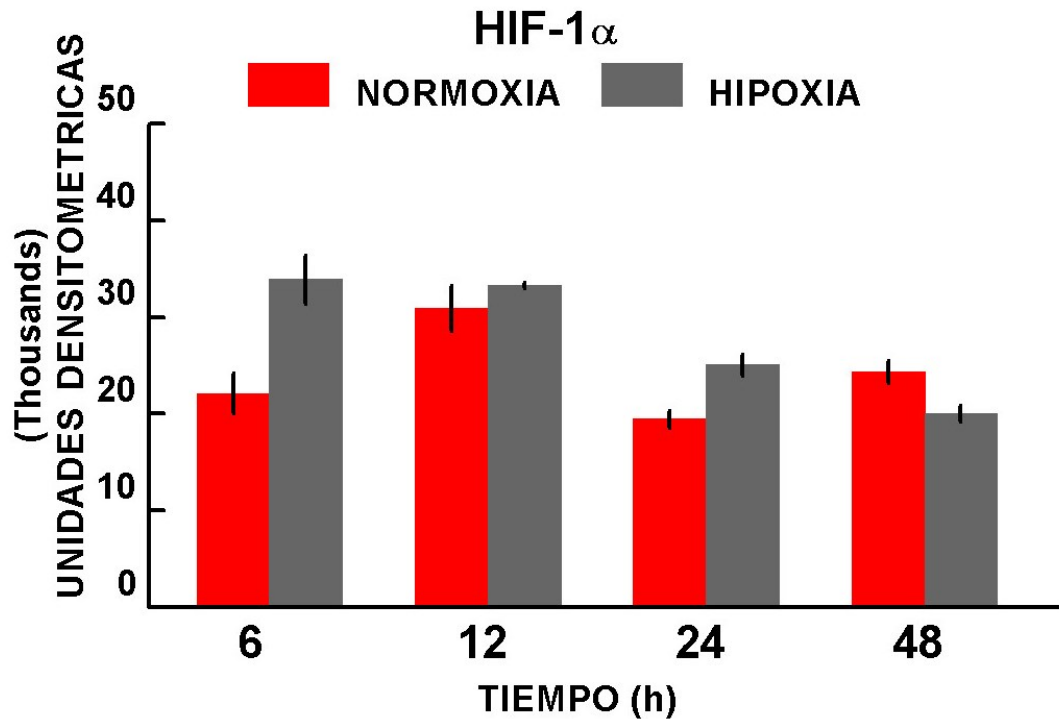


Figura 6. Expresión proteica de HIF1 $\alpha$ . La expresión de HIF1 $\alpha$  baja en condiciones de hipoxia mientras que en normoxia hay mayores fluctuaciones. Se observa una mayor expresión en condiciones de hipoxia a las 6 h y 24 h en comparación con normoxia. A las 48 h aumenta significativamente la expresión de HIF1 $\alpha$  en condiciones de normoxia.

### Expresión de HIF2 $\alpha$ en condiciones de normoxia e hipoxia en células A427.

El siguiente experimento con Western blot mostró bandas de aproximadamente 95 kDa que corresponden a HIF2 $\alpha$  (Figura 7).

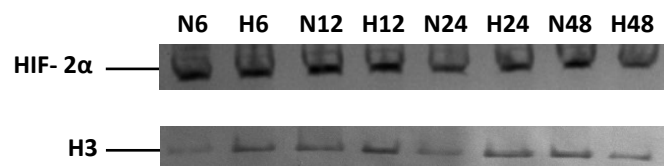


Figura 7. Inmunoblot de HIF2 $\alpha$ . El western blot reveló bandas de aproximadamente 95 kDa que corresponden a HIF2 $\alpha$  que se expresa de manera diferente en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H). Como control del Western blot se usó histona 3 (H3).

En el análisis desintométrico se observó que hubo una disminución en la expresión de HIF2 $\alpha$  estadísticamente significativa en condiciones de hipoxia en comparación con normoxia a las 6 h (N6 = 39239.3  $\pm$  2088.6 U.D., H6 = 17906.7  $\pm$  408.2 U.D.; p = 0.001) (Figura 7). Para las 12 h no hubo diferencias, pero a las 24 h aumentó significativamente la expresión de esta molécula en condiciones de hipoxia frente a normoxia (N24 = 17945.5  $\pm$  618 U.D. H24 = 22030.6  $\pm$  879.1 U.D. p = 0.001). A las 48 h no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones.

Por otro, la expresión en condiciones de normoxia tiende a la baja con el paso del tiempo, de 6 h a 12 h ( $N6 = 39239.3 \pm 2088.6$  U.D.,  $N12 = 28554.2 \pm 1114.7$  U.D.;  $p = 0.0001$ ), seguido de 12 h a 24 h ( $N12 = 28554.2 \pm 114.7$  U.D.  $p = 0.0001$ ), finalmente disminuye aún más de 24 h a 48 h ( $N24 = 17945.5 \pm 618$  U.D.,  $N48 = 13709.8 \pm 1724.6$  U.D.;  $p = 0.021$ ). Para las condiciones de hipoxia la expresión aumenta significativamente de 6 h a 12 h ( $H6 = 17906.7 \pm 408.2$  U.D.,  $H12 = 29332.1 \pm 1828.3$  U.D.;  $p = 0.001$ ), posteriormente hay una disminución significativa de 12 h y 24 h ( $H12 = 29332.1 \pm 1828.3$  U.D.,  $H24 = 22030.6 \pm 879.1$  U.D.;  $p = 0.01$ ), finalmente de 24 h a 48 h ( $H24 = 22030.6 \pm 879.1$  U.D.,  $H48 = 19235.7 \pm 1668.7$  U.D.) no hubo diferencias significativas en la expresión de este factor (Figura 8).

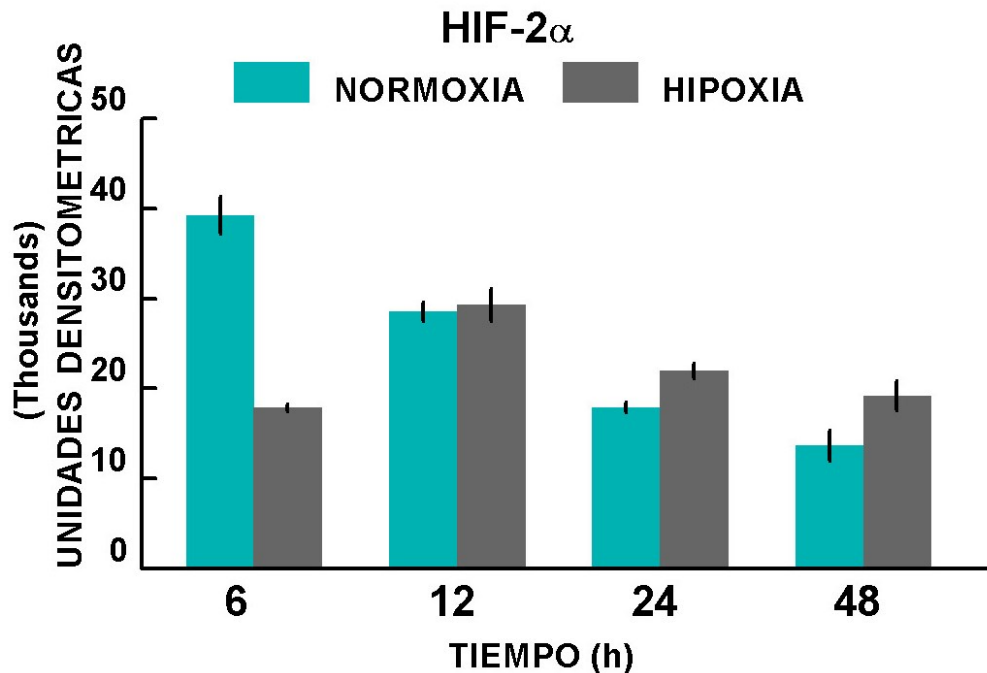


Figura 8. Expresión proteica de HIF2 $\alpha$ . De acuerdo al análisis densitométrico hay una mayor expresión en condiciones de normoxia a las 6 horas (N6) que en condiciones de hipoxia (H). A su vez este factor aumenta a las 24 h.

#### Expresión de HIF3 $\alpha$ en condiciones de normoxia e hipoxia en células A427.

El Western blot mostró bandas de alrededor de 75 kDa que corresponden a HIF3 $\alpha$  (Figura 8).

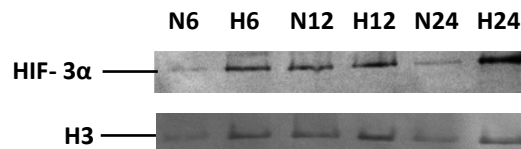


Figura 8. Western blot para HIF3 $\alpha$ . En el western blot se lograron observar bandas con mayor intensidad en condiciones de hipoxia. Como control del western blot se usó histona 3 (H3).

El análisis densitométrico demostró una mayor expresión de HIF3 $\alpha$  en condiciones de normoxia a las 12 h ( $18559.9 \pm 267.7$  U.D.) seguida en condiciones de hipoxia a las 12 h ( $17826.5 \pm 249.6$  U.D.) sin una diferencia significativa entre las mismas. Hubo un aumento significativo en la expresión de HIF3 $\alpha$  a las 6 h en hipoxia en comparación con normoxia (N6 =  $5695.1 \pm 573.1$  U.D., H6 =  $16449.5 \pm 543.2$  U.D.;  $p = 0.001$ ); el comportamiento fue similar a las 24 h (N24 =  $5011.8 \pm 341.9$  U.D., H24 =  $12270.4 \pm 226.9$  U.D.;  $p = 0.02$ ) (Figura 9). Finalmente, para las 48 h no se pudo realizar el experimento por falta de muestra y reactivo para la extracción de proteínas nucleares.

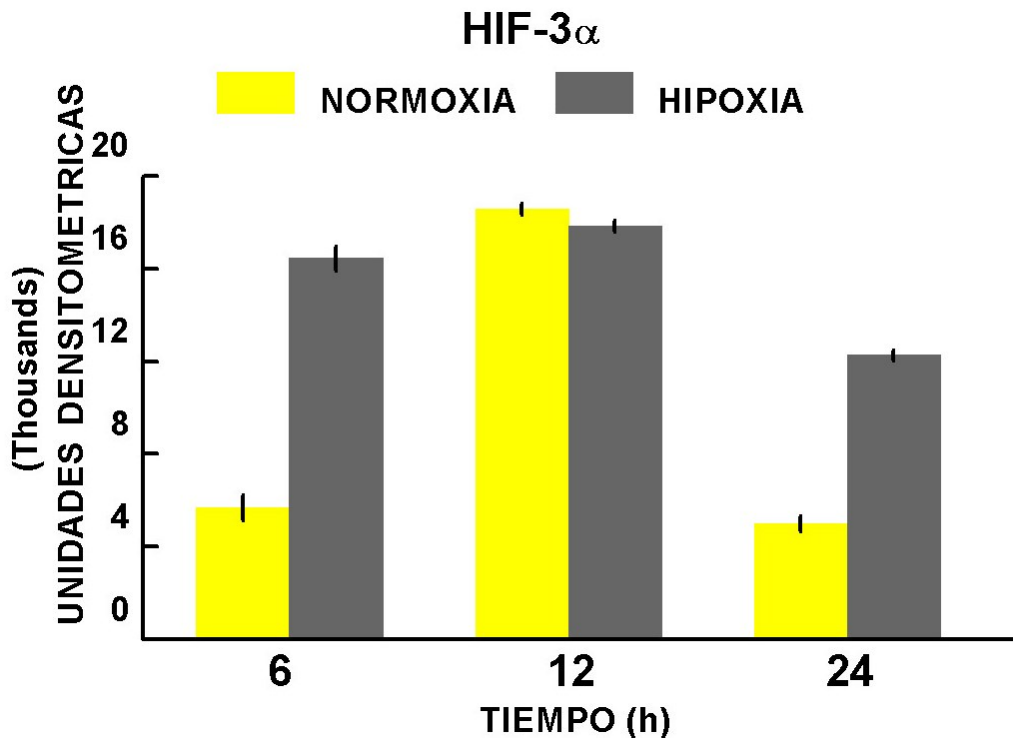


Figura 9. Expresión proteica de HIF3 $\alpha$ . De acuerdo al análisis densitométrico hay una mayor expresión de HIF3 $\alpha$  a las 24 y 48 horas en condiciones hipoxia.

### Discusión

Los Factores Inducidos por Hipoxia en sus tres isoformas conocidas hasta ahora, (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ ) son los principales mediadores de respuesta a las bajas concentraciones de oxígeno en las células, HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  presentan similitudes en su estructura y mecanismo, aunque existen diferencias en su función, ya que HIF1 $\alpha$  promueve la proliferación y migración en la angiogénesis temprana y regula VEGFR-1, y en el caso de HIF2 $\alpha$  está involucrado en la reestructuración vascular además de regular VEGFR-2 en células epiteliales (18, 22).

Para entender mejor los mecanismos de los HIFs se optó por usar una línea celular de adenocarcinoma (A427) debido a que se asemejan más a las que están presentes en los pacientes con cáncer pulmonar. Cabe mencionar que investigaciones anteriores no han evaluado el comportamiento en conjunto de estos tres factores en una misma línea celular y en condiciones llevadas a cabo como en este trabajo. La expresión de HIF1 $\alpha$  concuerda con trabajos ya antes reportados como en el trabajo de Sofía Mucci y colaboradores, en donde la hipoxia aumenta la expresión de HIF1 $\alpha$  en células madre pluripotentes lo que induce su apoptosis (23). Aunque otro estudio revela que la ausencia de HIF1 $\alpha$  en cáncer de páncreas aumenta la expresión de la subunidad reguladora 1 $\beta$  de la proteína fosfatasa 1 (PPP1R1B), que está implicado en la metástasis de adenocarcinoma ductal pancreático. Estos son ejemplos de que falta por conocer aún más acerca de los HIFs. En el presente trabajo se pudo determinar y cuantificar la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$  cumpliendo con el primer objetivo: Identificación de HIFs en extracto de núcleos de células neoplásicas (A427, adenocarcinoma pulmonar) en condiciones de normoxia e hipoxia (O<sub>2</sub> al 1%) a 6, 12, 24 y 48 horas.

El análisis densitométrico demostró que la expresión de HIF1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia a las 6 y 12 horas aumenta significativamente, pero disminuye en un estado crónico de 24 a 48 horas, con lo que intuimos puede actuar en mayor medida en un estado agudo en la formación de vasos sanguíneos para un desarrollo más rápido y agresivo del cáncer pulmonar. Otro estudio llevado a cabo por Uchida, Tokujiro y colaboradores, expusieron células A549 a 4 horas a diferentes concentraciones de oxígeno. Ellos obtuvieron proteínas de células completas y nucleares, y reportaron que efectivamente la hipoxia induce la expresión de estos factores, además resulta interesante ya que concluyen que a tiempos más prolongados HIF1 $\alpha$  disminuye su expresión (26).

A su vez en el presente estudio, HIF2 $\alpha$  tiene un comportamiento similar a HIF1 $\alpha$ , pero en condiciones de normoxia, es decir tiene una mayor expresión en normoxia a las 6 horas, posteriormente disminuye de manera constante a las 12, 24 y 48 horas; en cuanto a condiciones de hipoxia tiende a estabilizarse y a expresarse en un estado crónico. Esto es muy interesante ya que en un trabajo de Torres A. K. y colaboradores llevaron a cabo un estudio acerca de las repercusiones funcionales de HIF2 $\alpha$  en la fibrosis pulmonar idiopática, en donde concluyen que este factor actuó en gran medida en un estado crónico de la enfermedad (18). También Wang, Q. y colaboradores, en su estudio con muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y clasificadas según el sistema de estadificación internacional (TNM), lograron observar por medio de inmunohistoquímica, que HIF2 $\alpha$  se expresa con mayor intensidad en estadios avanzados. Además, en el estudio preliminar con A549 observaron que HIF2 $\alpha$  se acumuló gradualmente y persistió niveles altos en exposición prolongada a hipoxia (27).

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede inferir que el comportamiento de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  se complementan con la finalidad de mayor adaptación, proliferación y migración de las células.

En el caso de HIF3 $\alpha$  se ha reportado como un competidor en la unión de la subunidad beta por lo que resulta interesante ya que en el presente trabajo existe una mayor expresión en condiciones de hipoxia en un estado agudo (6 y 12 h), aunque en menor cantidad. Otros autores como Yadi Huang y colaboradores, presentan un trabajo interesante en donde HIF3 $\alpha$  desempeña un papel importante en la alveolización y la diferenciación de células epiteliales durante el desarrollo de los pulmones de ratón (20). Además, Qi Fang Li y Xiang Rui Wang, observaron que incrementa la expresión de HIF3 $\alpha$  en células A549 a 2 horas y 16 horas en condiciones de hipoxia, y concluyen que la acción de HIF3 $\alpha$  es complementario con HIF1 $\alpha$  en la protección del daño hipóxico de las células (25).

Haciendo una comparación general de los tres factores todo indica que la expresión de HIFs va a estar en función de las necesidades de la célula dentro del microambiente tumoral.

El ambiente con bajos niveles de oxígeno propicia mecanismos para la supervivencia, adaptación a la respuesta inmunitaria y proliferación de las células de cáncer. En el presente trabajo se observó que la expresión de HIFs está presente no solo en condiciones de hipoxia sino también en normoxia. La razón aún es incierta ya que en el cáncer están implicados mutaciones en el ADN que también pueden interferir en cómo reaccionan las células ante los estímulos que se indujeron. Si bien las investigaciones acerca de los HIFs se han abarcado en otros tipos de cáncer y células, los mecanismos aún siguen siendo en su mayoría inconclusas o desconocidas, con este trabajo se logra visualizar de manera más completa la dinámica de HIFs en una misma línea celular y condiciones de exposición, la expresión de un factor u otro puede ser indicativo del estado de desarrollo de un cáncer. Para HIF3 $\alpha$  con base a los resultados obtenidos no sería suficiente el mecanismo de inhibición ya que se expresa en menor medida, pero se puede realizar más investigación acerca de este factor con el objetivo de evaluar la actividad de unión a la subunidad beta siendo un competidor principal frente a HIF1 $\alpha$  por la unión en la subunidad beta.

## **Conclusiones**

Durante el desarrollo del protocolo se obtuvieron nuevos conocimientos muy importantes para llevar a cabo la elaboración, análisis e interpretación de nuevos conocimientos acerca de los mecanismos involucrados en la metástasis.

De acuerdo a la hipótesis planteada solo se pudo confirmar o debatir la primera parte, que consistía que en condiciones de hipoxia los HIFs (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ ) iban a tener una mayor expresión lo cual no fue del todo cierto, HIF1 $\alpha$  no solo se expresa mayormente en hipoxia, además disminuye con el paso del tiempo, HIF2 $\alpha$

se expresa en mayor medida en normoxia en estado agudo y posteriormente en hipoxia en estado crónico, por último, HIF3 $\alpha$  se expresó en hipoxia, aunque en menor medida. Concluimos que las diferencias pueden deberse a otros factores y mecanismos implicados además de las concentraciones de oxígeno.

Por otro lado, de acuerdo con los objetivos planteados, se alcanzaron a identificar y cuantificar HIFs (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ ) en células de adenocarcinoma pulmonar A427 en condiciones de normoxia e hipoxia a 6, 12, 24 y 48 horas. Sin embargo, debido a dificultades técnicas externas al laboratorio (instalaciones eléctricas del edificio, fallas en el REVCO, etc.), así como falta de tiempo, reactivos y dificultades en el crecimiento celular, no se pudo llevar a cabo el segundo objetivo que era: Inhibición de la expresión de HIFs en normoxia e hipoxia por carboplatino que es un agente citotóxico que se utiliza en la quimioterapia y YCI (inhibidor específico de la expresión de HIFs). No obstante, no deja de ser importante continuar con estos estudios para lograr determinar si el fármaco tiene un impacto en la expresión de estos factores y disminuir el riesgo de metástasis, si bien existen investigaciones acerca de la inhibición de HIF1 $\alpha$  con fármacos más selectivos y terapias dirigidas ya en estudios preclínicos y clínicos muy prometedores, es muy importante ubicar el contexto cultural y socioeconómico de la población mexicana que es afectada por esta enfermedad así como los tratamientos más accesibles para los mismos, lo que resulta difícil optar por terapias más prometedoras.

## Agradecimientos

Agradezco la apertura del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias mediante la unidad de enseñanza, al personal del laboratorio de Oncología Biomédica; Dra. Georgina González-Avila, Armando García, Rosy González, Cuauhtémoc Sandoval, y Javier Delgado-Tello, por su calidez, humanismo y pasión por la ciencia e investigación que fueron primordiales para el desarrollo del presente trabajo, así como los conocimientos transmitidos que son invaluableles.

## Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer (2022). Global Cancer Observatory World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/>
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2022) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales.
3. Semenza GL. (2003). Dirigirse a HIF-1 para la terapia contra el cáncer. Nat Rev Cáncer; 3:721–32

4. Gupta médico de cabecera, masaje j. (2006). Metástasis del cáncer: construyendo un marco. *Célula*; 127:679–95.
5. Kruglyak, K. M., Lin, E., & Ong, F. S. (2016). Next-Generation Sequencing and Applications to the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 890, 123–136.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-24932-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24932-2_7)
6. Xin Lu, Yibin Kang. (15 december 2010). Hypoxia and Hypoxia-inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. *Clin Cancer Res* ; 16 (24): 5928–5935. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1360>
7. Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S., & Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088), 1222–1226.  
<https://doi.org/10.1038/nature04695> (Retraction published *Nature*. 2020 Mar;579(7799):456). <https://doi.org/10.1038/nature04695>
8. Ide, T., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Ohtsuka, T., Mitsuno, M., Ohtaka, K., Koga, Y. y Miyazaki, K. (26 october 2006), Tumor-stromal cell interaction under hipoxia increases the invasiveness of pancreatic cáncer cell through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *En t. J. Cáncer*, 119: 2750-2759.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.22178>
9. Edward E. Graves, Amit Maity, Quynh-Thu Le. (2010) The Tumor Microenvironment in Non–Small-Cell Lung Cancer. *Seminars in Radiation Oncology*. Elsevier. Volume 20, Pages 156-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.01.003>.
10. Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., García-Hernández, AA, Ramos, C. (2020). Matrix Metalloproteinases´ Role in Tumor Microenviroment En: Birbrair, A. (eds) *Tumor Microenvironment. Avances en Medicina Experimental y Biología*, vol 1245. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7_5)
11. Benedetti, Inés, & Reyes, Niradiz. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*, 28(4), 420-433.  
<https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a07>



12. Duan, C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 310(4), C260-C269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015>
13. Shan Hua Li, Dong Hoon Shin, Yang-Sook Chun, Myung Kyu Lee, Myung-Suk Kim, Jong-Wan Park (1 de diciembre de 2008). A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 $\alpha$ . *Mol Cancer Ther*; 7 (12): 3729–3738. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0074>
14. Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., Garcia-Hernandez, A. A., Ramos, C., Delgado, J., Vazquez, L. Gonzalez, R. A. Sandoval, C., Flores-Soto, E. (2022). Matrix Metalloproteinases and Stress Hormones in Lung Cancer Progression. *Journal of Oncology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5349691>
15. Anderson, N. M., & Simon M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
16. Delin Chen, Muyang Li, Jianyuan Luo, Wei Gu, (2003). Direct Interactions between HIF-1 $\alpha$  and Mdm2 Modulate p53 Function\*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 278, Issue 16, Pages 13595-13598, ISSN 0021-9258. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200694200>
17. Ashutosh Tiwari, Kojiro Tashiro, Ajay Dixit, Aditi Soni, Keianna Vogel, Bryan Hall, Iram Shafqat, Joseph Slaughter, Nesteen Param, An Le, Emily Saunders, Utkarsha Paithane, Guillermina Garcia, Alexandre Rosa Campos, Jon Zettervall, Marjorie Carlson, Timothy K. Starr, York Marahrens, Aniruddha J. Deshpande, Cosimo Commisso, Paolo P. Provenzano, Anindya Bagchi, (2020). Loss of HIF1A From Pancreatic Cancer Cells Increases Expression of PPP1R1B and Degradation of p53 to Promote Invasion and Metastasis, *Gastroenterology*, Volume 159, Issue 5. Pages 1882-1897.e5, ISSN 0016-5085. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.046>
18. Torres-Soria, A. K., Romero, Y., Balderas-Martínez, Y. I., Velázquez-Cruz, R., Torres-Espíndola, L. M., Camarena, A., Flores-Soto, E., Solís-Chagoyán, H., Ruiz, V., Carlos-Reyes, Á., Salinas-Lara, C., Luis-García, E. R., Chávez, J., Castillejos-López, M., & Aquino-Gálvez, A. (2022). Functional Repercussions of Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$  in Idiopathic

- Pulmonary Fibrosis. *Cells*, 11(19), 2938.  
<https://doi.org/10.3390/cells11192938>
19. Duan C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 310(4), C260–C269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015>
20. Huang Y, Kapere Ochieng J, Kempen MBv, Munck ABd, Swagemakers S, et al. (2013) Hypoxia Inducible Factor 3 $\alpha$  Plays a Critical Role in Alveolarization and Distal Epithelial Cell Differentiation during Mouse Lung Development. *PLOS ONE* 8(2): e57695.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057695>
21. Aquino-Gálvez, A., González-Ávila, G., Delgado-Tello, J., Castillejos-López, M., Mendoza-Milla, C., Zúñiga, J., Checa, M., Maldonado-Martínez, H. A., Trinidad-López, A., Cisneros, J., Torres-Espíndola, L. M., Hernández-Jiménez, C., Sommer, B., Cabello-Gutiérrez, C., & Gutiérrez-González, L. H. (2016). Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia. *Oncology reports*, 35(1), 577–583. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4399>
22. Wei, D., Peng, J.-J., Gao, H., Li, H., Li, D., Tan, Y., & Zhang, T. (2013). Digoxin Downregulates NDRG1 and VEGF through the Inhibition of HIF-1 $\alpha$  under Hypoxic Conditions in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7273–7285. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14047273>
23. Mucci, S., Isaja, L., Rodríguez-Varela, M.S. et al. (2022). Acute severe hypoxia induces apoptosis of human pluripotent stem cells by a HIF-1 $\alpha$  and P53 independent mechanism. *Sci Rep* 12, 18803.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-23650-7>
24. Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A.E., Shvarts, A., Meijer, S., Pinedo, H.M., Semenza, G.L., van Diest, P.J. and van der Wall, E. (2003), Levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*, 97: 1573-1581.  
<https://doi.org/10.1002/cncr.11246>
25. Li, Q. F., Wang, X. R., Yang, Y. W., & Lin, H. (2006). Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  expression in lung epithelial cells:

characterization and comparison with HIF-1 $\alpha$ . Cell research, 16(6), 548–558. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310072>

26. Uchida, Tokujiro et al. (2004). Prolonged Hypoxia Differentially Regulates Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  Expression in Lung Epithelial Cells. Journal of Biological Chemistry, Volume 279, Issue 15, 14871 – 14878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400461200>
27. Wang, Q., Hu, D. F., Rui, Y., Jiang, A. B., Liu, Z. L., & Huang, L. N. (2014). Prognosis value of HIF-1 $\alpha$  expression in patients with non-small cell lung cancer. Gene, 541(2), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.025>

## Anexo

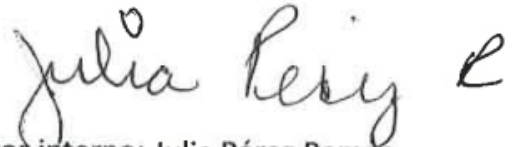
### Cronograma de actividades

Alumno	Marcos Rojas Martínez	
Universidad	UAM Xochimilco	
Actividad	Servicio Social Sep-2022 a febrero-2023	
Proyecto	Efectos de la quimioterapia en la expresión de HIFs en condiciones de hipoxia.	
Septiembre	Inducción al laboratorio: medidas de seguridad, simbología, inicio de cultivo celular para su proyecto.  Planeación de proyecto de investigación Conocimiento e inicio en el manejo de técnicas necesarias para el desarrollo de su proyecto: cuantificación de proteínas, electroforesis, cultivo celular (A427).  Inicio de cultivo celular para proyecto.	
Octubre- Noviembre	Cultivo de células neoplásicas, exposición de células a hipoxia (O <sub>2</sub> 1%), por 6, 12, 24 y 48 y en condiciones de normoxia. Extracción de proteínas nucleares. Western blot de HIF-1, 2 y 3. Densitometría	
Diciembre	Experimentos de toxicidad con carboplatino	
Enero	Cultivo células neoplásicas, exposición de células a hipoxia (O <sub>2</sub> 1%) por 6, 12, 24 y 48 horas y en condiciones de normoxia en presencia de carboplatino y del inhibidor de expresión de HIFs, YC1. Extracción de proteínas nucleares. Western blot de HIF-1, 2 y 3. Densitometría.	
Febrero	Terminar experimentos y análisis de resultados. Reporte final.	



Tutor externo: Georgina Gonzales Avila

Laboratorio de Oncología Biomédica. Jefe del  
Departamento de Enfermedades Crónicas  
Degenerativas



Tutor interno: Julia Pérez Ramos

Departamento de Sistemas Biológicos  
UAM Xochimilco