



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

“IMPLICACIONES PRONÓSTICAS DE LA EXPRESIÓN
DE HIF-1 α EN CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
DE CABEZA Y CUELLO”

TESIS DOCTORAL

Autor:

Rubén Cabanillas Farpón

Directores:

M^a Dolores Chiara Romero

Juan Pablo Rodrigo Tapia



Universidad
de Oviedo

Reservados todos los derechos
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo
Biblioteca Universitaria, 2008
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 28

ISBN 978-84-691-6492-1
D.L.: AS.05347-2008





AUTORIZACIÓN PARA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Datos del alumno:

Apellidos: CABANILLAS FARPON

DNI: 9421688Z

Calle: GIL BLAS,14-5ºB

Domiciliado en: OVIEDO

Curso: 2005/2006

Nombre: RUBEN

Teléfono: 985219127

C.P.: 33008

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Investigación en cáncer

Departamento responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

Departamento en que presenta la tesis doctoral: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

Título definitivo de la Tesis: IMPLICACIONES PRONOSTICAS DE LA EXPRESION DE HIF-1ALPHA EN CARCINOMAS EPIDERMOIDES DE CABEZA Y CUELLO

Autorización del director/es de la tesis

D/Dª: JUAN PABLO RODRIGO TAPIA

Departamento: CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS

D/Dª: MARIA DOLORES CHIARA ROMERO

Universidad: UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución

El Departamento INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA en su reunión de fecha 17 de Marzo de 2006, acordó **dar su conformidad para** la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, en cumplimiento de lo establecido en el RD 56/2005 de 21 de Enero.

Asimismo el director/directores de la tesis doctoral, cumplen con el requisito establecido en el artículo 32.1.b del Reglamento de Tercer Ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de Doctor y otros cursos de Postgrado, aprobado por Consejo de Gobierno de fecha 11 de julio de 2005 (BOPA 10.08.2005), y emiten el informe que se adjunta sobre la calidad científica de la misma, en cumplimiento de lo establecido en el R.D. 56/2005 y en el art. 35.1.a.bis del Reglamento de Tercer Ciclo de estudios universitarios, mencionado anteriormente.

Oviedo, 17 de Marzo de 2006

Director de la Tesis

Director de la Tesis

Fdo: JUAN PABLO RODRIGO TAPIA

Fdo: MARIA DOLORES CHIARA ROMERO

El Director del Departamento

Fdo.: CARLOS SUAREZ NIETO



INFORME SOBRE LA CALIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS DOCTORAL

Alumno: RUBEN CABANILLAS FARPON
Título de la Tesis Doctoral: IMPLICACIONES PRONOSTICAS DE LA EXPRESION DE HIF-1ALPHA EN CARCINOMAS EPIDERMOIDES DE CABEZA Y CUELLO

El trabajo titulado “**Implicaciones Pronósticas de la Expresión de HIF-1 α en Carcinomas Epidermoides de Cabeza y Cuello**” es inédito y reúne las condiciones necesarias y con la suficiente calidad científica para ser defendido como Tesis Doctoral. Es un trabajo que aporta conocimientos nuevos y relevantes a la fisiopatología de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Más allá del incremento en los conocimientos básicos de la biología tumoral, este trabajo trasciende al paciente con cáncer al arrojar luz sobre el uso de determinadas moléculas celulares, bien como indicadoras del diagnóstico o pronóstico de la enfermedad, bien como dianas terapéuticas.

La originalidad del trabajo, relevancia del tema científico, aportaciones al conocimiento existente, unidad e interés de los resultados dotan a este trabajo de los requisitos necesarios para que pueda ser defendido como Tesis Doctoral

Oviedo, 25 de abril de 2006

Director de la Tesis

Director de la Tesis

Fdo: JUAN PABLO RODRIGO TAPIA

Fdo: MARIA DOLORES CHIARA ROMERO

“La cima de la verdad, con tantos esfuerzos escalada, que mirada desde el valle semejaba montaña imponente, no es sino minúscula estribación de formidable cordillera que se columbra a través de la niebla, atrayéndonos con insaciable curiosidad”

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su participación han hecho posible este trabajo:

En primer lugar, agradecer al Profesor Reidar Grenman el habernos cedido la línea celular SCC38 y al Profesor Peter Ratcliffe el plásmido pcDNA-HIF-1 α .

A los directores de esta tesis, Juan Pablo Rodrigo y María Dolores Chiara, muchas gracias por su paciencia, sugerencias, e implicación en las discusiones que poco a poco han ido dando origen a los presentes resultados.

A la doctora Aurora Astudillo quiero darle las gracias por su total disponibilidad, ya que siempre ha estado ahí para resolver todas las dudas que pudieran surgir, sin limitación de tiempo, ni horario. Con la seguridad que proporciona el saber que ante cualquier contratiempo tendrás a quien acudir para resolverlo.

Agradecimiento extensible también a Marta Sánchez y Olivia García, sin cuya inmensa colaboración en el procesamiento de las muestras tumorales y colosal paciencia en la realización de los cortes seriados de los ratones, este trabajo nunca hubiera sido posible.

A Laura Santos y Teresa Sánchez quiero darles las gracias por todo el trabajo dedicado al cuidado de los ratones en el animalario.

No puedo dejar de agradecer a Aurora Menéndez, Inés Argüelles y Agustín Herrero, el habernos facilitado las muestras procedentes de los archivos de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias, y a Francisco Domínguez y César Álvarez el habernos permitido tener acceso a los archivos clínicos y patológicos del Hospital Valle del Nalón.

Gracias también a Pablo Secades por su encomiable participación en el manejo de las líneas celulares y su inestimable ayuda para resolver cualquier problema técnico que pudiese presentarse.

También agradecer a Guillermo Mañana, su asesoramiento en la maquetación, así como su apoyo moral y crítica visión, como amigo qué es.

A Jesús Pereira quiero agradecerle todas las horas dedicadas a darle forma a mis portadas y presentaciones.

A Susana por su infinita paciencia, por su saber estar en cada momento, y por su enorme e inestimable implicación en mi trabajo diario.

Y por último, aunque en primerísimo lugar, no puedo dejar de mencionar a mi familia y sobretodo a mis padres, quienes con su apoyo incondicional hacen que mi trabajo sea más fácil, y al fin y al cabo, posible.

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
1.1. Hipóxia y cáncer.....	7
1.2. Rutas celulares implicadas en el reconocimiento del ambiente hipóxico y en la respuesta al mismo.....	9
1.3. Función y estructura del Factor Inducible por Hipóxia.....	10
1.3.1. Dominios proteicos de HIF-1 α	14
1.4. Mecanismos de regulación de HIF-1 α	16
1.4.1. Regulación independiente de la concentración intracelular de oxígeno.....	16
1.4.2. Regulación dependiente de la concentración intracelular de oxígeno.....	20
1.5. Función de HIF-1 α en el desarrollo de los distintos tumores humanos.....	23
1.5.1. Correlaciones clínico-patológicas en los distintos tumores humanos.....	25
1.5.2. Actividad de HIF-1 α en distintas líneas celulares tumorales.....	27
1.5.3. HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.....	28
1.6. HIF-1 α como objetivo de los futuros tratamientos contra el cáncer.....	30
1.6.1. Potenciales aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de HIF-1 α	32
1.6.2. Terapia génica y HIF-1 α	33
2. Objetivos.....	35
3. Material y Métodos.....	39
3.1. Muestras biológicas.....	41
3.2. Estudio inmunohistoquímico.....	43
3.2.1. HIF-1 α	44
3.2.1.1. Caracterización del anticuerpo monoclonal IgG ₁ anti-HIF-1 α	45
3.2.1.2. Expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides supraglóticos.....	45
3.2.2. p53.....	46
3.2.3. caspasa-3.....	46
3.2.4. CD34.....	48

3.3. Desarrollo de un modelo animal de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	49
3.3.1. Células tumorales.....	49
3.3.1.1. Tratamientos celulares.....	50
3.3.1.1.1. Construcción del plásmido pcDNA3-HIF-P402A-P564G.....	50
3.3.1.1.2. Generación de células SCC38 transfectadas establemente con pWZL-HIF-P402A-P564G.....	53
3.3.1.1.3. Exposición a hipoxia.....	55
3.3.1.2. Western blot.....	55
3.3.2. Características y cuidados de los animales.....	56
3.3.3. Caracterización del sistema de drenaje linfático del suelo de la boca en ratones.....	57
3.3.4. Inoculación de las células tumorales.....	57
3.3.5. Necropsia y estudio histológico.....	58
3.4. Análisis estadístico.....	58
4. Resultados.....	61
4.1. Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados y su relación con el pronóstico.....	63
4.2. Expresión de HIF-1 α	66
4.2.1. Expresión de HIF-1 α en la mucosa normal de las vías aerodigestivas superiores.....	66
4.2.2. Expresión de HIF-1 α en carcinomas epidermoides supraglóticos.....	68
4.2.3. Expresión de HIF-1 α en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos.....	70
4.2.4. Relación entre la expresión de HIF-1 α y las distintas variables clínico-patológicas.....	72
4.2.5. Relación entre la expresión de HIF-1 α y el pronóstico.....	73
4.3. Expresión de p53.....	75
4.3.1. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides supraglóticos.....	75
4.3.2. Expresión de p53 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos.....	76
4.3.3. Relación entre la expresión de p53 y las distintas variables clínico-patológicas.....	77

4.3.4. Relación entre la expresión de p53 y el pronóstico.....	78
4.4. Expresión de caspasa-3.....	79
4.4.1. Expresión de caspasa-3 en carcinomas epidermoides supraglóticos.....	79
4.4.2. Expresión de caspasa-3 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos.....	80
4.4.3. Relación entre la expresión de caspasa-3 y las distintas variables clínico-patológicas.....	81
4.4.4. Relación entre la expresión de caspasa-3 y el pronóstico.....	82
4.4.5. Relación entre la expresión de caspasa-3, HIF-1 α y p53.....	84
4.5. Expresión de CD34.....	85
4.5.1. Expresión de CD34 en carcinomas epidermoides supraglóticos.....	85
4.5.2. Expresión de CD34 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos.....	85
4.5.3. Relación entre la expresión de CD34 y las distintas variables clínico-patológicas.....	86
4.5.4. Relación entre la expresión de CD34 y el pronóstico.....	87
4.5.5. Relación entre la expresión de CD34, HIF-1 α , p53 y c-3.....	88
4.6. Modelo murino de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	90
4.6.1. Estudio piloto.....	90
4.6.2. Inyección de SCC38.....	91
4.6.3. Expresión de HIF-1 α en SCC38 y SCC38pWZL-HIF-1 α	95
4.6.4. Inyección del transfectante estable.....	97
5. Discusión.....	99
6. Conclusiones.....	123
7. Acrónimos.....	127
8. Bibliografía.....	133

INTRODUCCIÓN

1.1. Hipoxia y cáncer

El oxígeno es una molécula esencial para la supervivencia, y su carencia es incompatible con la vida. Actúa como sustrato final aceptor de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, haciendo posible la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) por fosforilación oxidativa. Por lo tanto, descensos en la concentración intracelular de oxígeno, incluso de carácter transitorio, pueden ocasionar daños celulares irreversibles. La disminución de la presión parcial de oxígeno –hipoxia- es un fenómeno poco habitual en los tejidos normales, pero aparece con frecuencia durante el desarrollo tumoral. El aumento progresivo y descontrolado de la masa celular del tumor conlleva una disminución del aporte de oxígeno y nutrientes a las células que forman parte del mismo. Además, aunque el desarrollo tumoral se acompaña de la formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis), éstos son aberrantes y a menudo presentan flujos insuficientes¹. Así, las concentraciones de oxígeno en el interior de la masa tumoral son muy variables, de modo que con frecuencia se detectan zonas pobremente oxigenadas con presiones parciales de oxígeno menores de 5 mmHg (que corresponden a concentraciones de oxígeno del 0,7%), mientras que los tejidos normales presentan presiones parciales comprendidas entre 24 y 66 mmHg (lo que corresponde a concentraciones del 3,1% y el 8,7% respectivamente)². En estas condiciones, las células tumorales han de sufrir diversos cambios adaptativos que les permitan no sólo sobrevivir, sino también proliferar.

La exposición crónica a hipoxia induce profundas modificaciones en los patrones de expresión génica celular, lo que se traduce en cambios bioquímicos y tisulares que permiten reducir las necesidades celulares de oxígeno, y que incrementan el suministro de esta molécula a los tejidos hipóxicos. Entre estas modificaciones se encuentran cambios en el metabolismo oxidativo, en los procesos de muerte celular programada (apoptosis), proliferación y migración celular, así como en los mecanismos de angiogénesis. De este modo, varias de las rutas implicadas en la adaptación celular a la hipoxia, se solapan con las vías de señalización consideradas pro-oncogénicas.

Las primeras observaciones que llevaron a pensar que los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello podían ser tejidos hipóxicos surgieron del estudio histológico de las muestras

tumorales. En estos análisis se observó que la vascularización aparentemente caótica, y la presencia de necrosis, eran fenómenos frecuentes en estos tumores. Posteriormente, mediante la aplicación directa de electrodos en el espesor de la masa tumoral, y el empleo de fármacos capaces de modificar su estado redox en función del grado de oxigenación tisular³, se pudo confirmar de forma fehaciente la presencia de áreas hipóxicas en el interior de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

La hipoxia intratumoral comenzó a despertar el interés de los investigadores debido a sus efectos sobre la respuesta de las células tumorales a la radioterapia. La eficacia de la radioterapia se basa en la producción de radicales libres de oxígeno, pues son éstos los principales mediadores de sus efectos nocivos, a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. En ausencia de oxígeno, los radicales inducidos por las radiaciones ionizantes en estas moléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) pueden ser fácilmente neutralizados mediante la donación de hidrógenos (fundamentalmente desde grupos sulfhidrilo no proteicos). Por el contrario, cuando los tejidos están bien oxigenados, se produce tal cantidad de radicales libres que no pueden ser neutralizados. Así, una misma dosis de radioterapia, será más eficaz cuando se administra sobre un tejido bien perfundido, pues generará una mayor cantidad de daños en el ADN. Por el contrario, en un tejido hipóxico los daños inducidos serán sensiblemente menores^{3,4}. La presencia de una pequeña fracción de células hipóxicas, y por lo tanto radioresistentes, es capaz de condicionar la respuesta del tumor a la radioterapia, pues estas sufrirán una selección positiva durante el tratamiento.

Como en el caso de la radioterapia, las células tumorales hipóxicas presentan resistencias a una gran variedad de agentes citotóxicos. Este fenómeno se puede justificar por varias razones. En primer lugar, las células hipóxicas se encuentran más alejadas de los vasos sanguíneos, y por lo tanto están expuestas a concentraciones inferiores de los fármacos administrados por vía sistémica. Las limitaciones en la difusión a través de la matriz extracelular y la captación de las drogas por parte de las células bien perfundidas, justifican la menor concentración de fármacos hallada en las zonas hipóxicas⁵. Por otro lado, es un hecho conocido que la hipoxia crónica puede inhibir el ciclo celular⁶. Puesto que la mayoría de los fármacos citotóxicos actuales son más efectivos sobre las células que están proliferando, las células hipóxicas resultan ser menos sensibles a la quimioterapia convencional que las células de las zonas bien perfundidas. Del mismo modo, la actividad de algunos agentes citotóxicos (como es el caso de la bleomicina) se ve potenciada por la presencia de oxígeno el cual, como

ocurre en el caso de la radioterapia, incrementa los daños inducidos en el ADN por estos fármacos. Por último, la hipoxia tiene como consecuencia la sobre-expresión de genes capaces de conferir resistencia a drogas, como es el caso de la glucoproteína P, proteína capaz de bombear fuera de la célula diversos agentes anti-tumorales⁷. El conjunto de estos factores hace que los tejidos hipóxicos sean menos sensibles a los fármacos citotóxicos que sus homólogos mejor oxigenados.

Independientemente de la resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia, los tumores pobremente oxigenados manifiestan un comportamiento más agresivo que aquellos bien perfundidos. La presencia de bajas presiones parciales de oxígeno dentro del tumor tiene como consecuencia la selección de células con fenotipos tumorales más agresivos, con tasas de mutación más altas y mayor potencial metastásico. En concreto, la hipoxia se ha asociado con un peor pronóstico y con un aumento del riesgo de metástasis en pacientes con carcinomas epidermoides de cervix^{8,9}, sarcomas de partes blandas¹⁰, neuroblastomas¹¹, y también en el caso de pacientes con cáncer de mama^{12,13}.

El papel de las bajas presiones parciales de oxígeno en pacientes con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello fue destacado por primera vez en 1996 por Nordmark y colaboradores¹⁴. Estos autores pusieron de manifiesto, que los pacientes con carcinomas pobremente oxigenados tenían una menor supervivencia. Sus resultados fueron confirmados posteriormente en numerosos estudios^{15,16,17,18,19,20}, en los cuales se mostraba que aquellos tumores con presiones parciales de oxígeno menores de 10 mmHg presentaban un peor pronóstico. Sin embargo, en ninguno de estos estudios el tratamiento del tumor primario se hizo mediante cirugía, pues las distintas modalidades terapéuticas evaluadas empleaban la radioterapia como tratamiento del tumor primario, bien administrada de forma aislada, o en combinación con quimioterapia.

1.2. Rutas celulares implicadas en el reconocimiento del ambiente hipóxico y en la respuesta al mismo

El factor de transcripción HIF (“Hypoxia Inducible Factor”), identificado en 1995 por Semenza y colaboradores^{21,22}, parece ser el complejo molecular clave en la respuesta celular a la hipoxia, habiéndose concentrado sobre él la mayor parte de la investigación relativa a la

misma. No obstante, existen otros factores de transcripción activados en condiciones de bajas presiones parciales de oxígeno. Estos serían los responsables de la transcripción de diversos genes cuya expresión se ha demostrado dependiente de hipoxia, pero independiente de HIF²³. Entre estos factores de transcripción destacan CREB²⁴, AP-1²⁵ o NF- κ B²⁶. Sin embargo, persisten múltiples incógnitas sobre sus mecanismos de regulación en condiciones de hipoxia. Otro factor de transcripción inducido en hipoxia es MTF1²⁷, algunos de cuyos genes diana codifican proteínas (como es el caso de PlGF) que podrían actuar de forma sinérgica con VEGF, promoviendo la angiogénesis²⁸.

Los monocitos, los macrófagos y las células musculares lisas de las paredes vasculares parecen responder a la hipoxia aumentando la expresión de EGR-1. Esta proteína tendría como consecuencia la sobre-expresión en la superficie de estas células de una molécula denominada TF, responsable de favorecer la formación de un depósito intravascular de fibrina. Este depósito terminaría conduciendo a la formación de coágulos sanguíneos^{29,30}. Estos hallazgos están de acuerdo con el estado de hipercoagulabilidad que con frecuencia presentan los pacientes afectados de tumores malignos.

A pesar de la activación de estas proteínas en condiciones de hipoxia, la principal molécula implicada en la homeostasis del oxígeno parece ser HIF. Hasta la fecha, HIF es la única proteína conocida que responde de una forma específica a la hipoxia, mientras que el resto de los factores de transcripción previamente descritos carecen de esta especificidad, estando implicados en la regulación de otros procesos fisiológicos independientes del grado de oxigenación tisular.

1.3. Función y estructura del Factor Inducible por Hipoxia

El factor de transcripción HIF es un heterodímero constituido por dos subunidades: HIF- β (también conocida como ARNT o componente del receptor de hidrocarburos aromáticos) que se expresa de forma constitutiva, y HIF- α , subunidad cuya expresión se encuentra fuertemente regulada³¹.

Los niveles de HIF- α en el interior de la célula están condicionados por el balance entre su síntesis (regulada por mecanismos independientes del oxígeno) y su degradación (condicionada fundamentalmente por los niveles de oxígeno intracelular), siendo este último el mecanismo fundamental a la hora de determinar los niveles intracelulares de HIF en condiciones fisiológicas.

Se considera que, en condiciones de hipoxia, HIF podría transcribir entre un 1% y un 5% del conjunto de los genes humanos, habiéndose identificado más de 80 genes sustratos directos de HIF^{31,32,33} (Figura 1). Algunos de estos genes resultan especialmente relevantes para la progresión tumoral. En concreto, aquellos que codifican factores pro-angiogénicos, transportadores de glucosa, enzimas glucolíticos, factores promotores de la invasividad celular o genes que permiten a la célula sobrevivir independientemente de la presencia de estímulos que desencadenarían la muerte celular programada. Por otro lado, experimentos *in vitro* han demostrado que, en condiciones de hipoxia, HIF-1 α es capaz de inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis³⁴. Así, cuando una célula se ve sometida a bajas presiones parciales de oxígeno, HIF-1 α no sólo estimularía la angiogénesis y la glucolisis anaerobia, para mantener los niveles intracelulares de ATP, sino que también inhibiría la proliferación celular y frenaría los mecanismos implicados en la reparación del ADN³⁵, como medidas para evitar consumos innecesarios de energía.

La actividad transcripcional de HIF va a condicionar la expresión de un conjunto de genes distinto dependiendo del tipo celular analizado. Si bien algunos genes sustrato de HIF, como VEGF, son inducidos por hipoxia en la mayoría de las estirpes celulares, la gran parte de los genes diana de HIF se inducen de una manera específica según el tipo celular. Esta variabilidad funcional es debida a la interacción de HIF con otros factores de transcripción presentes en un momento dado en una célula concreta³⁶.

Se han identificado 3 isoformas de HIF- α capaces de formar heterodímeros con HIF- β , denominadas HIF-1 α ^{21,22}, HIF-2 α ^{37,38,39,40} (también conocido como EPAS1, HRF ó HLF) y HIF-3 α ⁴¹. Los heterodímeros constituidos tanto por HIF-1 α como por HIF-2 α con HIF- β (denominados HIF-1 y HIF-2 respectivamente) se solapan en algunas de sus funciones. Sin embargo, ambos parecen jugar papeles diferentes en la respuesta celular al estrés, respondiendo ante estímulos distintos, predominando uno u otro según la estirpe celular, y presentando genes diana específicos de cada uno^{42,43,44,45}.

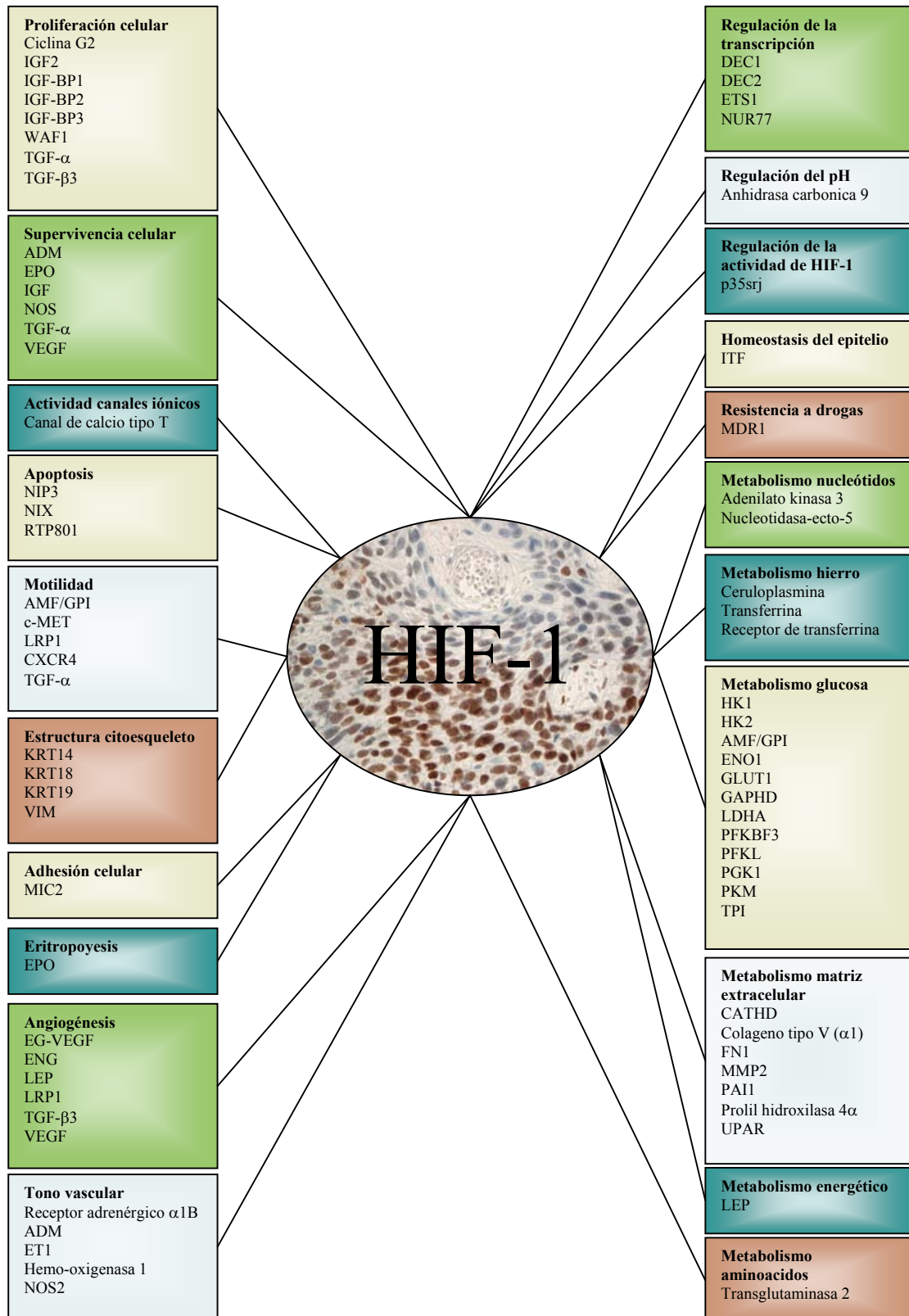


Figura 1. Genes regulados por HIF-1. En la Figura se muestran algunos de los numerosos genes descritos hasta la fecha, cuya regulación por hipoxia se atribuye a la acción de la familia de factores de transcripción HIF.

La heterodimerización de HIF-1 α con HIF- β parece ser necesaria para la estabilización del primero en el compartimento nuclear, adquiriendo una configuración espacial que le hace más resistente a la digestión proteolítica⁴⁶.

HIF-3 α se une a HIF- β para constituir un heterodímero, cuya actividad transcripcional es cuantitativamente inferior a la de HIF-1 o HIF-2, pues HIF-3 α carece, como veremos en el apartado siguiente, de uno de los 2 dominios necesarios para la transcripción. De este modo, HIF-3 α se comportaría como un inhibidor de HIF-1 α , pues ambos compiten por la unión a HIF- β . El ARN mensajero de HIF-3 α , a través de mecanismos de maduración diferencial, da lugar a diferentes variantes de la proteína, la mayoría de las cuales carecen de actividad transcripcional. Así, la sobre-expresión de HIF-3 α y fundamentalmente la de sus variantes, actuaría como un mecanismo de retroalimentación negativo, puesto que el aumento de sus niveles en condiciones de hipoxia, evitaría un exceso de actividad de HIF-1 α ⁴⁷. En el epitelio corneal, HIF-3 α contribuiría a inhibir la angiogénesis, consiguiendo así mantener el fenotipo avascular de la cornea⁴⁸.

HIF-1 reconoce como sustratos a aquellos genes que presentan en su región promotora secuencias denominadas HRE (“Hipoxia Response Elements”). Los HRE constan de dos o más secuencias de unión a HIF, llamadas HBS (“HIF Binding Site”) (5`-RCGTG-3`). En varios genes sensibles a oxígeno, se ha identificado otra secuencia próxima a HBS, denominada HAS (Hypoxia Ancillary Sequence). HAS es un palíndromo invertido de HBS y parece ser necesario para la regulación de estos genes en hipoxia⁴⁹. Además, la actividad transcripcional de HIF aumenta por la presencia de dos o más HREs próximos entre sí. En la Tabla 1 se muestran algunos de los HREs y HAS descritos para genes regulados por HIF.

Los experimentos con ratones genéticamente modificados parecen indicar que HIF-1 es un elemento fundamental, e imprescindible, para la organogénesis. La carencia de HIF-1 resulta letal durante las fases iniciales del desarrollo embrionario, tanto si los ratones son deficientes en la subunidad 1 α ^{50,51} como si carecen de HIF- β ⁵².

Las severas anomalías en el desarrollo vascular y cardíaco conducen a la muerte del embrión en torno al décimo día de desarrollo. Sorprendentemente, los embriones deficientes en HIF-1 siguen siendo capaces de producir VEGF. En esta línea, Helton y colaboradores⁵³ pusieron de manifiesto, mediante el empleo de ratones en cuyos cerebros la expresión de HIF-1 se perdía en las fases finales de su desarrollo, que un gran porcentaje de genes clásicamente

transcritos por HIF-1, como es el caso de VEGF, pueden ser inducidos en condiciones de hipoxia aún en ausencia de HIF-1.

Tabla 1. Estructura de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) de algunos genes.

GENES	HRE	HAS
VEGF	5`-CATA CGTGGG GCTCCA CAGGTC CT-3`	CAGGT
EPO	5`-CCTA CGTG CTGTCTCA CACAGC CT-3`	CACAG
ALDA	5`-GGGAT GTGGT TCCGAGT CACGTCCG -3`	CACAT
ENO-1	5`-CGCA CGTGG CCCCGGAC CACGCAGC -3`	CACGC
LDHA	5`-CACA CGTGG GTCCCG CACGTCCG -3`	CACGT
GLUT-1	5`-CAGG CGTG CCGTCTGAC CACGCATC -3`	CACGC
PGK1	5`-GA CGTGA CAAACGAAGCCG CACGTC -3`	CACGT

1.3.1. Dominios proteicos de HIF-1 α

Las diversas isoformas de HIF- α pertenecen a la super-familia de factores de transcripción con dominios bHLH-PAS, (dominio básico hélice-lazo-hélice, con una secuencia auxiliar de dimerización conocida como dominio PAS, acrónimo que responde a las iniciales de las 3 primeras proteínas en las cuales fue descrito). Estos dominios median procesos de dimerización proteica y de unión al ADN. El extremo carboxilo del dominio PAS y el dominio básico de HIF son necesarios para la unión al ADN. Para el proceso de dimerización son precisos tanto el dominio bHLH, como el extremo amino terminal de PAS⁵⁴ (Figura 2). Las proteínas de la familia de factores de transcripción con dominios bHLH-PAS han sido implicadas en múltiples funciones como son la metabolización de productos tóxicos⁵⁵, el control de los ritmos circadianos⁵⁶ o de los procesos de diferenciación tisular durante el desarrollo embrionario⁵⁷. HIF-1 α y HIF-2 α son proteínas análogas en organización genómica y estructura terciaria, mientras que HIF-3 α presenta menor grado de homología con HIF-1 α y HIF-2 α .

HIF-1 α lleva a cabo su actividad transcripcional a través de dos dominios, denominados dominios de transactivación (TAD's), uno el amino terminal (TAD-N, aminoácidos 531 a 575), y otro el carboxilo terminal (TAD-C, aminoácidos 786 a 826) (Figura 2).

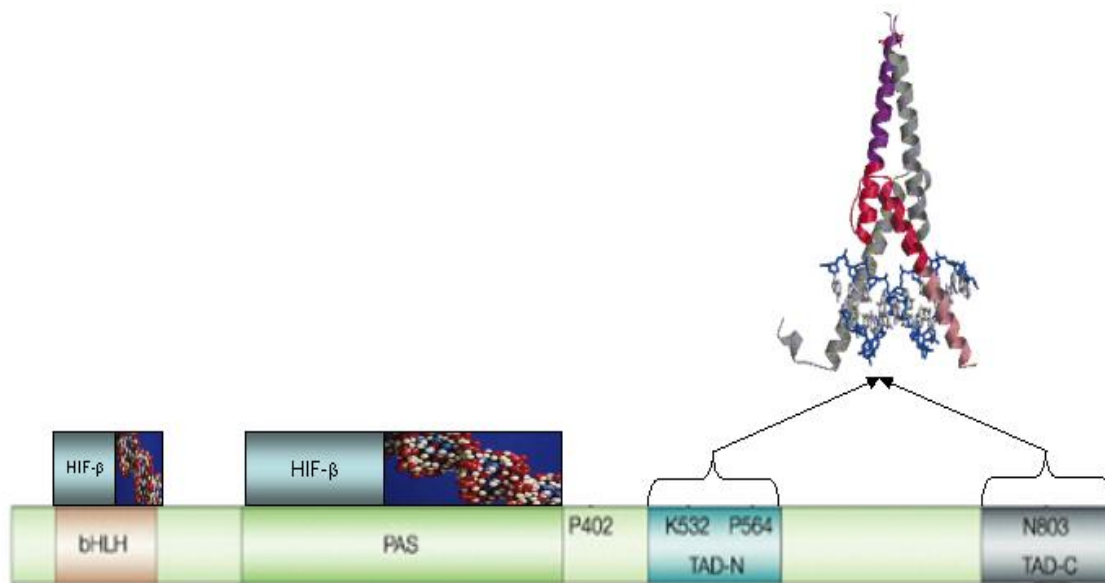


Figura 2. Dominios proteicos de HIF-1 α . Se representan los dominios de HIF-1 α , así como los aminoácidos fundamentales en la regulación dependiente de oxígeno de la proteína. Se muestran las interacciones con HIF- β , las zonas de unión al ADN, y los dominios implicados en la actividad transcripcional. bHLH: dominio básico hélice-lazo-hélice. PAS: dominio auxiliar de dimerización. TAD-N: dominio de transactivación amino terminal. TAD-C: dominio de transactivación carboxilo terminal. P402 y P564: Prolinas en posiciones 402 y 564. K: 532: Lisina en posición 532. N803: Asparragina en posición 803.

Estos dominios, además de ser fundamentales para la interacción de la proteína con co-activadores de la transcripción como CBP/p300 (HIF-3 α carece de dominio TAD-C), contienen aminoácidos fundamentales para los procesos de estabilización y regulación de la actividad transcripcional de la proteína bajo condiciones de hipoxia⁵⁸, mediante fosforilaciones, acetilaciones y modificaciones en el estado redox. Estos aminoácidos son las prolinas en posiciones 402 y 564, la lisina en posición 532, y la asparragina en posición 803. El dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD, aminoácidos 401 a 608), se solapa en parte con el TAD-N y, como su nombre indica, contiene aminoácidos esenciales para la regulación post-transcripcional de HIF-1 α dependiente de oxígeno⁵⁹.

1.4. Mecanismos de regulación de HIF-1 α

Como hemos indicado anteriormente, los niveles intracelulares de HIF-1 α están condicionados fundamentalmente por un mecanismo de regulación post-traducciona dependiente de la concentración intracelular de oxígeno. Sin embargo, otros mecanismos, no relacionados con el grado de oxigenación tisular, contribuyen, en menor medida, al control de los niveles de la proteína en el interior de las células.

1.4.1. Regulación independiente de la concentración intracelular de oxígeno

La regulación de HIF-1 α independiente de la concentración intracelular de oxígeno se lleva a cabo fundamentalmente a nivel de la síntesis proteica. Las principales vías de señalización intracelular responsables de la transducción de señales de supervivencia y proliferación celular, también inducen la síntesis proteica de HIF-1 α . Este hecho no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que cuanto mayor sea el número de células presentes en un tejido, mayor será el consumo de oxígeno por parte del mismo.

El incremento en los niveles de HIF-1 α , mediante el aumento de su síntesis, permite a las células que se están multiplicando mantener la homeostasis en sus niveles de oxígeno. El aumento de la angiogénesis, o la potenciación de la glucólisis anaeróbica como fuente de ATP, en detrimento del metabolismo oxidativo, son algunas de las consecuencias derivadas del aumento en la síntesis de HIF-1 α ^{60,61,62}. Estas estrategias hacen que las células obtengan un mayor aporte de oxígeno, al tiempo que lo utilizan de forma más eficaz, permitiéndoles así seguir proliferando.

Los factores de crecimiento, así como diversas citoquinas y otras moléculas de señalización, estimulan la síntesis de HIF-1 α mediante la activación de las rutas de la PI3K o de la MAPK^{63,64,65,66,67} (Figura 3). Estas rutas son responsables de la regulación de la traducción de varias docenas de ARN mensajeros, estando en parte condicionada la traducción de uno u otro por el tipo celular en el que la activación de estas vías tenga

lugar^{65,68}. Las alteraciones moleculares en estas rutas, debidas por ejemplo a mutaciones tanto en proto-oncogenes, como en genes supresores de tumores, pueden conducir, por diversos mecanismos, a un aumento de la actividad de HIF-1 (Tabla 2).

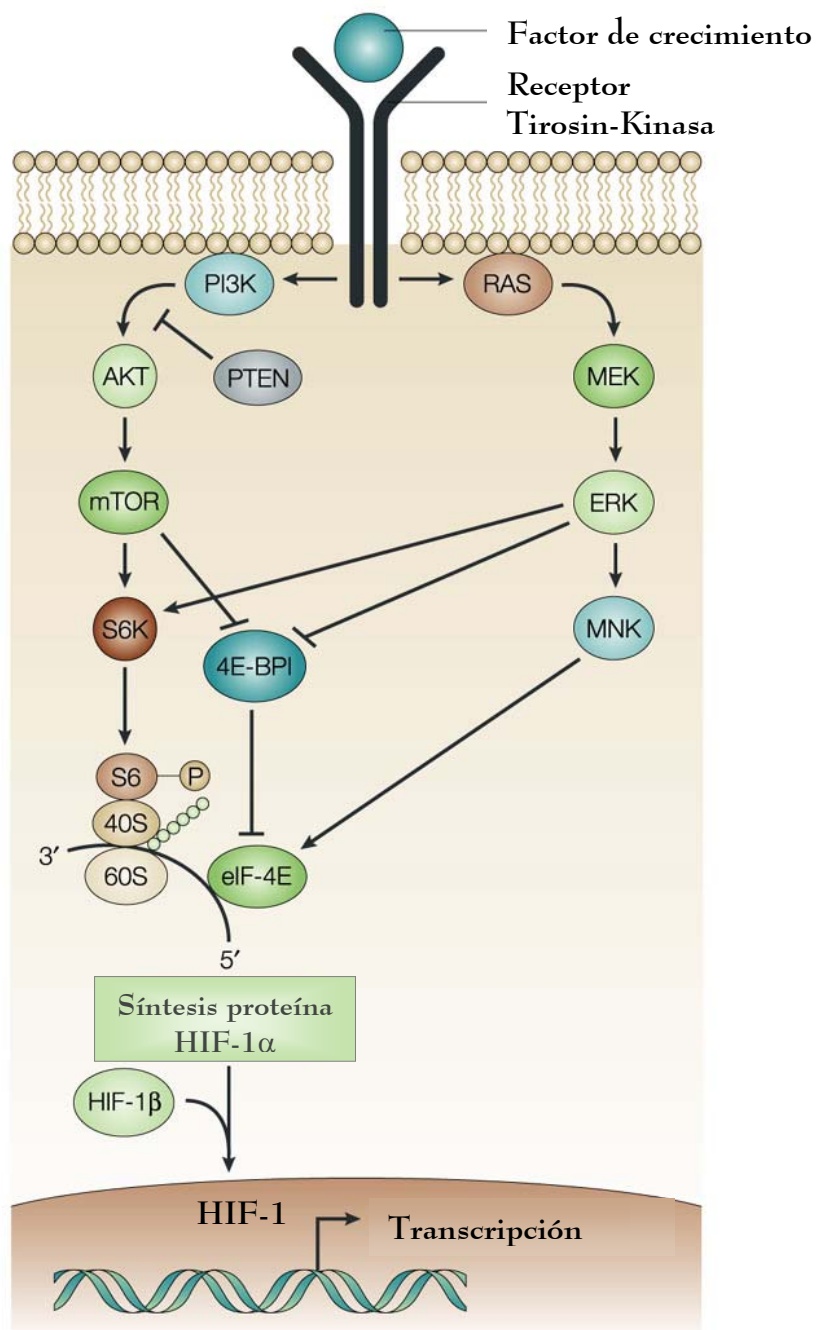


Figura 3. Regulación de la traducción de HIF-1 α . La activación de las cascadas de señalización intracelular mediadas por PI3K o RAS conlleva un aumento de la traducción de varios ARN's mensajeros, entre los que se encuentra el de HIF-1 α (modificado de Nat Rev Cancer 2003;3:721-32).

Tabla 2. Alteraciones genéticas capaces de aumentar la actividad de HIF-1.

Alteración tumoral	Mecanismo de inducción de HIF-1 α	Referencias
Pérdida de función de pVHL	Disminución de la ubiquitinización	69
Pérdida de función de PTEN	Aumento de la síntesis	66,67
Activación ruta PI3K-AKT-mTOR	Aumento de la síntesis	65,66
Activación ruta MEK-ERK	Aumento de la síntesis	63
Activación ruta ERBB2	Aumento de la síntesis	65
Activación ruta EGFR	Aumento de la síntesis	66
Activación ruta IGF1R	Aumento de la síntesis	63
Activación ruta PGE2	Aumento de la síntesis	64,70
Aumento de actividad de SRC	Aumento de la síntesis	62
Pérdida de función de ARF	Menor secuestro nucleolar	71
Sobre-expresión de BCL2	Desconocido	72

Este aumento de actividad conlleva un fenómeno de retroalimentación positiva, pues varios factores de crecimiento, fundamentalmente IGF-2, y TGF- α son al mismo tiempo genes sustrato de HIF-1^{73, 74, 75}. Así, un aumento de la actividad de HIF-1, inducirá un incremento en la transcripción de estos factores de crecimiento que, actuando de un modo autocrino (Figura 4), desencadenarían la cascada de señalización que tiene como consecuencia tanto una estimulación de la proliferación y de la supervivencia celular, como un aumento en la síntesis de HIF-1 α , cerrando así un círculo potencialmente crucial para el desarrollo tumoral.

Como hemos comentado previamente, la heterodimerización de HIF-1 α con HIF- β , contribuye a la estabilización del primero, haciéndolo más resistente a la digestión proteolítica. En esta línea, la activación de la ruta PI3K/AKT, no sólo conlleva, como ya hemos visto, un aumento de la síntesis de HIF-1 α , sino que AKT puede fosforilar HIF- β , incrementando así su afinidad por HIF-1 α y por lo tanto aumentando su actividad transcripcional.

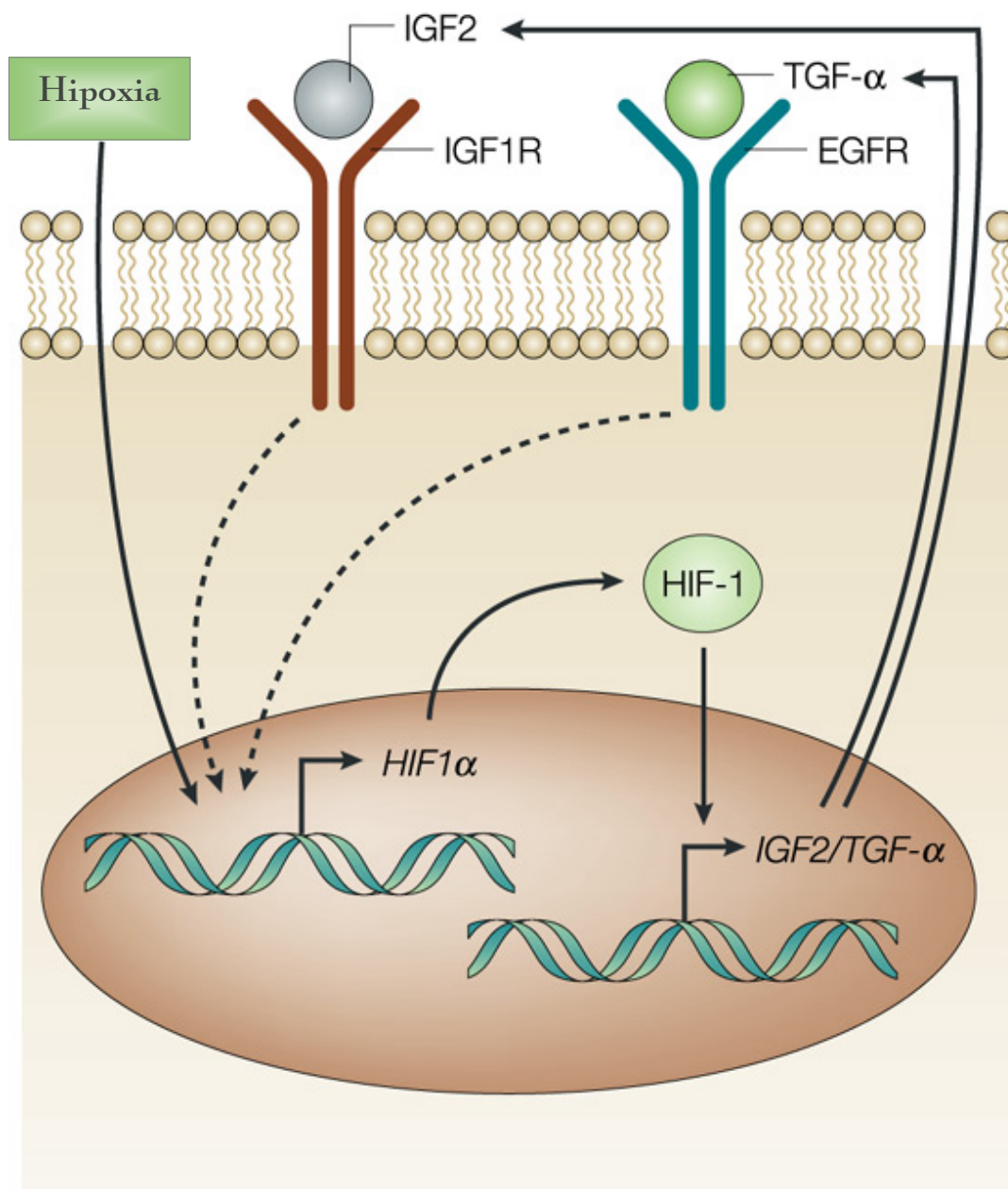


Figura 4. Regulación autocrina de HIF-1 α . En condiciones de hipoxia, el incremento de HIF-1 tiene como consecuencia la transcripción de varios genes, entre los que se encuentran IGF-2 o TGF- α , genes cuya actividad conduce a un aumento de la traducción de HIF-1 α , contribuyendo así al aumento de la concentración intracelular de HIF-1 α (modificado de Nat Rev Cancer 2003;3:721-32).

1.4.2. Regulación dependiente de la concentración intracelular de oxígeno

La disminución de la concentración de oxígeno en el interior de las células induce una respuesta adaptativa a la nueva situación, mediada fundamentalmente por la actividad transcripcional de HIF. El aumento de la concentración de HIF- α que se produce en condiciones de hipoxia depende de un mecanismo de regulación post-traduccional. Esta regulación dependiente de la oxigenación tisular se basa principalmente en la hidroxilación de residuos concretos de prolina y asparragina, tanto en HIF-1 α como en HIF-2 α . Tres prolin hidroxilasas, conocidas como HPH 1, 2, 3 (ó PHD 3, 2, 1, respectivamente) resultan fundamentales en este proceso de regulación post-traduccional^{76,77,78}. Estas enzimas son responsables de catalizar la reacción por la cual, en presencia de oxígeno molecular, ión ferroso y α -cetoglutarato, HIF-1 α es hidroxilado en sus residuos de prolina 402 y 564 (localizados en el dominio ODD), en la misma reacción en la que se genera succinato (Figura 5).

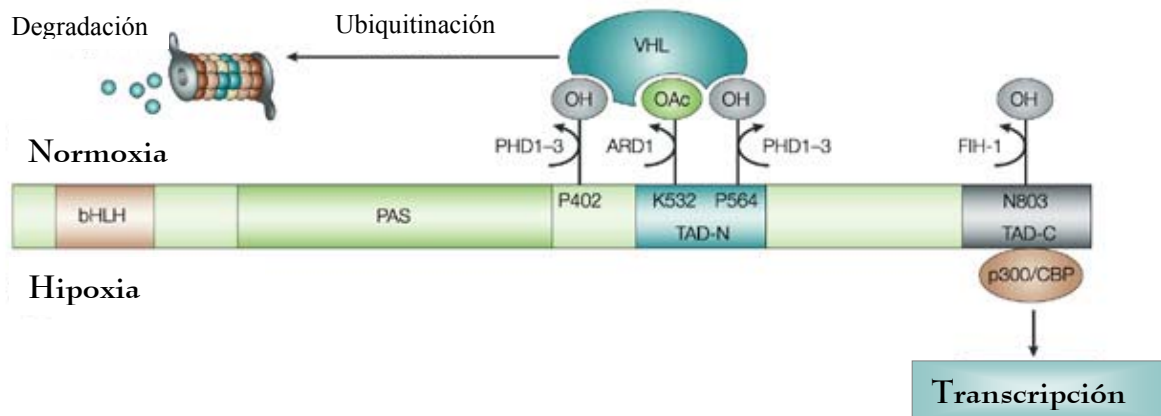


Figura 5. Regulación dependiente del oxígeno de HIF-1 α . Se muestra el mecanismo de regulación post-traduccional dependiente de oxígeno. La actividad de las PHD's en normoxia conduce a la hidroxilación de las prolinas 402 y 564 de HIF-1 α , lo que marca a la proteína para su interacción con VHL y su ubiquitinización y posterior degradación en el proteasoma. Esta interacción proteína-proteína se incrementa por acción de la acetilasa ARD1 que acetila la lisina en posición 532. En hipoxia la inhibición de la actividad asparraginil hidroxilasa de FIH-1 bloquea la hidroxilación, que del residuo de asparragina 803, lo que permite la interacción de HIF-1 α con el coactivador de la transcripción p300/CBP.

HIF-1 α así hidroxilado interacciona, mediante la formación de puentes de hidrógeno, con la proteína von Hippel-Lindau (VHL)^{79,80,81,82} la cual forma parte, junto con ELB, ELC, CUL2 y RBX1, de un complejo proteico (E3 ubiquitin-proteín ligasa) responsable de la ubiquitinización de HIF-1 α y por tanto de su degradación en el proteasoma de 26S^{83,84}.

En condiciones fisiológicas, el oxígeno molecular actúa como sustrato limitante de esta reacción de hidroxilación, proporcionando así un mecanismo dependiente de oxígeno para la regulación de los niveles de HIF-1 α ^{85,86}. En hipoxia, la falta de sustrato disminuye la actividad de las PHD's, con lo cual HIF-1 α permanece estable, pudiendo así transcribir sus genes diana. La hipoxia, no sólo es capaz de impedir la actividad enzimática de las PHD's debido a la falta de sustrato, sino que a través del complejo E3-ligasa Siah2⁸⁷ disminuye las concentraciones intracelulares de las PHD's, reduciendo así la modificación post-transcripcional de HIF-1 α . La actividad de las PHD's y su respuesta a la hipoxia va a ser distinta según el tipo celular concreto que estemos estudiando. La gran plasticidad y capacidad adaptativa de este sistema se ve incrementada por la posibilidad de llevar a cabo una maduración diferencial del ARN mensajero de las PHD's⁸⁸, dando lugar, a partir de un mismo gen, a proteínas diferentes.

La acetilación de HIF-1 α en la lisina 532 por la acetiltransferasa ARD1, parece aumentar su afinidad por la proteína de VHL favoreciendo así su ubiquitinización y posterior degradación⁸⁹. Sin embargo, estudios recientes han cuestionado estos datos, poniendo en entredicho el papel de ARD1 en la regulación post-traducciona de HIF-1 α ⁹⁰.

En condiciones de adecuada oxigenación celular otra proteína contribuye al bloqueo funcional de HIF-1 α , se trata de FIH-1⁹¹. En presencia de oxígeno, FIH-1 hidroxila a HIF-1 α en el residuo de asparragina localizado en la posición 803 (el cual forma parte del dominio TAD-C). El factor limitante de esta hidroxilación es de nuevo el oxígeno molecular. Así, en normoxia la asparragina 803 se encuentra hidroxilada, quedando bloqueada la interacción de HIF-1 α con sus co-activadores p300 y CBP^{92,93,94} (Figura 5). Esta interacción es necesaria para que HIF-1 α pueda llevar a cabo de una manera adecuada su actividad transcripcional.

Recientemente, Baek y colaboradores⁹⁵ han implicado una nueva proteína, denominada OS-9, en el proceso de regulación post-transcripcional de HIF-1 α . Este hallazgo contribuye a aportar luz sobre la gran complejidad de los mecanismos implicados en la regulación de HIF-1 α , añadiendo nuevas proteínas a las ya conocidas PHD's, FIH, ARD1, pVHL, proto-oncogenes y genes supresores de tumores, dando lugar así a un amplio

repertorio de mecanismos, capaces de modificar los umbrales de respuesta celular a los cambios en las presiones parciales de oxígeno. OS-9 es una proteína identificada en 1996⁹⁶ que se expresa de forma ubicua en nuestros tejidos y cuyas funciones siguen siendo desconocidas. Baek y colaboradores han demostrado que OS-9 es capaz de formar un complejo proteico con HIF-1 α , y PHD2 ó PHD3, promoviendo la hidroxilación de HIF y por lo tanto su degradación. Curiosamente, OS-9 se ha encontrado sobre-expresado en células tumorales, dato que contrasta con la característica sobre-expresión de HIF-1 α de múltiples tumores humanos. OS-9 podría también jugar un importante papel en el transporte intracelular de HIF-1 α , pues trabajos previos han implicado a OS-9 en el transporte de proteínas entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi⁹⁷.

Durante mucho tiempo se ha señalado a la mitocondria como orgánulo implicado en la regulación dependiente de oxígeno de HIF-1 α . En condiciones de hipoxia, en la mitocondria se produce un aumento en la génesis de radicales libres del oxígeno, los cuales serían capaces de estabilizar HIF-1 α ⁹⁸. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que el α -cetoglutarato, uno de los sustratos de la reacción en la cual HIF-1 α es hidroxilado por las PHD, es sintetizado a nivel mitocondrial. El papel de la mitocondria como mediadora de la respuesta celular a la hipoxia, controvertido durante largo tiempo^{99,100}, parece haber sido recientemente confirmado^{101,102,103}. Así pues, la mitocondria actuaría como sensor intracelular de los niveles de oxígeno y mediante la generación y posterior liberación hacia el citosol de radicales libres del oxígeno, contribuiría a la estabilización tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α .

Recientemente, una nueva molécula se ha añadido a la ya compleja lista de proteínas implicadas en la regulación dependiente de oxígeno de HIF-1 α , se trata del óxido nítrico. Esta molécula es capaz de favorecer la acumulación de HIF-1 α en normoxia, al tiempo que promueve su degradación en condiciones de hipoxia. Elevadas concentraciones de óxido nítrico tienen como consecuencia la estabilización de HIF-1 α , independientemente de la concentración de oxígeno molecular a la que una célula se vea expuesta. Esta estabilización parece estar mediada por una acumulación de radicales libres¹⁰⁴. Por el contrario, en hipoxia, la presencia de óxido nítrico tiene como consecuencia un aumento en la actividad de las PHD's, pues el óxido nítrico inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que conlleva un aumento en la disponibilidad de los sustratos necesarios para la hidroxilación de HIF-1 α (oxígeno molecular, ión ferroso y α -cetoglutarato)¹⁰⁵. Por lo tanto, la acumulación de óxido nítrico en hipoxia aumentaría la actividad de las PHD's, las cuales marcarían a HIF-1 α

para su degradación en el proteasoma independientemente del entorno hipóxico. Así, una célula sometida a condiciones de hipoxia no siempre ha de sobre-expresar HIF, pues la presencia de moléculas como el óxido nítrico pueden hacer que esta proteína sea digerida en el proteasoma.

1.5. Función de HIF-1 α en el desarrollo de los distintos tumores humanos

Los distintos tipos de tumores tienen su origen en un proceso en el cual sucesivos cambios genéticos y epigenéticos confieren, a las células que los sufren, ventajas que les permiten convertirse en las progenitoras de una población celular que acabará por dominar la masa tumoral. Entre las mutaciones ventajosas se encuentran aquellas que confieren a la célula la capacidad de ignorar las señales inhibitorias del crecimiento celular, las que les permiten adquirir de una forma constitutiva señales mitogénicas, así como las mutaciones que dotan a las células con las capacidades para evitar la apoptosis y para inducir la angiogénesis¹⁰⁶.

El factor de transcripción HIF-1 α , además de desempeñar una función esencial en la respuesta fisiológica a la hipoxia, parece ser una molécula clave en la fisiopatología tumoral. Cuatro líneas de evidencia sugieren que HIF-1 α puede desempeñar un papel importante en la progresión de los distintos tipos tumorales. En primer lugar, los estudios mediante inmunohistoquímica indican que HIF-1 α se encuentra sobre-expresado en las células tumorales, y en algunos tipos de cáncer el grado de sobre-expresión se ha correlacionado con la angiogénesis intratumoral y con la supervivencia de los pacientes (Tabla 3). En segundo lugar, HIF-1 α puede aumentar su concentración intracelular no sólo por el efecto de la hipoxia, sino también como consecuencia de mutaciones en genes supresores de tumores y en proto-oncogenes (Tabla 2). En tercer lugar, en los experimentos llevados a cabo con xenoinjertos murinos, las manipulaciones genéticas que aumentan o disminuyen la actividad de HIF-1 α conllevan, respectivamente, un aumento o una disminución del crecimiento tumoral y de la angiogénesis^{62,138,139,140,141,142,143,144}. Y por último, el conjunto de genes transcritos por HIF-1 α , teóricamente, posee el potencial para favorecer la progresión tumoral (Figura 1).

Tabla 3. Tumores en los cuales se ha demostrado un aumento de la expresión de HIF-1 α .

Tipo tumoral	Evolución clínica	Referencias
Cérvix (estadios iniciales)	Aumento de la mortalidad	107
Cérvix (tratado con radioterapia)	Aumento de la mortalidad	108,109
Pulmón (no de células pequeñas)	Disminución de la mortalidad	132
Pulmón (no de células pequeñas)	Aumento de la mortalidad	134
Mama (con metástasis ganglionares)	Aumento de la mortalidad	110
Mama (sin metástasis ganglionares)	Aumento de la mortalidad	111
Oligodendroglioma	Aumento de la mortalidad	112
Carcinoma renal	Aumento de la mortalidad	129
Ovario	Aumento de la mortalidad	137
Esófago	Aumento de la mortalidad	113,189
Endometrio	Aumento de la mortalidad	114
Vejiga	Aumento de la mortalidad	115,116
Colon	Aumento de la mortalidad	117
Recto	Aumento de la mortalidad	118
Tumores estromales del tracto gastrointestinal	Aumento de la mortalidad	119,120

Como hemos descrito previamente, la actividad transcripcional de HIF-1 (Figura 1) permitiría a los clones de células en las que ésta tuviera lugar la adquisición de ventajas, en términos de proliferación y supervivencia^{31,32,33}. La selección positiva de estos clones contribuiría a la génesis de tumores más agresivos y con un peor pronóstico vital. Estos clones celulares capaces de sobre-expresar HIF-1 α , también parecen poseer el potencial de ser más resistentes a los tratamientos convencionales, pues HIF-1 regularía la expresión de genes cuyos productos son necesarios para la reparación de las roturas de doble hélice inducidas en el ADN, tanto por la radioterapia como por la quimioterapia¹²¹.

Lo expuesto hasta ahora convertiría a HIF-1 α en el equivalente a un proto-oncogén, pues su activación favorecería el desarrollo tumoral. Sin embargo, publicaciones recientes suscitan dudas sobre este papel de HIF-1 α . Como hemos visto, HIF-1 es capaz de transcribir una gran variedad de genes y éstos serán distintos según el tipo celular concreto que se vea sometido a un entorno hipóxico. Por otro lado, su papel en la respuesta de las células tumorales a la radioterapia es más complejo de lo que previamente había sido anticipado. Así, si bien la sobre-expresión de HIF-1 α conlleva un aumento de la resistencia a la radioterapia, probablemente a través de la estimulación de la supervivencia de las células endoteliales, esta misma sobre-expresión es capaz de tener una acción radiosensibilizante, mediante sus efectos en la proliferación celular y el metabolismo del ATP¹²². En esta línea, HIF-1 α también puede actuar como un gen supresor de tumores, pues posee la capacidad de inhibir al oncogen Myc. La inhibición de Myc conlleva la transcripción de p21^{35,123}, proteína que junto con p16 detiene el ciclo celular durante la fase G1. Por otro lado, la inhibición de Myc impide la transcripción de varios proto-oncogenes como hTERT o BRCA1.

El esclarecimiento del papel de HIF-1 α en el desarrollo tumoral se ve dificultado, no sólo por sus efectos aparentemente contradictorios sobre la proliferación celular, sino también por su acción dual sobre la capacidad apoptótica de las diversas estirpes celulares. Como ya pusimos previamente de manifiesto, e incidiremos más adelante, HIF-1 α es capaz de inducir la apoptosis o de inhibirla, en función del tumor concreto que estemos estudiando.

Todos estos datos ponen de manifiesto el ambivalente papel de HIF-1 α en la biología tumoral, pues posee el potencial, tanto para detener el ciclo celular e inducir apoptosis, como para favorecer el crecimiento y la proliferación de las células tumorales e inhibir la muerte celular programada.

1.5.1. Correlaciones clínico-patológicas en los distintos tumores humanos

En estudios realizados mediante inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales, HIF-1 α se ha encontrado sobre-expresado en múltiples tipos de cáncer con respecto a los correspondientes tejidos normales, entre ellos tumores de piel, cerebro, pulmón, estómago, páncreas, colon, mama, ovario, próstata, vejiga y riñón^{124,125}. Además, en tumores

de localizaciones tan diversas como la mama, el cérvix uterino, el ovario, el endometrio, la vejiga, el esófago, el colon y el recto, los tumores estromales del tracto gastrointestinal o el cerebro (oligodendrogliomas), una mayor expresión de HIF-1 α en el tumor se asoció a una menor supervivencia (Tabla 3).

En el cáncer de mama, los niveles de HIF-1 α se encuentran aumentados en el carcinoma ductal “in situ”, y están asociados con un aumento de la microvascularización^{126,127}, lo que indica que HIF-1 α , debe jugar un papel importante en los estadios iniciales de este tumor. Además, su sobre-expresión en el cáncer de mama se ha asociado con un peor pronóstico¹²⁸.

Del mismo modo, el aumento de actividad de HIF-1 α en el carcinoma renal, parece ser un evento que ocurre en las fases más iniciales del desarrollo neoplásico¹²⁹, jugando un papel fundamental en la progresión tumoral y quizás determinando, desde los primeros momentos, una mayor predisposición para el desarrollo de metástasis. Sin embargo, dependiendo del subtipo de carcinoma renal, los niveles de expresión de HIF-1 α y su correlación con el pronóstico varían¹³⁰.

En el caso de los carcinomas epidermoides de pulmón y en los de cabeza y cuello los resultados son controvertidos. Algunos estudios han asociado la sobre-expresión de HIF-1 α en estos tumores con un mejor pronóstico vital^{131,132,133}, mientras que otros la han asociado con una menor supervivencia^{134,135,136}. Estudios realizados mediante inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de ovario¹³⁷ y de vejiga^{115,118} han intentado aportar luz ante esta aparente contradicción. Así, en aquellos casos en los cuales la sobre-expresión de HIF-1 α se asociaba con un índice apoptótico elevado, HIF-1 α se correlacionaba con una mayor supervivencia, mientras que en aquellos casos en los cuales la sobre-expresión de HIF-1 α se asociaba con mutaciones en p53 y bajos niveles de apoptosis, HIF-1 α se correlacionaba de una manera estadísticamente significativa con un peor pronóstico. Así pues, parece que las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α dependen tanto del tipo de tumor (no en vano, como hemos visto previamente, en condiciones normales, el conjunto de genes que transcribe, depende del tipo celular en el que se exprese), como del conjunto de mutaciones y cambios epigenéticos adquiridos por el tumor concreto que estamos evaluando. Estas alteraciones serán las responsables de que HIF-1 α promueva la muerte celular programada o la inhiba, o de que se comporte como un oncogen o como un gen supresor de tumores.

1.5.2. Actividad de HIF-1 α en distintas líneas celulares tumorales

Para intentar dilucidar qué papel juega HIF-1 α en la carcinogénesis se han llevado a cabo múltiples experimentos mediante la manipulación de líneas celulares y su posterior inyección en ratones inmunodeficientes.

Las primeras líneas celulares utilizadas fueron derivadas de hepatomas murinos (Hepa1). Mediante la inyección en ratones de un subclon de esta línea deficiente en HIF-1 β (denominado c4), y mutantes espontáneos del mismo (en los cuales la función de HIF-1 β se había restablecido), se comprobó que los tumores inducidos por c4 crecían menos, tenían una menor vascularización y mayores áreas necróticas que los inducidos por la cepa nativa Hepa1. Sin embargo, los mutantes espontáneos, que habían recuperado la actividad transcripcional de HIF-1, presentaban un desarrollo similar a los tumores inducidos por Hepa1^{62,138}.

Experimentos llevados a cabo en ratones inmunodeficientes, mediante la inoculación en el tejido celular subcutáneo de líneas celulares derivadas de distintos tumores humanos (cáncer de colon^{139,140}, páncreas^{141, 142}, mama o riñón^{143,144}) han puesto de manifiesto que un incremento en los niveles de HIF-1 α o de HIF-2 α se asocia con un mayor desarrollo tumoral. Por el contrario, la inhibición de la actividad de HIF-1 disminuye de una forma notable el crecimiento del tumor. Sin embargo, como ocurría con los estudios de inmunohistoquímica en tumores humanos, los ensayos con xeno-injertos nos llevan también a la conclusión de que las consecuencias del incremento en la actividad de HIF-1 son específicas de cada tipo celular. Mientras que en las líneas derivadas de tumores de colon el aumento de los niveles de HIF-1 α se correlaciona con una mayor angiogénesis, en las derivadas de tumores pancreáticos esta correlación no existe. En estas últimas, el crecimiento tumoral parece estar favorecido, más que por un incremento de la vascularización, por la adaptación metabólica a un entorno falto de oxígeno, adaptación que sería la responsable de evitar que las células tumorales sometidas a este entorno entraran en apoptosis.

Recientes estudios *in vitro* con líneas celulares corroboran los resultados previamente descritos *in vivo*. Dependiendo de la línea celular analizada, HIF-1 es capaz de inhibir la apoptosis o de inducirla (estabilizando p53^{145,146}, o transcribiendo BNIP3, gen que codifica un miembro pro-apoptótico de la familia BCL2, cuyo promotor contiene una secuencia

HRE^{45, 147}). En aquellas líneas celulares en las que HIF-1 α promueve la apoptosis, son necesarias mutaciones adicionales que inactiven p53 o aumenten la expresión de BCL2 para que HIF-1 α pueda favorecer el desarrollo tumoral. Así, en condiciones de hipoxia, el aumento de actividad de HIF-1 α conlleva, en determinados tipos celulares, un aumento de la apoptosis, seleccionando aquellos clones en los cuales las rutas que llevan a la muerte celular programada estén interrumpidas^{148,149}.

Pero las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α no sólo difieren entre los diferentes tipos de tumores, sino que en líneas celulares diferentes, derivadas de una misma estirpe celular, las consecuencias de su sobre-expresión serán distintas. Estudios *in vitro* con líneas celulares derivadas de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, recientemente publicados, así lo ponen de manifiesto^{75,150}. Cuando estas líneas celulares son sometidas a condiciones de hipoxia se puede demostrar la estabilización y acumulación intranuclear de HIF-1 α . Sin embargo, dependiendo de la línea celular estudiada, los niveles del ARN mensajero de HIF-1 α aumentan o disminuyen, los genes transcritos varían, y mientras que en unas líneas se induce apoptosis, en otras esta se ve inhibida^{75, 150}.

1.5.3. HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Hasta el momento, los distintos estudios que han pretendido correlacionar la expresión de HIF-1 α , en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, con diversos parámetros clínicos, como son la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, o la presencia de recidivas, han aportado resultados contradictorios^{131,133,135,136,151}. Mientras que Koukourakis y colaboradores y Aebersold y colaboradores describen una menor supervivencia en el grupo de pacientes cuyos tumores sobre-expresan HIF-1 α , tanto Beasley y colaboradores, como Fillies y colaboradores publican resultados opuestos, pues cuanto mayor es la expresión de HIF-1 α , mejor es el pronóstico de la enfermedad. Entre los aparentemente contradictorios resultados previamente expuestos, se encuentra el trabajo publicado por Kyzas y colaboradores, en el cual no han podido encontrar correlación entre la expresión de HIF-1 α y el pronóstico de sus pacientes. Es importante destacar que los pacientes del estudio de Koukourakis se trataron mediante quimioterapia y radioterapia, en el

estudio de Aebersold el tratamiento elegido fue la radioterapia, mientras que en los trabajos de Kyzas, Beasley y Fillies la cirugía fue el tratamiento de elección.

Como han puesto de manifiesto los experimentos con líneas celulares derivadas de estos carcinomas, expuestos en el apartado anterior, HIF-1 α es capaz de inducir la expresión tanto de genes capaces de detener el ciclo celular y promover la apoptosis, como de genes que estimulan la proliferación y la invasividad celular, la angiogénesis o incluso otros que permiten a la célula sobrevivir en presencia de estímulos pro-apoptóticos. Este hecho hace que las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α varíen según el tipo de tumor en el que ésta tenga lugar, y según el conjunto de cambios genéticos y epigenéticos que el tumor haya adquirido. Más aún, como hemos visto, probablemente las consecuencias de esta sobre-expresión también varíen en función de la opción terapéutica elegida para el tratamiento del tumor.

La aparente contradicción en los resultados de los diferentes trabajos que han pretendido evaluar el papel de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello puede justificarse, no sólo por las distintas modalidades terapéuticas empleadas en cada uno de los estudios, sino también porque bajo el epígrafe de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello se engloban tumores originados en localizaciones tan diversas como la cavidad oral, la faringe o la laringe. Es un hecho conocido que las diferentes localizaciones anatómicas, no sólo se asocian con factores etiológicos distintos y conllevan pronósticos diferentes, sino que también presentan diferentes alteraciones moleculares^{152,153,154,155}. Los trabajos previamente citados pretenden estudiar la expresión de HIF-1 α mediante la evaluación conjunta de carcinomas originados en el labio, el suelo de la boca, la orofaringe, la hipofaringe o la laringe. Intentar extraer conclusiones sobre el papel de HIF-1 α a partir de una serie de casos tan heterogénea va a llevarnos inevitablemente a un conjunto de resultados contradictorios y de difícil interpretación.

Así pues, el papel que HIF-1 α juega en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello es aún incierto y su conocimiento contribuiría no sólo a un mejor entendimiento de la biología tumoral, sino a abrir nuevas vías para la obtención de marcadores pronósticos y de potenciales dianas terapéuticas, para un grupo de tumores en el cual, a pesar de los avances en las distintas modalidades de tratamiento disponibles, el pronóstico apenas ha mejorado en los últimos 50 años¹⁵⁶.

1.6. HIF-1 α como objetivo de los futuros tratamientos contra el cáncer

La identificación de las alteraciones genéticas que ocurren durante las diferentes fases del desarrollo tumoral provee una aproximación para la búsqueda de tratamientos contra el cáncer más eficaces y menos tóxicos que los empleados en la actualidad. Datos clínicos y experimentales parecen otorgar al aumento de la actividad de HIF-1 α un papel importante en la selección clonal y en la consiguiente progresión tumoral.

En la actualidad se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos, en los cuales distintos fármacos están siendo probados, como agentes antitumorales, basándose en sus propiedades para inhibir la angiogénesis^{157,158}. Un problema de estos tratamientos es el hecho de que la inhibición de la angiogénesis pudiera seleccionar a aquellas células adaptadas a un entorno hipóxico. Como ya ha sido puesto de manifiesto de forma reiterada en múltiples trabajos, las células sometidas a un ambiente hipóxico presentan una mayor resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia, así como un mayor potencial para la invasión y generación de metástasis^{4,6}. Teniendo en cuenta estos datos, parece lógico pensar que la asociación de inhibidores de la angiogénesis junto con inhibidores de HIF-1 podría suponer una buena aproximación terapéutica en la lucha antitumoral. Hasta el momento se han identificado múltiples agentes capaces, por distintos mecanismos, de inhibir la actividad de HIF-1 (Tabla 4)^{31,159}.

Todos los fármacos expuestos en la Tabla 4 son capaces de disminuir *in vitro* los niveles de HIF-1 α y de inhibir la expresión de VEGF y de otros genes diana de HIF-1. En experimentos realizados *in vivo*, estos fármacos disminuyen el crecimiento y la vascularización de los xeno-injertos inoculados en los distintos modelos murinos. Sin embargo, ninguno de estos fármacos tiene la capacidad de actuar exclusivamente sobre HIF-1 α . Esta falta de selectividad dificulta la correlación de las respuestas clínicas con las moleculares, pues sus efectos no se pueden atribuir exclusivamente a la inhibición de HIF-1 α . Recientemente, el interés despertado por HIF en diversos grupos de trabajo ha tenido como consecuencia el descubrimiento de inhibidores específicos de HIF-1 α ^{160,161,162,163,164,165}. Sin embargo, estas moléculas se encuentran aún en las fases iniciales de su desarrollo y están aún lejos de ser evaluadas en ensayos clínicos.

Tabla 4. Fármacos inhibidores de HIF-1 α .

Fármaco	Diana molecular	Fase desarrollo
Inhibidores de las cascadas de transducción de señales		
BAY 43-9006	RAF kinasa	Ensayo clínico
CCI-779	mTOR	Ensayo clínico
Celebrex	COX2	Ensayo clínico
PD98059	MEK	No apto para uso clínico
Transtuzumab (Herceptin)	Receptor tirosin-kinasa ERBB2	Aprobado su uso clínico
ZD-1839 (Iressa), OSI-774	EGFR tirosin-kinasa	Ensayo clínico
Imatinib (Glivec)	BCR-ABL, PDGFR tirosin-kinasas	Aprobado su uso clínico
Pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad de HIF-1α		
2ME2	Polimerización de los microtubulos	Ensayo clínico
17-AAG	HSP90	Ensayo clínico
Camptothecin, Topotecan	Topoisomerasa I	Aprobado su uso clínico
Pleurotin, 1-metilpropil-2-imidazolildisulfito	Tioredoxina 1	No apto para uso clínico
YC-1	Desconocida	No apto para uso clínico

Ante esta situación es fundamental recordar que la prudencia ha de guiar el desarrollo de estos ensayos clínicos, pues como hemos expuesto previamente de forma reiterada, HIF-1 α puede comportarse tanto como un gen supresor de tumores como un proto-oncogen. Experiencias previas con otras moléculas de complejidad similar, como es el caso de las metaloproteinasas¹⁶⁶, han de ponernos sobre aviso para evitar caer en los mismos errores, pues la introducción de fármacos en ensayos clínicos, antes de conocer en profundidad el papel de sus dianas terapéuticas, sólo puede conducir a la acumulación de resultados decepcionantes.

Otro factor a tener en cuenta es la especificidad del inhibidor objeto de estudio por las distintas isoformas de HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α), pues como hemos visto, estas

presentan actividades diferentes y en ocasiones efectos opuestos sobre el desarrollo tumoral^{42,45,167}.

1.6.1. Potenciales aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de HIF-1 α

La buena selección de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos resulta fundamental para la extracción de conclusiones correctas de los mismos.

Los pacientes afectos de carcinomas renales de células claras parecen ser unos buenos candidatos para el uso de inhibidores de HIF-1 α , pues, como se ha indicado previamente, en la mayoría de los tumores primarios HIF-1 α está sobre-expresado, y lo está desde los estadios más iniciales del desarrollo neoplásico. Además, existen numerosos estudios que coinciden en demostrar que HIF-1 α desempeña un papel clave en la fisiopatología de este tumor^{124,125,129}. La administración de inhibidores de HIF-1 α , asociada a inhibidores de tirosín-quinasas, capaces de bloquear las rutas de los receptores PDGFR y EGFR (cuyos ligandos son genes sustrato de HIF-1 y su activación conlleva a su vez un aumento de la traducción de HIF-1 α) constituiría un potencial régimen terapéutico para esta enfermedad. Sin embargo, un trabajo reciente con líneas celulares derivadas de carcinomas renales de células claras, nos invita de nuevo a la prudencia, pues mientras que la sobre-expresión de HIF-2 α favorecía el desarrollo tumoral, la de HIF-1 α conducía a un aumento de la apoptosis, y por lo tanto, a una ralentización del crecimiento tumoral en los ratones inoculados con las citadas líneas.

Otro tumor, con un comportamiento muy agresivo, que podría beneficiarse de estos nuevos tratamientos sería el glioblastoma multiforme. En los gliomas existe una fuerte correlación entre la expresión de HIF-1 α , el grado tumoral y su vascularización¹⁶⁸. Estos son tumores muy vascularizados y se caracterizan histológicamente por presentar áreas de necrosis, rodeadas de células con una típica disposición en empalizada, las cuales expresan altos niveles de HIF-1 α . Esta sobre-expresión también aparece en las células que conforman la primera línea de invasión tumoral. Así pues, en estos pacientes el uso de inhibidores de HIF-1 α asociado a inhibidores de la angiogénesis y/o a inhibidores de tirosín-quinasas podría contribuir al control de la enfermedad. Del mismo modo que ocurría en el caso de los carcinomas renales, la prudencia ha de guiar estas nuevas aproximaciones terapéuticas.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que, si bien la inhibición de HIF-1 α es capaz de frenar, en modelos murinos heterotópicos, el desarrollo de estos tumores¹⁶⁹, la inhibición de la expresión de HIF-2 α en gliomas tiene como consecuencia una estimulación del desarrollo tumoral, a pesar de disminuir su vascularización. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por una pérdida de la capacidad apoptótica de las células tumorales. Así, la selectividad por las distintas isoformas de HIF- α del inhibidor empleado se muestra una vez más fundamental para el desarrollo de fármacos eficaces.

Los tumores de ovario en los cuales la sobre-expresión de HIF-1 α se encontrara asociada con mutaciones en p53 constituirían otro subgrupo de neoplasias candidatas a ser tratadas con inhibidores de HIF-1 α .

En los pacientes con carcinomas de orofaringe, la sobre-expresión de HIF-1 α ha sido asociada por algunos autores^{135,136} a una mayor mortalidad, así como con un incremento de su resistencia a la radioterapia, independientemente del grado histológico o del estadio. Incluso, la sobre-expresión de HIF-1 α en el primario se ha correlacionado, de una manera estadísticamente significativa, con una mayor resistencia a la radioterapia de las metástasis ganglionares. Estos estudios han permitido que algunos autores hayan propuesto que los pacientes afectados de carcinomas orofaríngeos podrían ser candidatos a beneficiarse de tratamientos cuyo objetivo fuera HIF-1 α . Sin embargo, como se ha especificado en anteriores apartados del presente trabajo, estos resultados no han podido ser reproducidos. Por lo tanto, el papel de HIF-1 α en los carcinomas de orofaringe en particular, y en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello en general, sigue siendo un tema controvertido, objeto de debate.

1.6.2. Terapia génica y HIF-1 α

Una de las grandes limitaciones de la terapia génica como tratamiento del cáncer es la dificultad para actuar de forma selectiva sobre las células tumorales sin afectar los tejidos sanos del paciente. Puesto que HIF-1 α se encuentra sobre-expresado en una gran variedad de tumores humanos, y no en los tejidos sanos adyacentes^{124,125}, la utilización de genes con propiedades terapéuticas, ligados a promotores reconocidos por HIF-1 (mediante la inclusión

en ellos de las secuencias HRE) conllevaría la expresión de estos genes exclusivamente en las células tumorales. Ya se han desarrollado promotores eficaces mediante el uso de secuencias HRE obtenidas a partir de genes sustrato de HIF-1^{170, 171, 172}. De este modo, la expresión de un enzima que no se encuentra habitualmente en el cuerpo humano (la citosina desaminasa de *E. coli*, o la timidin kinasa del virus herpes simple) podría, mediante el control de un promotor reconocido por HIF-1, transformar un compuesto inocuo en un producto tóxico, exclusivamente en las células tumorales^{171, 173}. La utilidad de este planteamiento se ve apoyada por experimentos *in vivo*, donde mediante el uso de adenovirus como vectores se introducen en las células del animal enzimas (timidina kinasa del virus herpes simple, citocromo humano P450), en cuyos promotores se incluyen secuencias reconocidas por HIF-1. Tras la administración del pro-fármaco correspondiente (ganciclovir, ciclofosfamida), se logra una disminución significativa del crecimiento tumoral, con una mínima toxicidad sobre los tejidos normales del animal^{171, 174}. Otra opción consiste en emplear adenovirus citotóxicos mutantes carentes de un gen esencial para su replicación, denominado E1B55. En los virus mutantes este gen se encuentra bajo el control de un promotor dependiente de HIF-1 (pues incluye secuencias HRE). La manipulación de este gen permite por lo tanto la replicación del virus de forma selectiva en las células que sobre-expresen HIF-1, con el consiguiente efecto letal para las mismas.

OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es contribuir a desentrañar el significado pronóstico de la expresión del HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, pues en el momento actual su papel en estos tumores sigue siendo objeto de debate. Sus potenciales aplicaciones como factor pronóstico, y sobre todo, la posibilidad de añadir sus inhibidores al arsenal terapéutico empleado para el tratamiento de este grupo de pacientes hacen necesario aclarar el papel que esta proteína desempeña en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

Para conocer las implicaciones que la expresión de HIF-1 α tiene en el pronóstico de estos carcinomas pretendemos desarrollar los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de HIF-1 α en carcinomas epidermoides supraglóticos procedentes de pacientes tratados quirúrgicamente, así como en las metástasis ganglionares originadas en los mismos y en los tejidos sanos adyacentes al tumor.
2. Determinar el grado de vascularización de los carcinomas epidermoides supraglóticos, y establecer su correlación con el pronóstico de los pacientes y con la actividad de HIF-1 α .
3. Determinar el índice apoptótico de los carcinomas epidermoides supraglóticos, y su correlación con la expresión de p53 y HIF-1 α .
4. Analizar el valor pronóstico de la expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides supraglóticos, tanto de forma aislada, como en combinación con el resto de marcadores moleculares estudiados.
5. Desarrollar un modelo animal capaz de reproducir de un modo fidedigno el comportamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello para posteriormente, estudiar en él las consecuencias que la sobreexpresión de HIF-1 α tiene sobre la génesis y progresión tumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras biológicas

Se realizó un análisis retrospectivo de 116 pacientes con carcinomas epidermoides laríngeos de localización supraglótica procedentes de los archivos clínicos y patológicos del Hospital Universitario Central de Asturias y del Hospital Valle del Nalón. Todos los pacientes seleccionados son varones, dada la escasa proporción de casos de mujeres con este tipo de tumor en el área sanitaria, fumadores y consumidores habituales de alcohol. La edad media al diagnóstico fue de 62 años, con un intervalo entre 39 y 85 años. En todos los casos se trataba de tumores primarios que no habían recibido ningún tratamiento previo a la cirugía y que no presentaban metástasis hematógenas en el momento del diagnóstico. Todas las muestras incluían epitelio normal adyacente al tumor. En los tumores con metástasis ganglionares se obtuvo un fragmento representativo de las mismas, para su estudio junto con el tumor primario.

Los pacientes fueron tratados entre los años 1988 y 1994, con intención curativa, empleando para ello como tratamiento de elección la cirugía. La cirugía consistió en una resección completa del tumor, incluyendo un vaciamiento cervical ganglionar bilateral en el mismo acto quirúrgico, funcional o radical según el estudio clínico-radiológico previo y los hallazgos en el campo operatorio. En 55 pacientes se indicó tratamiento radioterápico complementario (47% de los casos). Como regla general, los criterios para la indicación de radioterapia complementaria fueron la presencia de metástasis ganglionares clasificadas en el estudio histopatológico como estadios N2 ó N3, y el diagnóstico de tumores clasificados como T4. Los pacientes se clasificaron, tras la resección quirúrgica del tumor y el estudio histopatológico de la pieza de resección y los vaciamientos cervicales, de acuerdo con el sistema TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (5ª edición). El grado histológico del tumor primario se determinó a partir de la pieza de resección definitiva siguiendo la clasificación de Broders. El seguimiento mínimo de los pacientes vivos al final del estudio fue de 5 años (media de 64,3 meses y mediana de 60 meses), registrando las recidivas locales y regionales, las metástasis a distancia, la aparición de segundos tumores primarios, las muertes a causa del tumor y las muertes por otras causas. El seguimiento medio de los pacientes fallecidos a causa del tumor fue de 21,6 meses (mediana de 14,5 meses), y de 34,3 meses

(mediana de 22 meses) para los pacientes fallecidos por otras causas. En el conjunto de pacientes el seguimiento medio fue de 47,6 meses (mediana de 47,5 meses).

Las características clínico-patológicas de los pacientes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los 116 pacientes estudiados.

Características clínico-patológicas	N	%
Clasificación T		
1	13	11%
2	44	38%
3	42	36%
4	17	15%
Clasificación N		
0	55	48%
1	23	20%
2	33	28%
3	5	4%
Estadio TNM		
I	8	7%
II	25	22%
III	36	31%
IV	47	40%
Grado histopatológico		
Bien diferenciado	53	46%
Moderadamente diferenciado	39	33%
Pobrementemente diferenciado	24	21%
Seguimiento		
Vivos en la última revisión	64	55%
Muertos por el tumor	30	30%
Muertos por otra causa	22	19%

Se trata de un grupo homogéneo y bien definido, en el que solamente se han incluido casos de carcinomas laríngeos de localización supraglótica pues, como hemos comentado previamente, bajo el epígrafe de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello se engloban tumores originados en localizaciones tan diversas como la cavidad oral, la faringe o la laringe. Con el fin de evitar los sesgos derivados de la inclusión de tumores de diferentes localizaciones, optamos por esta serie de casos, homogénea en cuanto a este parámetro. Por otro lado, la distribución por tamaño tumoral muestra una representación balanceada de los estadios T (57 casos T1-T2 y 59 casos T3-T4), al igual que la distribución del estadio N, con un número similar de pacientes con presencia (61 casos) y ausencia (55 casos) de metástasis linfáticas, y lo mismo ocurre con los casos de tumores bien diferenciados (53 pacientes) versus los casos de tumores moderada y pobremente diferenciados (63 pacientes).

3.2. Estudio inmunohistoquímico

Las piezas tumorales, fijadas en formol e incluidas en parafina, fueron cortadas previo control microscópico asegurando la presencia de tejido tumoral, en secciones de 4 μm y adheridas a portas siliconados (ChemMate, BioTEK Solutions, Santa Barbara, CA, USA). Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas en alcoholes de distinta graduación según el protocolo convencional. La recuperación antigénica se realizó calentando las secciones en tampón citrato a pH 6,0, durante 5 minutos en una olla a presión. Las tinciones se realizaron a temperatura ambiente en una estación de trabajo automatizada (Autostainer modelo LV-1, Labvision Corporation). Las muestras se mantuvieron durante 10 minutos en un medio bloqueante de la actividad peroxidasa endógena consistente en peróxido de hidrógeno al 3%, y posteriormente se expusieron a los distintos anticuerpos primarios.

La inmunodetección se realizó con el sistema EnVision+ (EnVision Plus, Dako, Carpinteria, CA, USA), añadiendo la solución PDE (polímeros de dextrano Envision) con la cual se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante media hora. El sistema EnvisionTM plus es una técnica de tinción en dos pasos.

En la primera fase se incuba la muestra con el anticuerpo primario. En una segunda fase se añade un polímero de alto peso molecular, el dextrano, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa de rábano (hasta 100 moléculas

por cadena) y de anticuerpo secundario (hasta 20 moléculas por cadena) (Figura 6). De este modo se consigue aumentar la sensibilidad del método y así es posible incrementar las diluciones de los anticuerpos primarios.

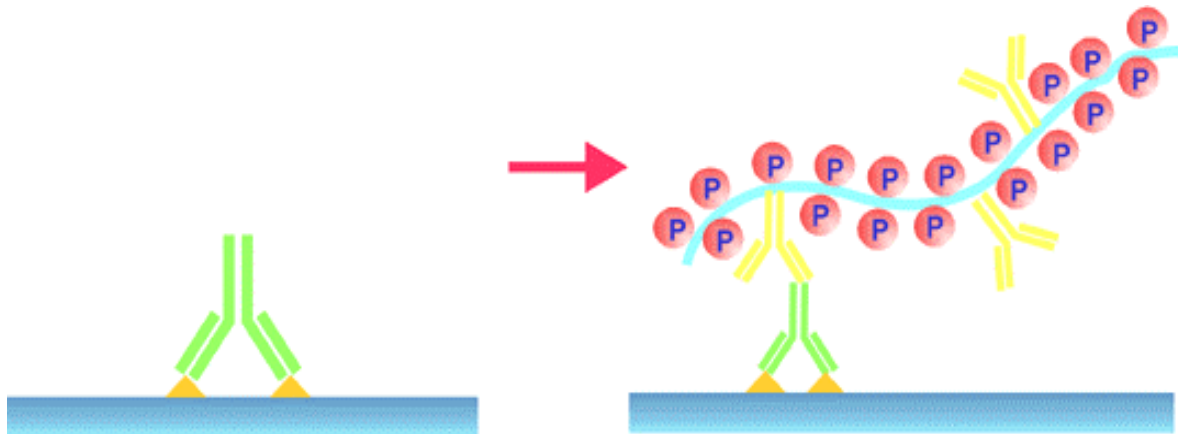


Figura 6. Representación esquemática del sistema de detección EnVision™+. Se representan el antígeno (amarillo oscuro), el anticuerpo primario (verde), el anticuerpo secundario (amarillo claro), el esqueleto de dextrano (azul), y la peroxidasa (rojo).

Como cromógeno se empleó la diaminobenzidina en un sustrato tamponado (Dako DAB+, Dako, Carpinteria, CA, USA). El último paso consistió en contrastar la preparación mediante hematoxilina de Harris durante un minuto. Tras la tinción las muestras fueron deshidratadas en diferentes alcoholes según el método convencional y montadas protegidas con un cubreobjetos empleando un medio estándar.

3.2.1. HIF-1 α

Para la inmunodetección de HIF-1 α se empleó un anticuerpo monoclonal IgG₁ anti HIF-1 α (Becton-Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA, USA) a una dilución 1:50. Las incubaciones con las muestras tumorales se realizaron a 4°C, durante 24 horas (Tabla 6).

Tabla 6. Se muestran los anticuerpos empleados en nuestro estudio con sus condiciones de reacción y los puntos de corte utilizados en cada uno de ellos para calificar los tumores como positivos o negativos.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo de incubación	Punto de corte
Anti HIF-1α	1:50	24 horas	10%
Anti p53	1:200	45 minutos	10%
Anti caspasa-3	1:200	24 horas	Mediana
Anti CD34	1:50	1 hora	Mediana

3.2.1.1. Caracterización del anticuerpo monoclonal IgG₁ anti-HIF-1 α

Con intención de confirmar la especificidad del anticuerpo anti-HIF-1 α empleado en los estudios de inmunohistoquímica, se realizaron western blots e inmunocitoquímicas de la línea celular comercial HeLa (derivada de un adenocarcinoma de cérvix) en normoxia e hipoxia. Las condiciones empleadas para la exposición a hipoxia de las células tumorales y los métodos aplicados para la realización del western blot corresponden con los descritos en las secciones 3.3.1.2.3 y 3.3.1.3, respectivamente. Para realizar la inmunocitoquímica se utilizaron las mismas condiciones empleadas en el estudio inmunohistoquímico.

3.2.1.2. Expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides supraglóticos

Las muestras tumorales fueron analizadas al azar, sin que el observador dispusiese de los datos clínicos. Se revisó toda la extensión del tumor y se consideraron como positivas todas aquellas células tumorales que presentaban inmunorreactividad nuclear. El porcentaje de células consideradas como HIF-1 α positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. El porcentaje de células que sobre-expresaban HIF-1 α variaba, entre las distintas muestras, desde menos del 10% del total, hasta más del 90%. Para simplificar el estudio estadístico, y de acuerdo con los estudios

previamente publicados^{136,151}, las muestras fueron divididas en dos grupos, aquellas en las cuales el porcentaje de células que sobre-expresaban HIF-1 α se encontraba entre el 0% y el 10%, consideradas como muestras negativas, y aquellas en las cuales más del 10% de las células tumorales lo sobre-expresaban, siendo éstas consideradas como muestras positivas.

Como controles negativos se emplearon algunas secciones de las mismas muestras a las cuales no se les añadió el anticuerpo anti-HIF-1 α . Este procedimiento se empleó también como control negativo en el resto de anticuerpos estudiados. Como control positivo utilizamos un carcinoma epidermoide glótico que presentaba una expresión de HIF-1 α , determinada mediante inmunohistoquímica, próxima al 100%.

3.2.2. p53

Para la detección de p53 empleamos un anticuerpo monoclonal anti-p53 (IgG_{2b}, clon DO-7, DakoCytomation, Carpinteria, USA). Este anticuerpo reconoce un epítipo ubicado entre los aminoácidos 35 y 45 del extremo amino-terminal de la proteína p53, tanto normal, como mutante¹⁷⁵. El tiempo de incubación fue de 45 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo se empleó una dilución de 1:200. El punto de corte seleccionado, basado en las publicaciones previas^{176,177,178}, y en nuestras propias observaciones, fue el 10%. Así, se consideraron como muestras positivas, aquellas en las que más del 10% de las células tumorales mostraban inmunorreactividad nuclear con nuestro anticuerpo, y negativas aquellas en las que menos del 10% de las células del tumor eran positivas (Tabla 6). Como control positivo empleamos muestras del mismo carcinoma utilizado como control positivo de HIF-1 α , pues también presentaba una elevada sobre-expresión de p53.

3.2.3. caspasa-3

La muerte celular programada o apoptosis se encuentra regulada por diversas rutas intracelulares, entre las que se incluyen factores de crecimiento, señales de adhesión intercelular o los mecanismos encargados de monitorizar la integridad del ADN. Existen

varios métodos para cuantificar el índice apoptótico, es decir, el porcentaje de células en apoptosis con respecto al total de células analizadas. Cada uno de estos métodos tiene sus propias limitaciones.

El empleo de anticuerpos capaces de reconocer caspasa-3 es un método sencillo, objetivo y reproducible para cuantificar el índice apoptótico de un determinado tejido^{179,180}. La aparición de la forma activa de caspasa-3 en el citoplasma de las células que entran en apoptosis es un fenómeno precoz y precede a la aparición de los cambios morfológicos propios de la muerte celular programada (menos del 0,01% de las células que muestran cambios morfológicos característicos de la apoptosis no resultan inmunorreactivas cuando se emplean anticuerpos frente a caspasa-3). Así, para la inmunodetección de caspasa-3 empleamos un anticuerpo que detecta exclusivamente las formas activas de caspasa-3, mientras que no reacciona ni con otras caspasas ni con la proteína inactiva¹⁸¹ (anti-caspasa-3, clon Asp175/5A1, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Para la reacción utilizamos una dilución del anticuerpo primario 1:200, y las incubaciones de los tejidos se realizaron a temperatura ambiente durante 24 horas (Tabla 6).

Para su cuantificación se empleó un método estereológico, considerado como altamente reproducible. Este método permite, a partir del conteo de unas 1000 células en 5 campos seleccionados de modo aleatorio, obtener un coeficiente de variación entre observadores inferior al 5%¹⁸². Para llevar a cabo la cuantificación estereológica (Figura 7), seleccionamos de forma sistemática una serie de campos, mediante el empleo de un objetivo de bajo aumento ($\times 40$). Puesto que el primero de los campos analizados se selecciona al azar, todos los demás se pueden considerar también como seleccionados de forma aleatoria. En cada uno de estos campos, utilizando un objetivo de 400 aumentos, se contabilizaba el número de células con inmunorreactividad citoplasmática. Aquellas áreas del tumor con intensa necrosis o apoptosis son excluidas del análisis, pues pueden llevar a resultados no representativos. Puesto que la selección de las células analizadas no está sometida a la voluntad del observador, y se estudian muestras representativas de la práctica totalidad de la masa tumoral, este método resulta muy reproducible. Hemos utilizado la mediana como punto de corte cuando en el análisis de los datos, hemos considerado la expresión de caspasa-3 como una variable cualitativa dicotómica (Tabla 6).

Como control positivo empleamos muestras procedentes de timo de ratón.

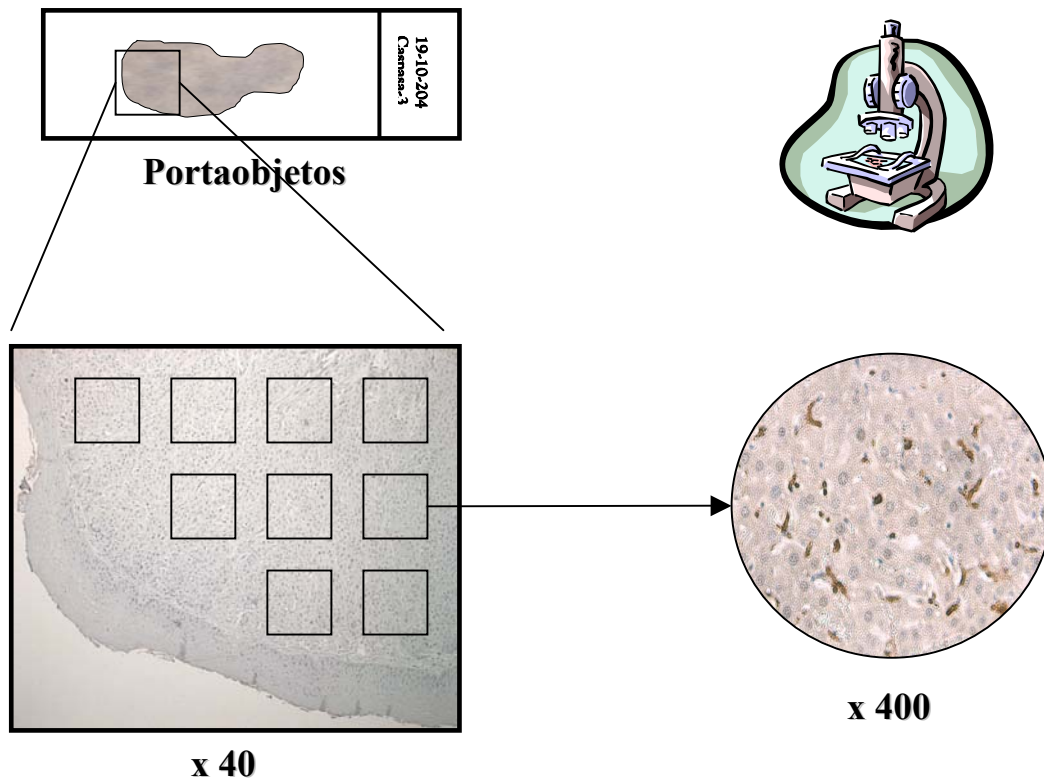


Figura 7. Representación del método estereológico empleado en la cuantificación de caspasa-3. Método basado en la realización de un muestreo sistemático y aleatorio de aquellas áreas del tumor que nos interesa analizar (ver texto).

3.2.4. CD34

Para poder visualizar y cuantificar los vasos presentes en los tumores empleamos un anticuerpo frente al antígeno CD34 (IgG₁, clon QBEnd/10, Novocastra, Newcastle, United Kingdom), a una dilución 1:50. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 6). CD34 es una glucoproteína transmembrana expresada exclusivamente en las células endoteliales y en los progenitores hematopoyéticos de las series linfóide y mieloide¹⁸³.

El grado de vascularización de cada tumor se determinó empleando un método de contrastada reproductibilidad, descrito inicialmente en 1992 por Weidner y colaboradores¹⁸⁴. Tras examinar la muestra, empleando para ello un objetivo de bajo aumento (x40), se seleccionaban las 4 áreas con mayor número de vasos teñidos (“puntos calientes”). En cada una de estas zonas, empleando un objetivo de 200 aumentos, se contaba el número de vasos

presentes en un área de 1 mm². El grado de vascularización de cada tumor viene dado por la mayor puntuación obtenida entre las 4 cuantificadas. Cada luz encontrada se cuantificaba como un único vaso. Si no había luz, y sólo aparecía una célula teñida, ésta se consideraba como un vaso individual. Cuando hemos considerado la expresión de CD34 como una variable cualitativa dicotómica, hemos utilizado como punto de corte la mediana (Tabla 6).

Como control positivo empleamos muestras procedentes de un angiosarcoma humano.

3.3. Desarrollo de un modelo animal de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

3.3.1. Células tumorales

En este experimento hemos empleado la línea celular humana SCC38. Esta línea se generó en el laboratorio del Dr. R. Grenman (Universidad de Turku, Finlandia) a partir de un carcinoma epidermoide glótico, estadificado como T2N0M0. Estas células se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biowhittaker), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Biowhittaker), 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamina (Invitrogen), 1% aminoácidos esenciales (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina (Biowhittaker). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada (90% de humedad), a 37°C, con un 10% de CO₂, en placas de 100 mm de diámetro. Estas células se sub-cultivaban cada 5 días cuando alcanzaban el 90-95% de confluencia, a una dilución 1:10.

Para la inoculación de las células tumorales en los ratones, éstas se crecían hasta alcanzar una confluencia cercana al 80%, tras lo cual se recogían mediante el uso de Tripsina-EDTA (Biowhittaker), se resuspendían en medio DMEM completo y se contaban en una cámara de Neubauer. Tras el conteo, se ajustaba la densidad celular hasta obtener una concentración de 10.000 células/µl de medio de cultivo. La viabilidad celular se comprobó mediante el empleo de azul de tripán, en base a la propiedad que tienen las células vivas para excluir este colorante.

Para evitar la aparición de sesgos en los distintos experimentos realizados, todos se llevaron a cabo con células obtenidas entre los pases 23 y 29.

3.3.1.1. Tratamientos celulares

Para estudiar las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α , decidimos generar un transfectante estable de la línea celular SCC38 capaz de expresar, tanto en normoxia como en hipoxia, elevadas concentraciones de esta proteína.

3.3.1.1.1. Construcción del plásmido pcDNA3-HIF-P402A-P564G

El plásmido pcDNA3-HIF-P402A-P564G se construyó a partir del plásmido pcDNA3-HIF1 α mediante el empleo del kit de mutagénesis “QuickChange[®]XL Site Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene). El plásmido pcDNA3-HIF-1 α (cedido por el Prof. Peter Ratcliffe, Oxford, Inglaterra) contiene el gen HIF-1 α nativo, bajo el control de un promotor de citomegalovirus. Mediante el empleo del kit de mutagénesis las prolinas 402 y 564 del gen HIF-1 α son sustituidas por alanina y glicina respectivamente, obteniendo así, a partir de pcDNA3-HIF-1 α un segundo plásmido, denominado pcDNA3-HIF-P402A-P564G. Sin las hidroxilaciones de las prolinas sustituidas, HIF-1 α no puede interaccionar con pVHL, por lo que su concentración intracelular se hace insensible a los cambios en la presión parcial de oxígeno, al tiempo que se mantiene intacta su actividad transcripcional. Tanto la estabilidad de la proteína mutante en normoxia, como su capacidad para transcribir los genes que incluyen en sus regiones promotoras secuencias HRE (genes por lo tanto habitualmente transcritos por HIF-1), han sido recientemente confirmadas en varios trabajos^{59,185,186}.

El kit de mutagénesis utilizado en nuestro estudio se basa en la replicación de las dos cadenas del plásmido que contiene el inserto que se desea mutar (HIF-1 α en nuestro caso) mediante el empleo de oligonucleótidos en cuya secuencia se incluye la mutación deseada (concretamente P402A y P564G) (Figura 8; Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de pcDNA3-HIF-P402A-P564G y pWZL-HIF-P402A-P564G

Nombre	Secuencia (5'-3')	Características más relevantes
ML-125	TTAACTTTGCTGGCC GCT GCCGCTGGAGACAC	Introduce la mutación en Pro402.
ML-126	GACTTGGAGATGTTAGCT GG CTATATCCCAATGGATGATGA	Introduce la mutación en Pro564
ML-127	GTGTCTCCAGCGGC AG CGGCCAGCAAAGTTAAA	Antisentido de ML-125
ML-128	TCATCATCCATTGGGATATAG CC AGCTAACATCTCCAAGTC	Antisentido de ML-126
ML-148	CGCC GGATCC AATACTACTCACTATAGGGA	Hibrida en promotor T7. Introduce secuencia reconocida por BamH I
ML-149	GCCGG TACGTA GCATTTAGGTGACACT ATAG	Hibrida en promotor SP6. Introduce secuencia reconocida por SnaB I

Los nucleótidos que introducen las mutaciones puntuales se señalan en color rojo. Las secuencias dianas de enzimas de restricción se señalan en azul.

Los oligonucleótidos empleados, complementarios a cadenas opuestas del vector, se extienden mediante el empleo de la ADN polimerasa *Pfu Turbo*, enzima que permite la replicación de las dos cadenas del plásmido con una elevada fidelidad sin desplazamiento de los oligonucleótidos.

La construcción de pcDNA3-HIF-P402A-P564G se realizó en dos pasos sucesivos. En el primero, se obtuvo el mutante P402A, seguido de un segundo paso en el que se mutó la secuencia que codifica la segunda prolina (P564G). Las condiciones empleadas para la síntesis del plásmido mutante fueron las siguientes: 10 ng de pcDNA3-HIF1 α , 125 ng de cada oligonucleótido y 1 μ l de dNTP 10mM, todo ello en 50 μ l de medio de reacción con tampon (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, 0,1 mg/ml albúmina, 20 mM Tris-HCl -pH 8,8- y 3 μ l de QuickSolution). Esta solución se incubó con 1U de la ADN polimerasa *Pfu Turbo* a 95°C durante 1 minuto. Seguidamente, se realizaron 18 ciclos con la

siguiente secuencia: 95°C, durante 50 segundos, 60°C otros 50 segundos y 68°C durante 9 minutos. Tras los 18 ciclos, la solución se mantuvo durante 7 minutos a 68°C.

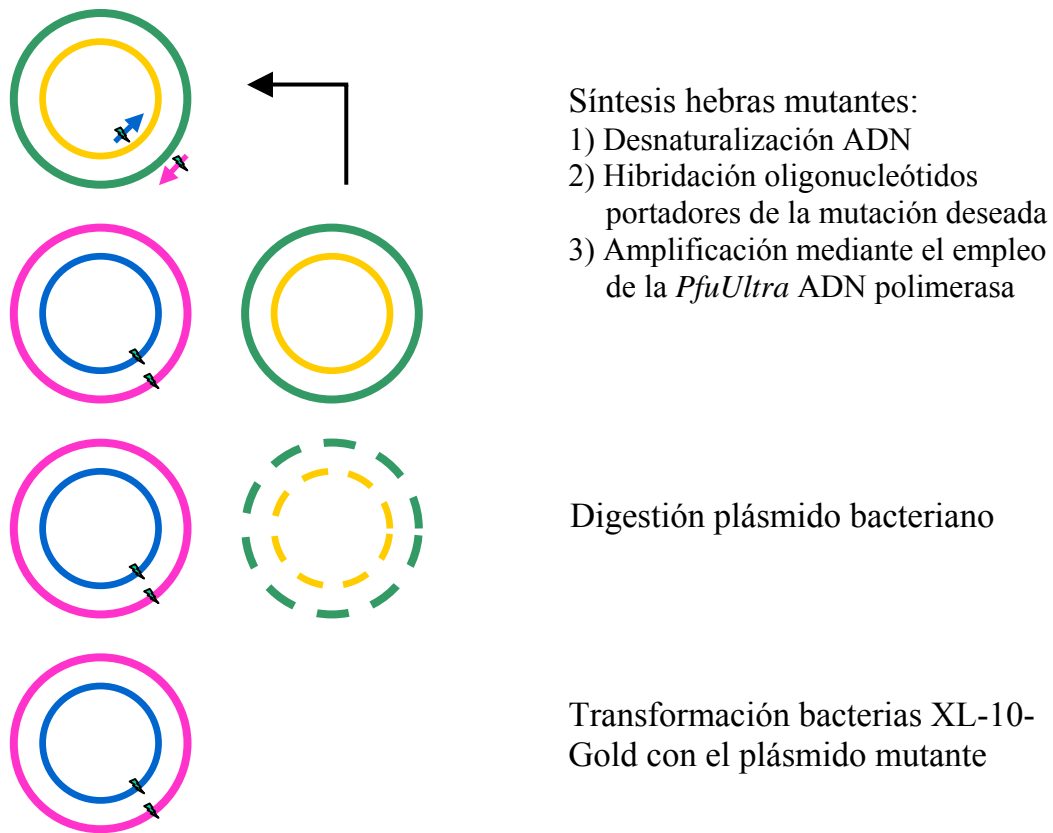


Figura 8. Representación esquemática del método de mutagénesis utilizado en el presente estudio para sustituir las prolinas 402 y 564 de HIF-1 α por alanina y glicina respectivamente (ver texto).

Posteriormente, las moléculas de ADN resultantes de la reacción de replicación se sometieron a la acción de la endonucleasa *Dpn* I. Esta enzima digiere el ADN parental que se encuentra metilado o hemi-metilado, pero no las hebras de ADN que contienen la mutación que, por haber sido sintetizadas *in vitro*, no han sido metiladas. Las moléculas de ADN aisladas de casi todas las cepas de *E. coli* se encuentran metiladas y, por lo tanto, son susceptibles de ser digeridas por *Dpn* I. La digestión con *Dpn* I se llevó a cabo durante 1h a 37°C.

A continuación, se procedió a la transformación de la cepa bacteriana ultra-competente XL10-Gold[®] con la mezcla de reacción. Las colonias bacterianas portadoras del vector con la secuencia mutada se seleccionaron mediante el empleo de placas de LB-Ampiciclina (50 μ g de ampiciclina/ml). Una vez seleccionadas las colonias resistentes a ampiciclina, el ADN

plasmídico portador de la mutación se extrajo de las bacterias mediante el empleo del kit Plasmid Miniprep Kit (BioRad), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Finalmente, la presencia de las mutaciones en los plásmidos aislados se confirmó mediante secuenciación automática en el Servicio de Análisis de ADN de la Universidad de Oviedo, empleando el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

3.3.1.1.2. Generación de células SSC38 transfectadas establemente con pWZL-HIF-P402A-P564G

La obtención de un transfectante estable de la línea celular SCC38 se llevó a cabo en tres fases. En la primera de ellas, el fragmento de ADN que codifica la proteína HIF-1 α mutante es transferido desde el plásmido pcDNA3, al plásmido retroviral pWZL-Hygro. La segunda fase consiste en el empaquetamiento del plásmido pWZL-Hygro, portador de la versión mutante de HIF-1 α , en retrovirus para, aprovechando la eficacia de estos en la inserción de sus genomas en el ADN de las células eucariotas, transfectar de forma estable, en un tercer y último paso, la línea celular SCC38.

La primera fase se inicia con la amplificación, mediante PCR, de la secuencia completa de HIF-P402A-P564G. Para ello, se emplearon los siguientes reactivos: 0,2 μ g de pcDNA3-HIF-P402A-P564G, 0,1 μ g del oligonucleótido ML-148 y 0,1 μ g del ML-149 (Tabla 7), 1 μ l de dNTP 10mM, 1U de ADN polimerasa *Pfu Turbo*, todo ello diluido en 50 μ l de tampón (ver descripción en apartado anterior). La reacción de PCR consistió en 1 ciclo de 95°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 4 minutos y 30 segundos, para concluir con 1 ciclo de 72°C, durante 10 minutos. Posteriormente, el ADN se purificó mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con 200 μ l de etanol absoluto frío, 300mM de NaOAc y 1 μ l de glucógeno (Ambion). Seguidamente, se procedió a la clonación de este producto de PCR en el vector pWZL-Hygro. Para ello, tanto el producto de PCR como el vector pWZL-Hygro fueron digeridos con los enzimas de restricción *SnaB I* y *BamH I* a 37°C, durante toda la noche en el caso de *SnaB I*, y durante 2 horas en el de *BamH I*. Posteriormente, el vector retroviral y el producto de PCR se purificaron en un gel de agarosa al 0,7% empleando para ello el kit GFXTM PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia), según las

indicaciones del fabricante. Una vez aislados, se procedió a la inserción del gen HIF-P402A-P564G en el vector, mediante una reacción de ligación con 3 U de T4 DNA ligasa (Amersham Pharmacia), que se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante 3 horas. El plásmido producto de la reacción de ligación (denominado pWZL-HIF-P402A-P564G) se empleó para la transformación de bacterias competentes XL1-Blue, seleccionando las colonias bacterianas en placas de LB-Ampicilina. El ADN plasmídico se extrajo de las bacterias con el kit Plasmid Miniprep Kit (BioRad), y la secuencia completa de HIF-P402A-P564G se verificó de nuevo mediante secuenciación, como se indicó en el apartado anterior.

La segunda fase consistió en el empaquetamiento del plásmido pWZL-HIF-P402A-P564G en retrovirus, mediante la transfección de $2,5 \times 10^6$ células empaquetadoras "Phoenix Ampho Packaging Cells" (cedidas por M. Frame, Glasgow, Inglaterra) con el citado plásmido, mediante el empleo del reactivo FuGene (Roche). Estas células servirán como huéspedes para la síntesis de las partículas víricas portadoras del gen mutante HIF-P402A-P564G. La información necesaria para la síntesis de los viriones se encuentra codificada en el plásmido pWZL-HIF-P402A-P564G. Para la transfección de las células Phoenix Ampho se usaron 9,6 μ l FuGene y 2 μ l pWZL-HIF-P402A-P564G (1 μ g/ μ l) diluidos en un volumen final de 320 μ l de DMEM. Esta mezcla se añadió a las células empaquetadoras en cultivo quedando un volumen final de 6,4 ml de DMEM completo. A las 24 horas, se les cambió el medio de cultivo sustituyéndolo por 5 ml de DMEM completo. Transcurridas otras 24 horas, se recogió el medio de cultivo (5ml), en el cual se encuentran suspendidas las partículas víricas. Este medio de cultivo se diluyó a la mitad con DMEM completo, se filtró a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 μ m, y se le añadió 4 μ l de Polybrene (Hexadimethrine Bromide 10mg/ml; Sigma). A las células Phoenix Ampho transfectadas se les repusieron 5 ml de medio DMEM completo para, posteriormente, recoger más partículas víricas. Finalmente, estos virus se emplearon para transfectar establemente la línea SCC38. Para ello, tras cultivar unas 450.000 células de la línea SCC38 durante 48h, se les retiró el medio de cultivo, y se les añadió el medio obtenido de las células empaquetadoras en el cual se encuentran suspendidas las partículas víricas. 24 horas más tarde se repitió el mismo protocolo de infección. 24 horas después de la segunda infección se realizó un pase 1:3 a la línea celular infectada para, 48 horas más tarde, iniciar el proceso de selección de los clones infectados y por lo tanto portadores de la mutación HIF1 α -P402A-P564G.

La selección de los clones que han integrado el plásmido viral en sus genomas se realizó con 35 µg/ml de hygromicina B (Calbiochem). Diez días después de iniciado el protocolo de selección, los clones supervivientes se recogieron tras la tripsinización de toda la placa de cultivo.

La concentración de hygromicina empleada en la selección de los clones se obtuvo tras realizar una curva de supervivencia de las células SCC38 con diferentes concentraciones del antibiótico. Para ello, se sembraron 5×10^5 células en placas de 35 mm de diámetro y 5 horas más tarde se les añadieron diferentes concentraciones de hygromicina (desde 5 µg/ml hasta 500 µg/ml). La concentración elegida para la selección de los clones transfectados de forma estable fue aquella que produjo la muerte de todas las células tras 10 días de cultivo, con cambios diarios de medio.

Como control experimental se emplearon células SCC38 transfectadas establemente con el plásmido pWZL, siguiendo un protocolo idéntico al descrito previamente.

3.3.1.1.3. Exposición a hipoxia

Para los experimentos realizados en condiciones de hipoxia, las células con una confluencia próxima al 50% se trasladaban a un incubador de hipoxia (HERACell 150, Heraeus) en el cual se mantenía una atmósfera constante con unas concentraciones de CO₂ y O₂ del 10% y 1%, respectivamente.

3.3.1.2. Western blot

Como primer paso para obtener un extracto proteico de nuestras células, tanto en el caso de las células SCC38 nativas, como en el de las células transfectadas establemente con el plásmido pWZL-HIF-P402A-P564G, se procedió al lavado de las placas de cultivo con PBS a 4°C. Seguidamente, las células se homogeneizaban añadiendo 100 µl de una solución de lisis que contenía HEPES-KOH 50 mM a pH 7,3, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NP40 0,2 %, DTT 5 mM, e inhibidores de proteasas (PMSF 0,5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, aprotinina 1 µg/ml,

pepstatina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml). La solución se dejaba actuar durante 10 minutos a 4°C. El extracto proteico celular se recogía y centrifugaba a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Seguidamente, se recogían los sobrenadantes, donde se determinaba la concentración de proteínas totales mediante el ensayo con el reactivo de Bradford (Bio-Rad), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

100 µg de este extracto proteico se separaron de acuerdo con el tamaño molecular en un gel de SDS-poliacrilamida al 7,5%, en el sistema de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad). Seguidamente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) mediante un sistema de transferencia semi-húmeda (Hoeffer) durante 2 horas a 250 mA con una solución de Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, con un pH de 8,3. Para el bloqueo de la membrana se empleó leche desnatada en polvo Molico-Sveltesse (Nestle) al 5 % en tampón TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y 0,9% de NaCl, 0,1% Tween-20). La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo en solución de bloqueo durante 15 horas a 4°C y en agitación.

El anticuerpo contra el factor de transcripción HIF-1 α (Becton-Dickinson) se empleó a una dilución de 1:500 y el anticuerpo contra la α -tubulina (Sigma) a una dilución de 1:1000. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, en tampón TBS con 2% de leche en polvo. Tras los lavados, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa (Amersham Biosciences) a una dilución 1:1000 en TBS con 2% de leche en polvo. Después de dos lavados de 15 minutos cada uno y 3 lavados de 5 minutos en TBS, se procedió al revelado con ECL “western blotting detection system” (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2. Características y cuidados de los animales

Para la inoculación de la línea celular SCC38 se emplearon veinte ratones hembra, atímicos *nu/nu* (Charles-River), de 5 semanas de edad. Para la inoculación del transfectante estable utilizamos 10 animales con las mismas características. Los ratones se mantuvieron en un micro-ambiente libre de patógenos, en el animalario de la Universidad de Oviedo. Para ello, se emplearon jaulas estériles equipadas con filtros de aire, y dispuestas en una unidad

especial de aislamiento. Los animales se alimentaron con pienso irradiado (Panlab) y agua autoclavada a la que se añadía tetraciclina al 0,1%. Todos los ratones se manejaron bajo condiciones de rigurosa asepsia.

Previamente a la inoculación de las líneas celulares en los ratones atímicos, quisimos analizar el sistema de drenaje linfático de la lengua y del suelo de la boca, para ello empleamos 5 ratones hembra Swiss.

El experimento fue aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones Sanitarias y Animales de Experimentación de la Universidad de Oviedo.

3.3.3. Caracterización del sistema de drenaje linfático del suelo de la boca en ratones

Con el fin de caracterizar el sistema de drenaje linfático del suelo de la boca en los ratones se procedió a la inoculación de un volumen de 50 μ l del colorante vital azul de metileno en el suelo de la boca de 5 ratones Swiss. Entre 15 y 20 minutos después de la inoculación, los ratones eran sacrificados y su cuello disecado buscando los tejidos a los cuales había migrado el colorante vital.

A continuación, los tejidos sospechosos de ser ganglios linfáticos se estudiaban histológicamente para confirmar su estirpe ganglionar. Esta información se empleó para la localización y posterior disección de los ganglios linfáticos de los ratones en los que se inyectaron las células tumorales.

3.3.4. Inoculación de las células tumorales

Los animales se anestesiaron con Avertina al 2,5% (Sigma-Aldrich), mediante la inyección intraperitoneal de un volumen de 15 μ l/gr de peso. Posteriormente, empleando una jeringa de insulina de 0,5 ml con una aguja de 30G (U-100 Insulin, BD Micro-Fine +), se inoculaban de forma submucosa, en el suelo de la boca, unas 300.000 células viables, resuspendidas en un volumen de 30 μ l de DMEM completo. Para ello, se introducía la citada aguja a nivel submucoso, en la cara ventral de la lengua, progresando entre las dos venas

raninas hasta la raíz lingual, para, desde ahí, proceder a la inoculación de las células tanto a nivel del surco alveolo-lingual, como en la cara inferior de la lengua.

Tres semanas después de la inyección, los ratones eran sacrificados, empleando para ello una dosis letal de pentotal sódico.

3.3.5. Necropsia y estudio histológico

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se procedía a la disección de los ganglios linfáticos cervicales (submaxilares y los de la cadena yugular) para, a continuación, extraer en una sola pieza, el suelo de la boca y la mandíbula de los animales. Los pulmones, el hígado y el bazo se resecaban para poder estudiar en ellos la presencia de metástasis hematógenas. Estos tejidos se fijaban en formaldehído al 10% durante 24h, para después ser incluidos en parafina y cortados.

Los tumores primarios se decalcificaron durante 72h en una solución de ácido fórmico y clorhídrico, ambos al 4%. En todos los tejidos se realizaron cortes seriados de 4 μm , profundizando entre ellos 100 μm , para así intentar obtener una descripción lo más precisa posible del tumor primario y descartar o confirmar la presencia de metástasis. Posteriormente, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluaron al microscopio óptico.

El índice mitótico de cada tumor se definió como la media del número de mitosis contabilizadas en 10 campos de gran aumento (x400).

Para el cálculo del volumen tumoral empleamos la fórmula $\pi/6 \times A \times B \times C$, donde A, B, y C corresponden a los tres diámetros perpendiculares del tumor. Dicha fórmula surge de considerar al tumor como un elipsoide, pues esta figura geométrica es la que más se aproxima a la forma que el tumor adquiere en el espesor de la lengua de los animales.

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS versión 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). La correlación de Spearman se empleó para analizar la presencia de

asociaciones estadísticamente significativas entre la clasificación T, la clasificación N, el estadio TNM y el grado histopatológico con la expresión de HIF-1 α , p53, caspasa-3, CD34, así como con la presencia de recidivas y de segundos tumores primarios. Este mismo estadístico se utilizó también para determinar el grado de asociación existente entre la edad de los pacientes y la expresión de HIF-1 α . Para estudiar la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de HIF-1 α , p53, caspasa-3 y CD34 (estas dos últimas codificadas como variables cualitativas dicotómicas) en el tumor primario y en las metástasis ganglionares correspondientes, usamos el estadístico Chi Cuadrado de Pearson. Cuando, para estudiar esta misma correlación codificamos CD34 y caspasa-3 como variables cuantitativas continuas, el estadístico empleado fue la correlación de Pearson. El test Chi Cuadrado de Pearson se empleó tanto, para estudiar la asociación entre las diferentes proteínas objeto de nuestro trabajo con la incidencia de recidivas (locales, regionales y a distancia) y segundos tumores primarios, como para estudiar la asociación existente entre ellas. Para llevar a cabo este último análisis hemos considerado HIF-1 α y p53, de acuerdo con la literatura previa^{151,178}, y con nuestros propios resultados, como variables cualitativas dicotómicas, considerando como positivas aquellas muestras con más del 10% de células inmunorreactivas, y como negativas aquellas con menos del 10%. El considerar CD34 y caspasa-3 como variables cuantitativas continuas no aportaba diferencias estadísticamente significativas con respecto a cuando, empleando como punto de corte la mediana, las considerábamos como variables cualitativas dicotómicas, mientras que sí suponía una simplificación a la hora de presentar los resultados, razón esta última en virtud de la cual decidimos considerarlas como variables cualitativas. Así, cuando empleamos el test T de Student, para comparar la media de la distribución de CD34 y caspasa-3 en los tumores con y sin sobre-expresión de HIF-1 α y p53 respectivamente, la significación estadística no se modificaba con respecto a cuando, considerándolas como variables cualitativas, estudiábamos su asociación mediante tablas de contingencia y empleábamos como estadístico el test Chi Cuadrado. Del mismo modo ocurría cuando analizábamos mediante la correlación de Spearman su asociación con la clasificación T, la clasificación N, el estadio TNM, el grado histológico o con la presencia de recidivas o de segundos tumores primarios. En ninguno de los casos la significación estadística variaba en función de que las consideráramos como variables cuantitativas continuas o como cualitativas, empleando como punto de corte la mediana de sus distribuciones.

El método de Kaplan-Meier se usó para el análisis de supervivencia. Las muertes que no fuesen debidas al tumor primario o sus metástasis no fueron consideradas como fracasos del tratamiento, siendo estos casos censurados del análisis final de la supervivencia específica para la enfermedad. Las diferencias entre las curvas de supervivencia fueron analizadas con el test de log-rank.

Para comparar el volumen de los tumores desarrollados en los ratones por la línea celular SCC38 y por el transfectante estable desarrollado a partir de la misma, empleamos el test T de Student para muestras independientes.

Valores de P menores de 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

4.1. Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados y su relación con el pronóstico

De los 116 pacientes estudiados, 64 (55%) seguían vivos sin evidencia de enfermedad en la última revisión. Diez pacientes sufrieron recurrencias locales, 24 regionales, 3 metástasis a distancia y 24 desarrollaron segundos tumores primarios. Como consecuencia del tumor fallecieron 30 pacientes. Veintidós pacientes murieron de causas no relacionadas con el tumor o sus metástasis. Las tasas de supervivencia global y de supervivencia específica para la enfermedad a los 5 años, fueron del 60% y 72%, respectivamente (Figura 9). La relación de los diferentes parámetros clínico-patológicos con la incidencia de recidivas, se muestra en las Tablas 8 a 11. Sólo la clasificación N y el estadio TNM, demostraron una asociación estadísticamente significativa con la aparición de recidivas. Concretamente, ambas variables se correlacionaron con una mayor incidencia de recidivas regionales ($p=0,005$ en el caso de la clasificación N y $p=0,012$ en el del estadio TNM). Ni la clasificación T, ni el grado de diferenciación se asociaron de un modo estadísticamente significativo con una mayor incidencia de recidivas locales, ni regionales. Las recidivas a distancia (3 pacientes) sólo se correlacionaron con la clasificación N ($p=0,015$). Ninguna de las variables clínico-patológicas evaluadas se correlacionó de un modo estadísticamente significativo con la aparición de segundos tumores primarios (T, $p=0,372$; N, $p=0,942$; TNM $p=0,886$; grado, $p=0,114$).

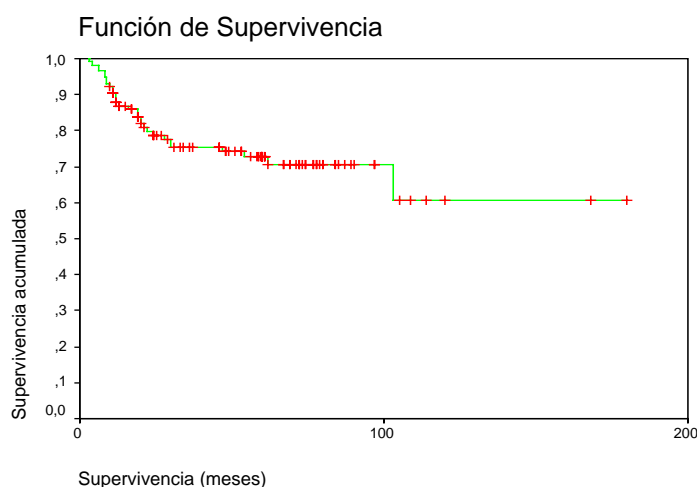
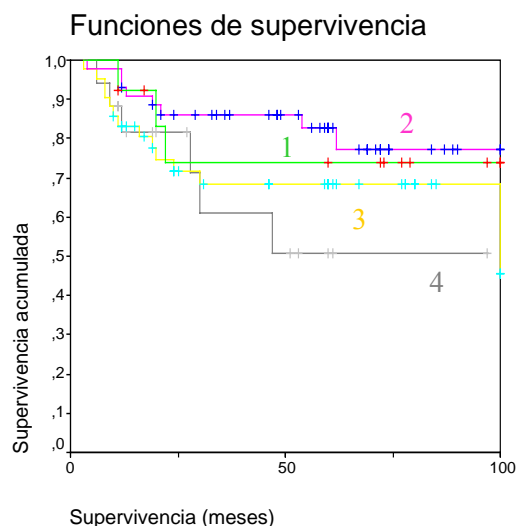


Figura 9. Curva de supervivencia específica para la enfermedad, estimada según el método de Kaplan-Meier. Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

Entre los parámetros clínico-patológicos que podrían tener relación con la supervivencia, como ocurría con la presencia de recidivas, sólo la clasificación N y el estadio TNM mostraron una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia específica para la enfermedad ($p=0,0001$ y $p=0,002$). En las Figuras 10 a 14 se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en relación con estos parámetros.

Tabla 8. Relación de la clasificación T con las recidivas tumorales.

	Total	Sin tumor	Recidivas			
			T	L	R	D
T1	13	9	4	1	3	0
T2	44	34	10	3	6	1
T3	42	27	15	4	10	1
T4	17	9	8	2	5	1
Total	116	79	37	10	24	3



T: Recidivas totales ($p=0,103$); L: Recidivas locales ($p=0,545$); R: Recidivas regionales ($p=0,266$); D: Recidivas a distancia ($p=0,395$).

Figura 10. Curvas de supervivencia estratificadas según la clasificación T. Las diferencias observadas no resultaron ser estadísticamente significativas (log-rank $p=0,215$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

Tabla 9. Relación de las metástasis ganglionares (clasificación N) con las recidivas tumorales. Se muestra el grado de significación estadística (p) asignado a la asociación existente entre ambas variables.

	Total	Sin tumor	Recidivas			
			Total	Locales	Regionales	A distancia
N0	55	45	10	4	6	0
N1	23	13	10	4	6	0
N2	33	21	12	2	8	2
N3	5	0	5	0	4	1
Total	116	79	37	10	24	3
p			0,001	0,875	0,005	0,015

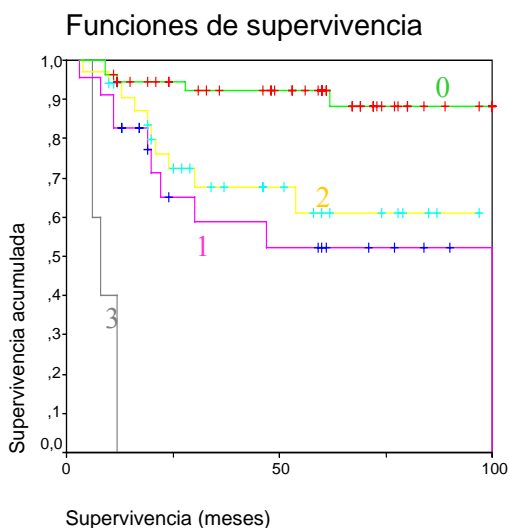


Figura 11. Curvas de supervivencia estratificadas según la clasificación N. Las diferencias observadas resultaron ser estadísticamente significativas (log-rank $p=0,0001$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

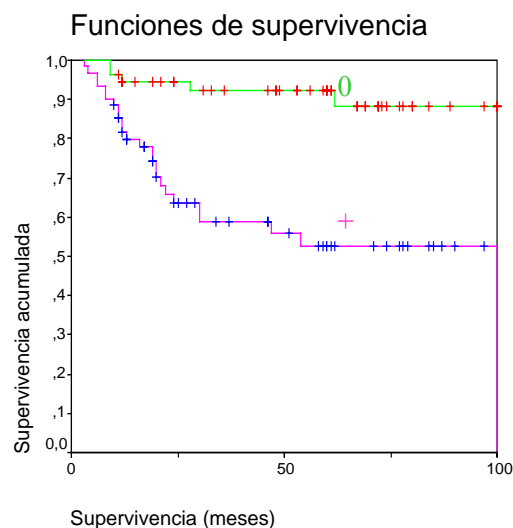
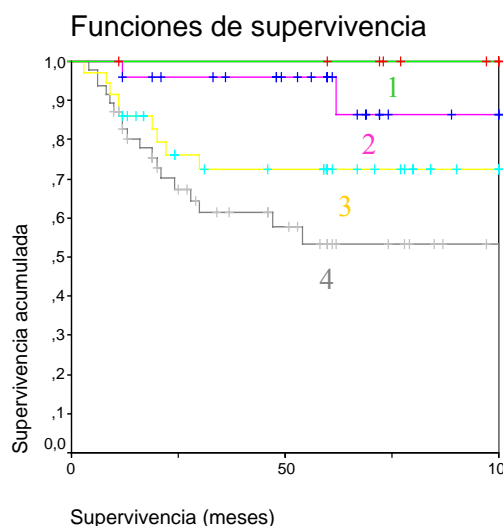


Figura 12. Curvas de supervivencia estratificadas según la presencia (+) o ausencia (0) de metástasis ganglionares. Las diferencias observadas resultaron ser estadísticamente significativas (log-rank $p=0,0001$). Mediante cruces se representan los datos censurados en el análisis.

Tabla 10. Relación del estadio TNM con las recidivas tumorales.

	Total	Sin tumor	Recidivas			
			T	L	R	D
I	8	7	1	0	1	0
II	25	21	4	2	2	0
III	36	26	10	4	6	0
IV	47	25	22	4	15	3
Total	116	79	37	10	24	3

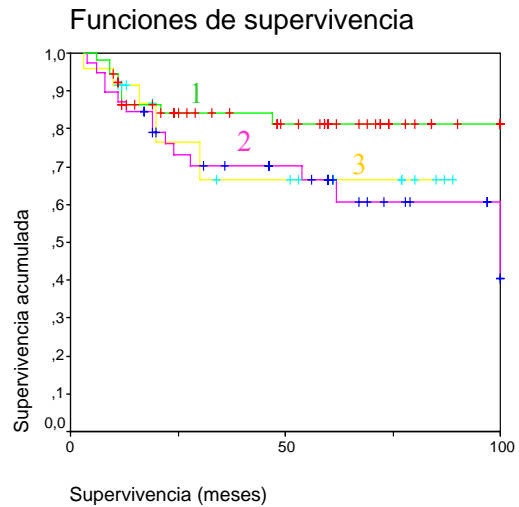


T: Recidivas totales ($p=0,002$); L: Recidivas locales ($p=0,717$); R: Recidivas regionales ($p=0,012$); D: Recidivas a distancia ($p=0,056$).

Figura 13. Curvas de supervivencia estratificadas según el estadio TNM. Las diferencias observadas resultaron ser estadísticamente significativas (log-rank $p=0,002$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

Tabla 11. Relación del grado de diferenciación histológica con las recidivas tumorales.

	Total	Sin tumor	Recidivas			
			T	L	R	D
G1	53	39	14	4	9	1
G2	39	23	16	6	10	0
G3	24	17	7	0	5	2
Total	116	79	37	10	24	3



G1: Bien diferenciado; G2: Moderadamente diferenciado; G3: Poco diferenciado. T: Recidivas totales ($p=0,472$); L: Recidivas locales ($p=0,681$); R: Recidivas regionales ($p=0,503$); D: Recidivas a distancia ($p=0,258$).

Figura 14. Curvas de supervivencia estratificadas según el grado de diferenciación histológica. Las diferencias observadas no resultaron ser estadísticamente significativas (log-rank $p=0,191$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

4.2. Expresión de HIF-1 α

La especificidad del anticuerpo empleado para la inmuno-detección de HIF-1 α se comprobó en la línea celular HeLa. En estas células se analizó la expresión de HIF-1 α , en hipoxia y normoxia, mediante western-blot e inmunocitoquímica. Como se muestra en la Figura 15, en hipoxia el anticuerpo detecta una proteína, ausente en normoxia, de distribución nuclear, cuyo peso molecular corresponde al descrito para HIF-1 α (120 kilodaltons).

4.2.1. Expresión de HIF-1 α en la mucosa normal de las vías aerodigestivas superiores

En el epitelio plano poliestratificado no queratinizado hemos encontrado una tinción de distribución citoplasmática, de carácter débil, restringida a los estratos superficial e intermedio (Figura 16).

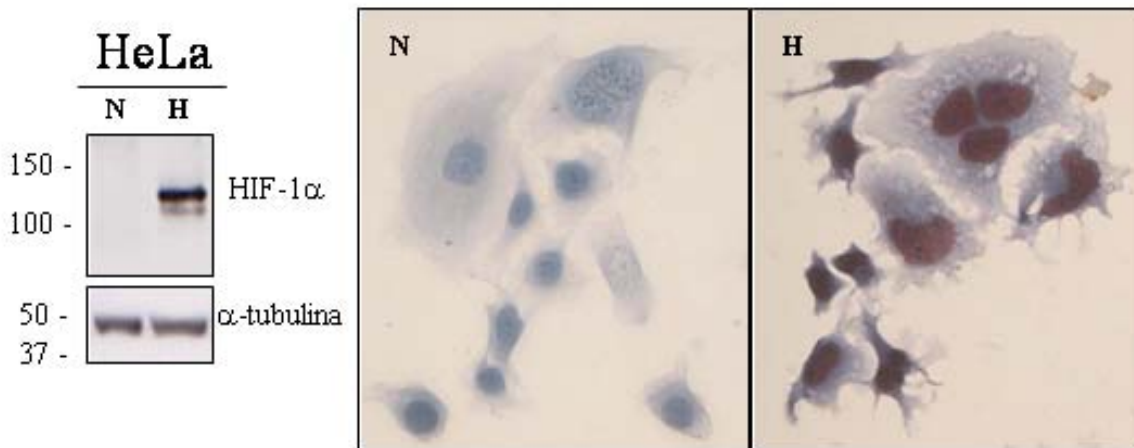


Figura 15. Caracterización del anticuerpo monoclonal IgG₁ anti HIF-1 α (Becton-Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA, USA). Se muestran los resultados del western blot (izquierda) y de la inmunocitoquímica (x400) (derecha) de la línea celular HeLa en normoxia (N) e hipoxia (H), con anticuerpos anti HIF-1 α . La proteína α -tubulina se empleó como control de carga del extracto proteico en el gel.

Este patrón de tinción citoplasmático aparece sistemáticamente polarizado hacia la zona más basal de las células epiteliales, adquiriendo una disposición “en media luna” de concavidad apical. En la mucosa sana, en ningún caso se encontró expresión nuclear. Esta tinción citoplasmática se observó en el 75% de las muestras analizadas, y afectaba a un pequeño porcentaje de la superficie epitelial evaluada (nunca más de un tercio del total).

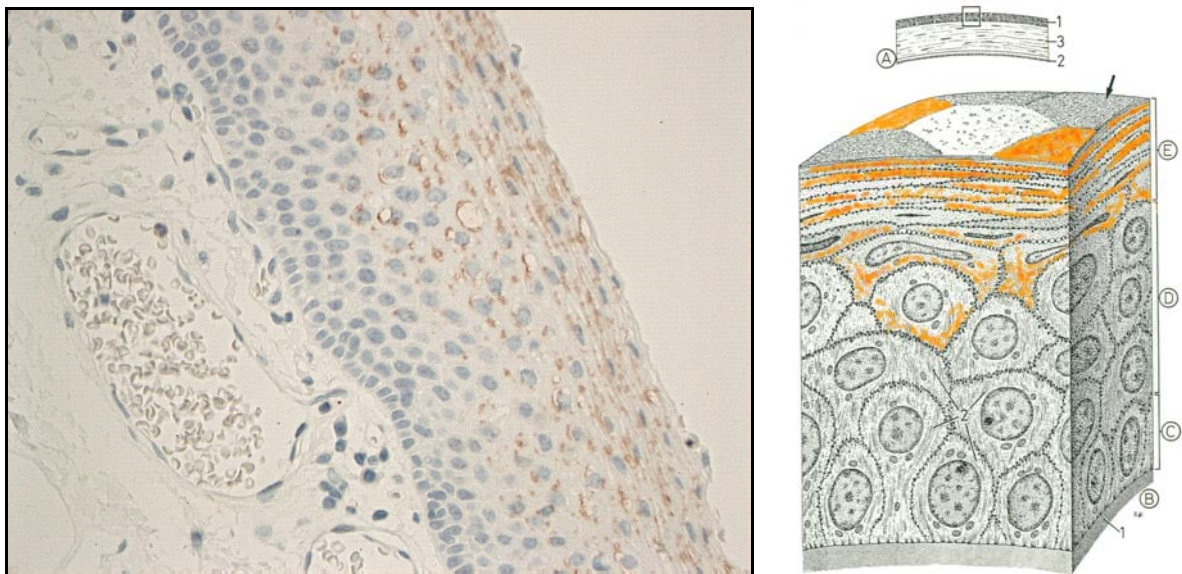


Figura 16. Expresión HIF-1 α en el epitelio normal (200x y representación a 2600x).

4.2.2. Expresión de HIF-1 α en carcinomas epidermoides supraglóticos

De las 116 muestras analizadas, hemos podido determinar la expresión de HIF-1 α en 106. De éstas, 75 (71%) fueron consideradas como muestras positivas, pues en ellas más del 10% de las células tumorales sobre-expresaban HIF-1 α . Esta sobre-expresión se manifestaba por la aparición de inmunorreactividad nuclear (Figura 17).

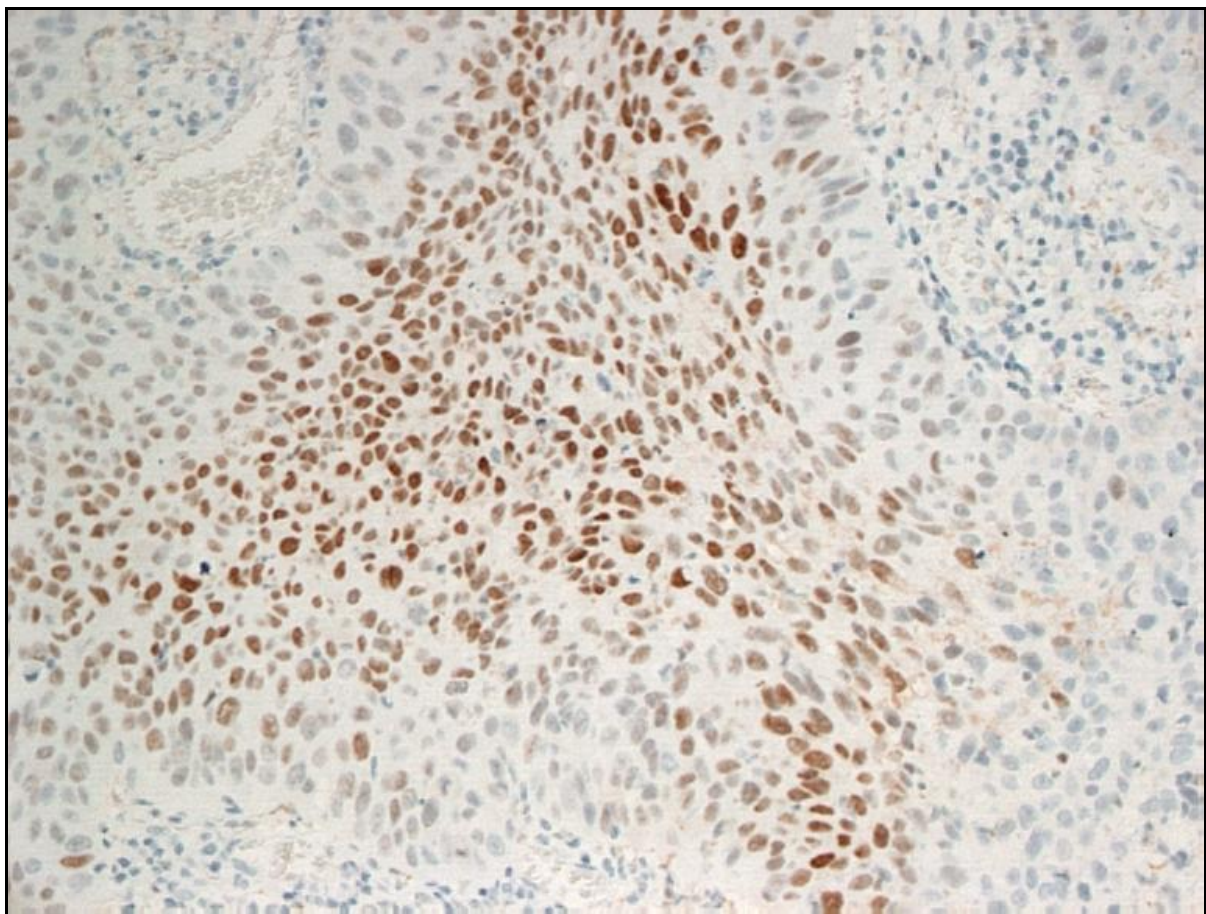


Figura 17. Expresión nuclear de HIF-1 α en las células tumorales (200x).

Tanto la intensidad de la tinción, como su extensión y distribución en la masa tumoral, mostraban una gran variación entre las distintas muestras estudiadas. Así, el porcentaje de células tumorales que sobre-expresaban HIF-1 α variaba desde menos del 10% hasta más del 90% según los casos. Del mismo modo, la intensidad de la tinción tampoco parecía

distribuirse de un modo homogéneo, variando tanto entre los distintos tumores como dentro de la misma muestra. Como consecuencia, para estudiar la expresión de HIF-1 α hemos empleado el porcentaje de células teñidas en lugar de la intensidad de la tinción, como previamente hemos indicado en la sección de Material y Métodos.

Las células tumorales que sobre-expresaban HIF-1 α se distribuían independientemente de la presencia de vasos sanguíneos o de focos de necrosis, apareciendo tanto en la inmediata proximidad de los vasos (Figura 18) como alejadas de los mismos.

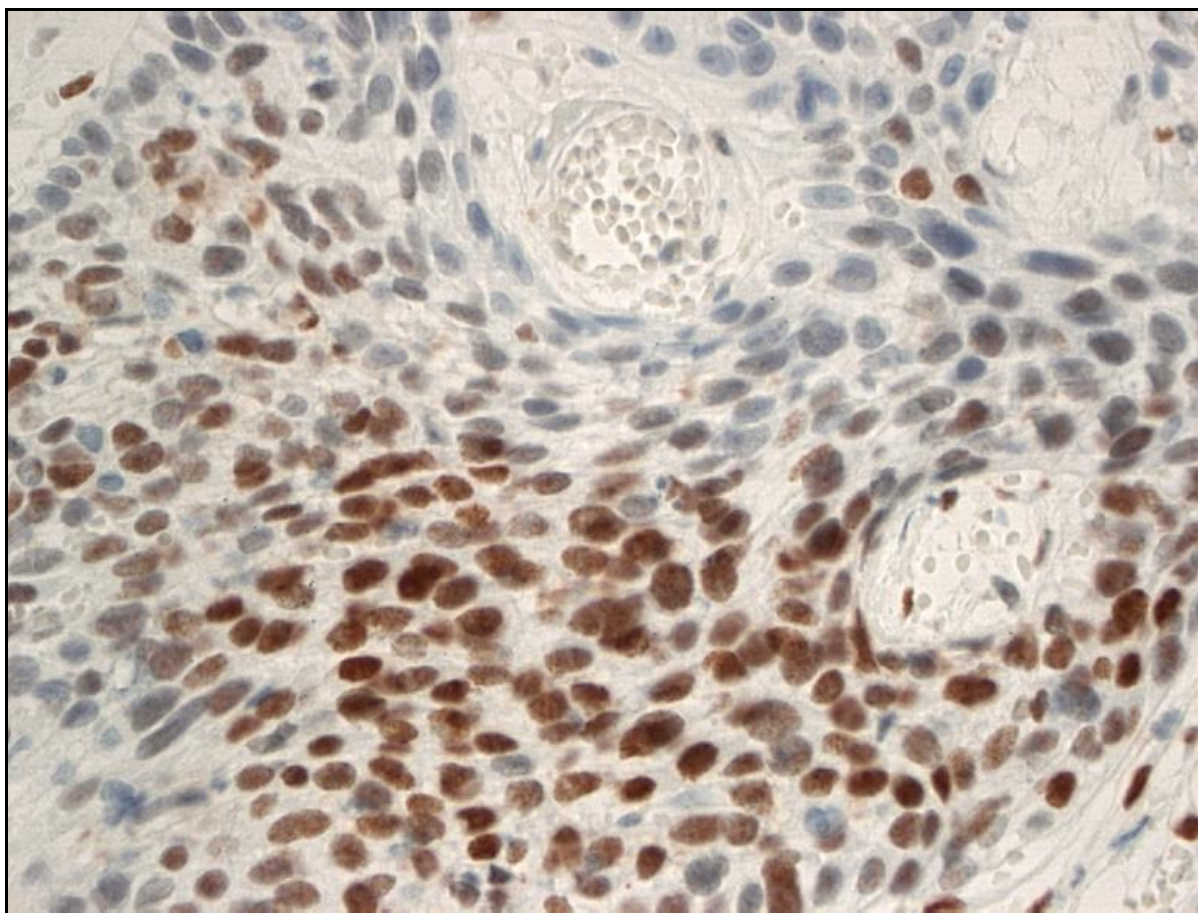


Figura 18. Expresión de HIF-1 α en las células adyacentes a los vasos sanguíneos (400x).

Este dato será el primero de una serie de resultados que nos harán plantearnos la hipótesis de que, además de la hipoxia, otros factores deben contribuir a la regulación de la expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. En esta misma línea, hemos observado que las áreas del tumor necróticas, donde las concentraciones de oxígeno son extremadamente bajas, no siempre aparecían rodeadas de células tumorales

inmunorreactivas, mientras que las células estromales e inflamatorias dentro y alrededor del foco necrótico sí presentaban un patrón de tinción nuclear, probablemente en respuesta al entorno hipóxico (Figura 19).

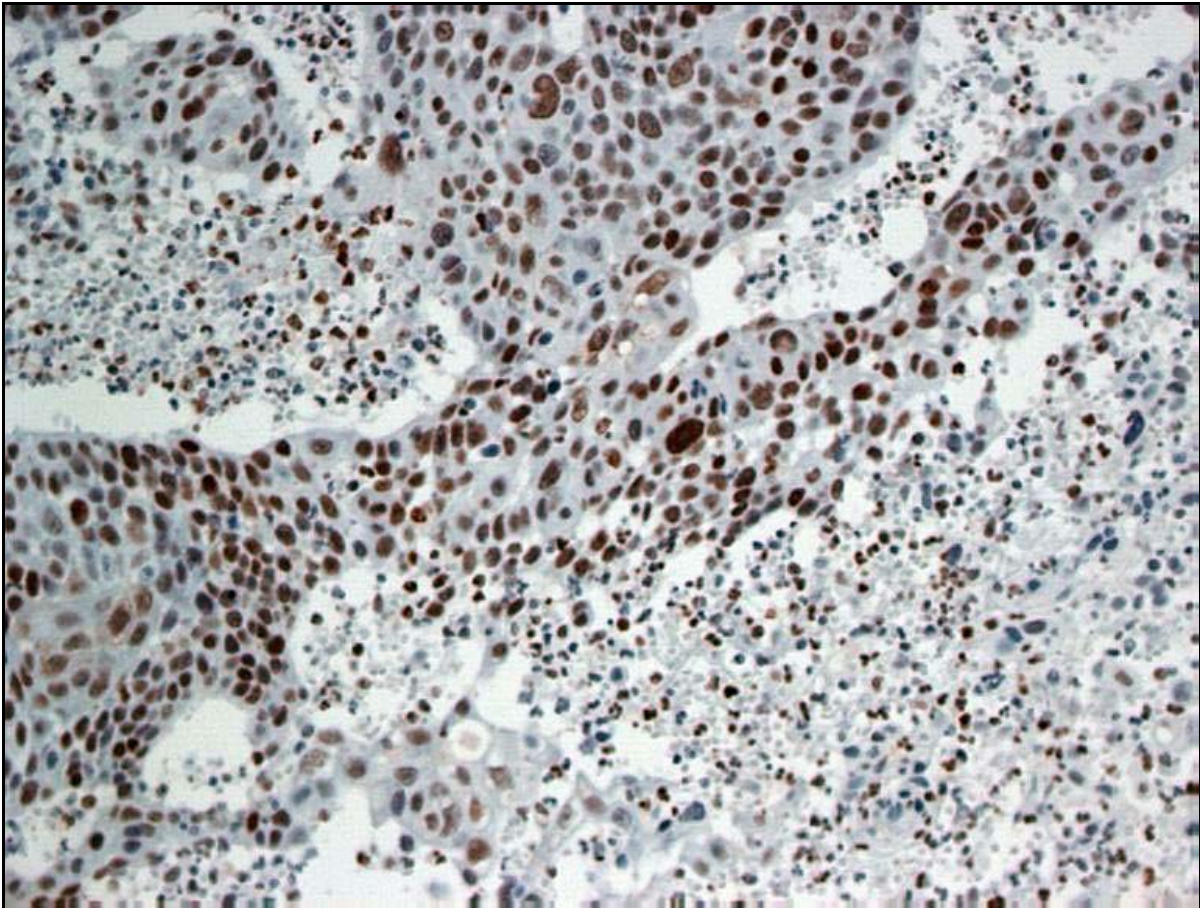


Figura 19. Expresión de HIF-1 α en áreas de necrosis (200x).

4.2.3. Expresión de HIF-1 α en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos

De los 61 pacientes con metástasis ganglionares, hemos podido determinar la expresión de HIF-1 α en 49. En el 55% de las metástasis evaluadas (27 casos) se demostró inmunorreactividad para HIF-1 α , observándose un patrón de expresión similar al encontrado en el tumor primario (tinción nuclear, con distribución heterogénea) (Figura 20).

En 45 pacientes hemos podido estudiar la expresión de HIF-1 α , tanto en el tumor primario, como en sus correspondientes metástasis ganglionares. En éstos no hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células inmunorreactivas en el tumor primario y el porcentaje hallado en las metástasis linfáticas originadas en el mismo ($p=0,249$; Tabla 12).

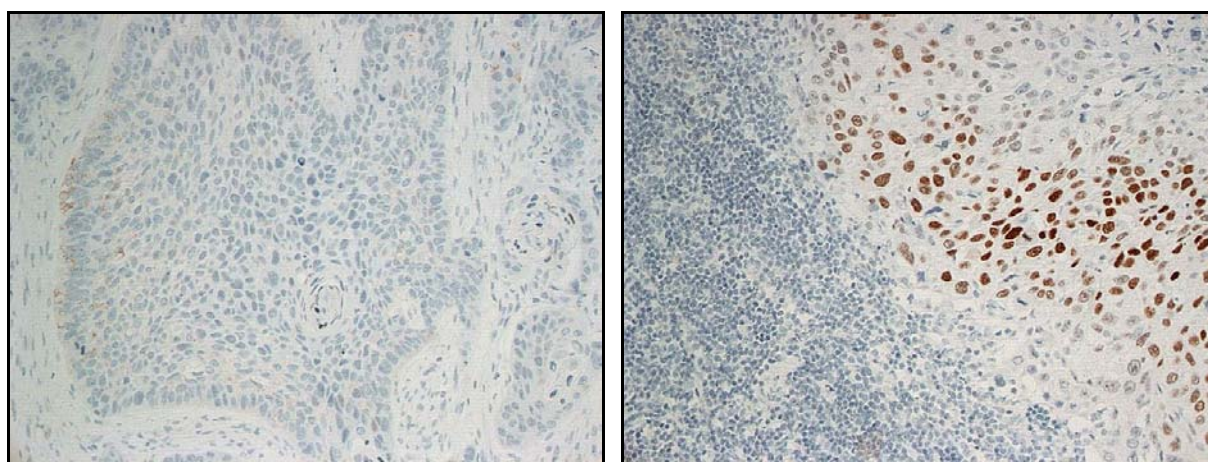


Figura 20. Expresión de HIF-1 α en el tumor primario (izquierda; 200x) y en la metástasis ganglionar originada en el mismo (derecha; 200x). Se puede observar cómo, mientras en el tumor primario HIF-1 α apenas se expresa, en la metástasis linfática la expresión es evidente.

Tabla 12. Correlación entre la expresión de HIF-1 α en el tumor primario y en las metástasis ganglionares originadas en el mismo.

	Expresión de HIF-1 α en el tumor primario		
	$\leq 10\%$	$> 10\%$	P
Expresión de HIF-1 α en las MTX			0,249 [#]
$\leq 10\%$	8	12	
$> 10\%$	6	19	

MTX: Metástasis ganglionares; [#]Chi cuadrado de Pearson

Así pues, el patrón de expresión de HIF-1 α en el tumor primario no parece mantenerse de un modo consistente en las metástasis ganglionares originadas a partir del mismo. Este resultado, junto con otros que veremos más adelante, contribuye a poner en duda que HIF-1 α ejerza un papel destacado en la progresión tumoral.

4.2.4. Relación entre la expresión de HIF-1 α y las distintas variables clínico-patológicas

No hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de HIF-1 α y variables como edad ($p=0,139$), clasificación N ($p=0,507$, sin agrupar los distintos estadios y $p=0,777$, agrupándolos en pacientes con y sin afectación ganglionar) o grado de diferenciación tumoral ($p=0,094$). La única asociación estadísticamente significativa ha sido la hallada entre la clasificación T y el porcentaje de células que sobre-expresaban HIF-1 α . Los tumores localmente más avanzados tienden a sobre-expresar HIF-1 α , mientras que los tumores diagnosticados en estadios T iniciales más raramente sobre-expresan HIF-1 α . Esta asociación parece ser consistente, pues permanece estadísticamente significativa tanto si analizamos los distintos estadios de forma separada ($p=0,016$), como si los agrupamos en estadios iniciales (T1-T2) y avanzados (T3-T4) ($p=0,026$). Este hallazgo, junto con la falta de correlación existente entre la afectación ganglionar y HIF-1 α puede explicar que, cuando agrupamos los pacientes en estadios iniciales (I y II) y avanzados (III y IV), la relación entre la expresión de HIF-1 α y el estadio TNM se acerque a la significación estadística ($p=0,066$). Por el contrario, cuando analizamos los distintos estadios de forma individual, la significación estadística se pierde ($p=0,149$). Esta observación se puede deber a la mayor influencia que tiene la clasificación N, en comparación con la clasificación T, en los estadios avanzados del sistema TNM.

En la Tabla 13 se representa la relación entre la expresión HIF-1 α y las distintas variables clínico-patológicas, agrupando los pacientes en estadios iniciales y avanzados, con el fin de simplificar su interpretación.

Tabla 13. Niveles de expresión de HIF-1 α en el tumor primario y su correlación con las distintas variables clínico-patológicas.

	Expresión de HIF-1 α en el tumor primario		
	$\leq 10\%$	$> 10\%$	P
Clasificación T			0,026 [#]
T1-T2	21	33	
T3-T4	10	42	
Clasificación N			0,777 [#]
N0	15	34	
N+	16	41	
Estadio TNM			0,066 [#]
I-II	12	16	
III-IV	19	59	
Grado histopatológico			0,094 [#]
Bien diferenciado	11	38	
Moderadamente diferenciado	11	25	
Pobrementemente diferenciado	9	12	

[#]Correlación de Spearman

4.2.5. Relación entre la expresión de HIF-1 α y el pronóstico

Para determinar la influencia de la expresión HIF-1 α en el pronóstico de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, hemos analizado la relación existente entre su expresión en el tumor y la evolución clínica de los pacientes. No hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de HIF-1 α en el tumor primario y las recurrencias loco-regionales ($p=0,756$ para las recidivas locales, $p=0,450$ para las regionales). Tampoco hemos encontrado correlación con la incidencia de segundos tumores primarios ($p=0,319$) (Tabla 14).

Tabla 14. Niveles de expresión de HIF-1 α en el tumor primario y su correlación con el pronóstico.

	Expresión de HIF-1 α en el tumor primario		
	$\leq 10\%$	$>10\%$	P
Recidiva local			0,756*
No	29	67	
Sí	2	8	
Segundos primarios			0,319*
No	23	62	
Sí	8	13	

*Chi cuadrado de Pearson.

Del mismo modo, tampoco hemos encontrado ninguna asociación entre la expresión de HIF-1 α en las metástasis ganglionares y la presencia de recidivas regionales ($p=0,647$) (Tabla 15).

Tabla 15. Niveles de expresión de HIF-1 α en la metástasis ganglionar y su correlación con el pronóstico.

	Expresión de HIF-1 α en la MTX ganglionar		
	$\leq 10\%$	$>10\%$	P
Recidiva regional			0,647*
No	16	18	
Sí	6	9	

*Chi cuadrado de Pearson; MTX: metástasis.

Así mismo, tampoco hemos podido correlacionar de una manera estadísticamente significativa la supervivencia de los pacientes con el porcentaje de células que sobre-expresaban HIF-1 α , ni en el tumor primario (Figura 21; $p=0,464$, test de log rank), ni en las metástasis ganglionares (Figura 22; $p=0,154$, test de log rank). Si bien es cierto que los

pacientes cuyas metástasis ganglionares cervicales sobre-expresan HIF-1 α parecen vivir durante más tiempo, este resultado es sólo una tendencia y ni siquiera se acerca a la significación estadística.

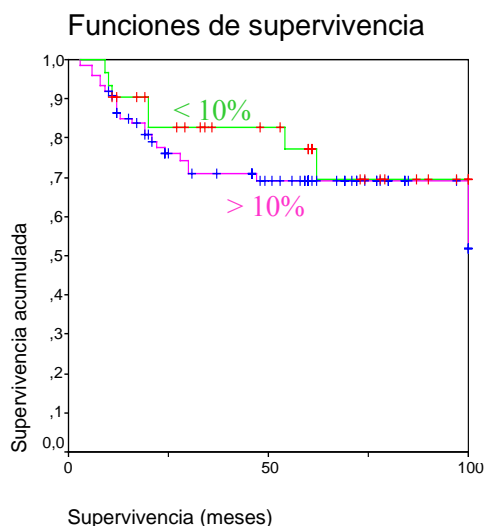


Figura 21. Curvas de supervivencia estratificadas según el porcentaje de células con sobre-expresión de HIF-1 α en el tumor primario (punto de corte 10%). (log-rank $p=0,464$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

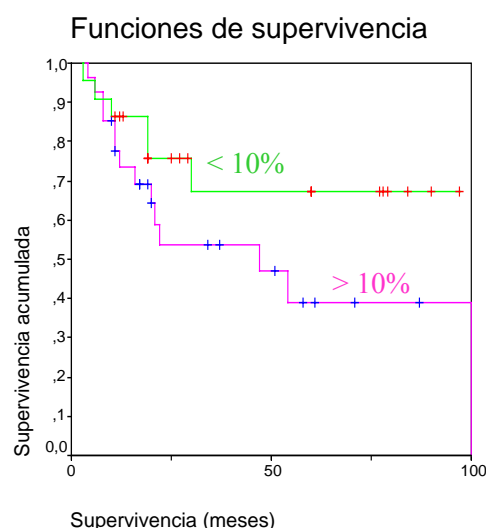


Figura 22. Curvas de supervivencia estratificadas según el porcentaje de células con sobre-expresión de HIF-1 α en las metástasis ganglionares (punto de corte 10%). (log-rank $p=0,154$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

4.3. Expresión de p53

4.3.1. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides supraglóticos

El 58% de los tumores analizados se consideraron como positivos, pues en ellos más del 10% de las células tumorales expresaban p53. El patrón de expresión de p53 difería claramente del mostrado por HIF-1 α . En la mayoría de los tumores positivos la expresión de p53 era intensa, y las células inmunorreactivas se distribuían de forma homogénea en el espesor de la masa tumoral, respondiendo en el 85% de los casos a la ley del todo o nada. Es decir, sólo el 15% de los tumores que sobre-expresaban p53 tenían un porcentaje de células

tumorales inmunorreactivas comprendido entre el 10% y el 50%, mientras que el resto de los casos, o no expresaban p53, o la mayoría de las células tumorales eran positivas (Figura 23).

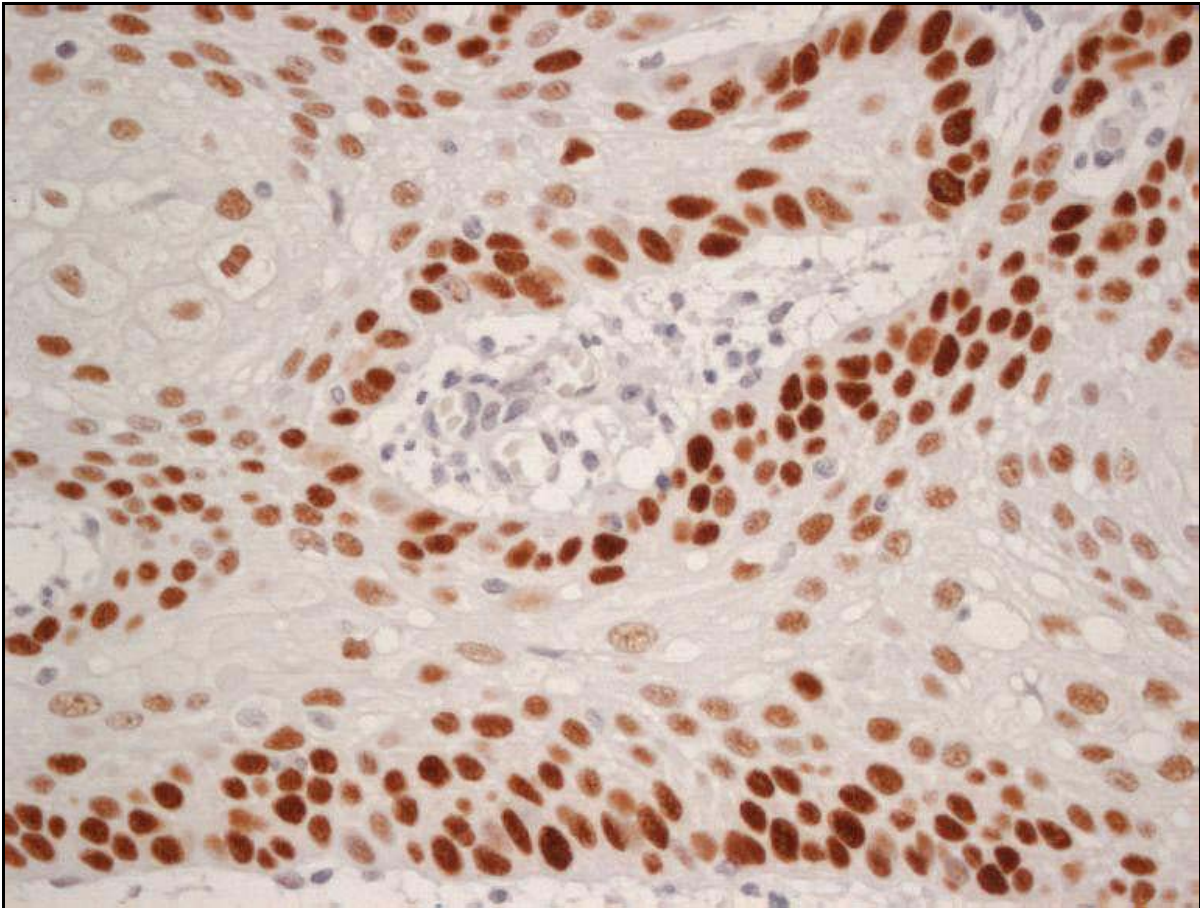


Figura 23. Expresión nuclear de p53 en las células tumorales (400x).

No hemos hallado ninguna correlación entre la expresión de HIF-1 α y la de p53 ($p=0,342$).

4.3.2. Expresión de p53 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos

En 46 pacientes hemos estudiado la expresión de p53, tanto en el tumor primario, como en sus correspondientes metástasis ganglionares. En el 46% de las metástasis se

demonstró inmunorreactividad para p53. Al estudiar la correlación entre el porcentaje de células inmunorreactivas en los tumores primarios y el porcentaje hallado sus metástasis ganglionares, encontramos una correlación casi perfecta ($p=0,0001$). Es decir, las células tumorales presentes en las metástasis linfáticas se comportan, en cuanto a la expresión de p53, del mismo modo que las del tumor primario (Figura 24).

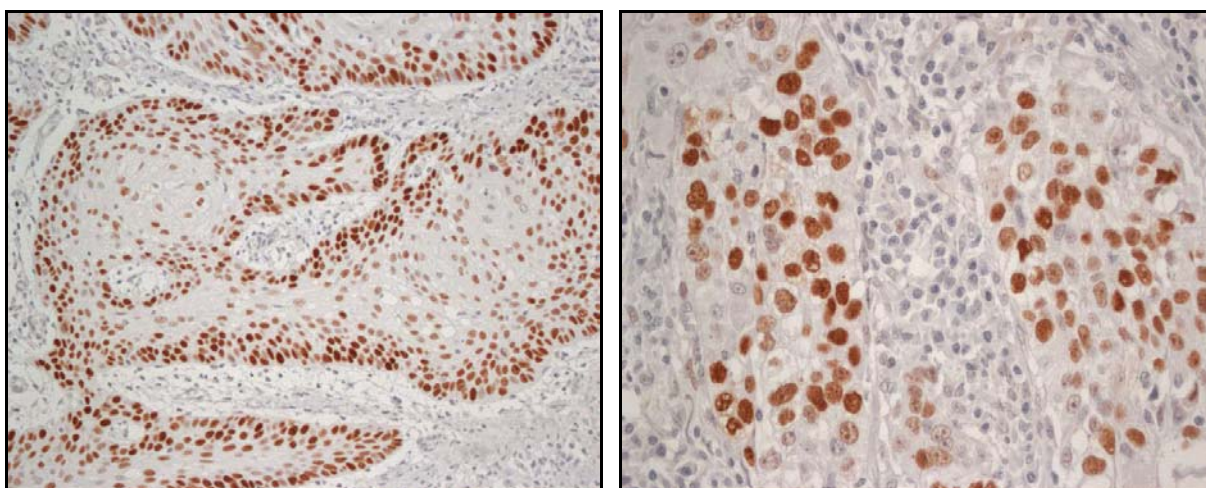


Figura 24. Expresión de p53 en el tumor primario (izquierda; 200x) y en la metástasis ganglionar originada en el mismo (derecha; 400x).

4.3.3. Relación entre la expresión de p53 y las distintas variables clínico-patológicas

No hemos encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 en el tumor primario y las clasificaciones T ($p=0,102$), N ($p=0,129$), el estadio TNM ($p=0,059$), ni el grado histológico ($p=0,149$). Del mismo modo, tampoco hemos encontrado asociación entre la expresión de p53 en las metástasis ganglionares y la clasificación N ($p=0,181$).

4.3.4. Relación entre la expresión de p53 y el pronóstico

Como previamente había ocurrido con HIF-1 α , la expresión de p53 en el tumor primario no se asoció con una mayor incidencia de recidivas ($p=0,227$ para las recidivas locales y $p=0,275$ para las recidivas regionales), ni tampoco con una mayor incidencia de segundos tumores primarios ($p=0,544$). Sin embargo, la expresión de p53 en las metástasis ganglionares sí se asoció con una mayor frecuencia de recidivas regionales ($p=0,02$) (Tabla 16). Aquellos tumores cuyas metástasis linfáticas sobre-expresaban p53, recidivaban a nivel cervical con más frecuencia que aquellos cuyas células tumorales metastásicas no expresaban p53.

Tabla 16. Niveles de expresión de p53 en las metástasis ganglionares y su correlación con la clasificación N ($p=0,181$) y con las recidivas regionales ($p=0,02$)

	Clasificación N			Recidivas regionales	
	N1	N2	N3	No	Sí
p53 <10%	7	16	2	21	4
p53 >10%	10	10	1	11	10

Probablemente este hallazgo pueda justificar por qué mientras la expresión de p53 en el tumor primario no parece influir en la supervivencia de los pacientes ($p=0,711$; Figura 25), la expresión de esta proteína en las metástasis ganglionares se asocia de un modo estadísticamente significativo con la supervivencia ($p=0,018$; Figura 26). Aquellos pacientes cuyas metástasis ganglionares sobre-expresan p53 tienen un pronóstico vital mucho peor que aquellos en los que esto no ocurre (70% vivos a los 5 años, comparados con el 30% en el grupo cuyas metástasis sobre-expresan p53).

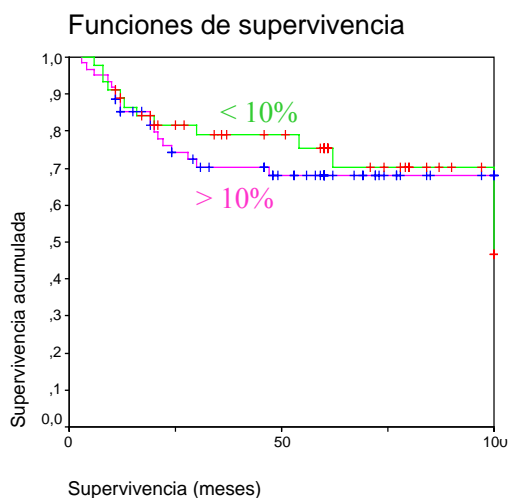


Figura 25. Curvas de supervivencia estratificadas según el porcentaje de células tumorales que sobreexpresan p53 en el tumor primario (punto de corte 10%). (log-rank $p=0,711$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

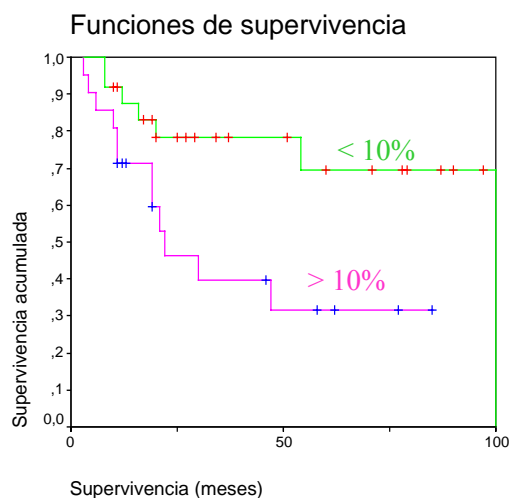


Figura 26. Curvas de supervivencia estratificadas según el porcentaje de células tumorales que sobreexpresan p53 en las metástasis ganglionares (punto de corte 10%). (log-rank $p=0,018$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

4.4. Expresión de caspasa-3

4.4.1. Expresión de caspasa-3 en carcinomas epidermoides supraglóticos

De las aproximadamente 1000 células tumorales evaluadas en cada uno de los casos, el número de células en las cuales se podía demostrar expresión de caspasa-3 (c-3) oscilaba entre 0 y 136, la media eran 25 células y la mediana 10 (Figura 27). Como punto de corte se empleó la mediana dado que, la distribución de valores muy asimétrica hace que la media no sea una medida de tendencia central adecuada para nuestra serie.

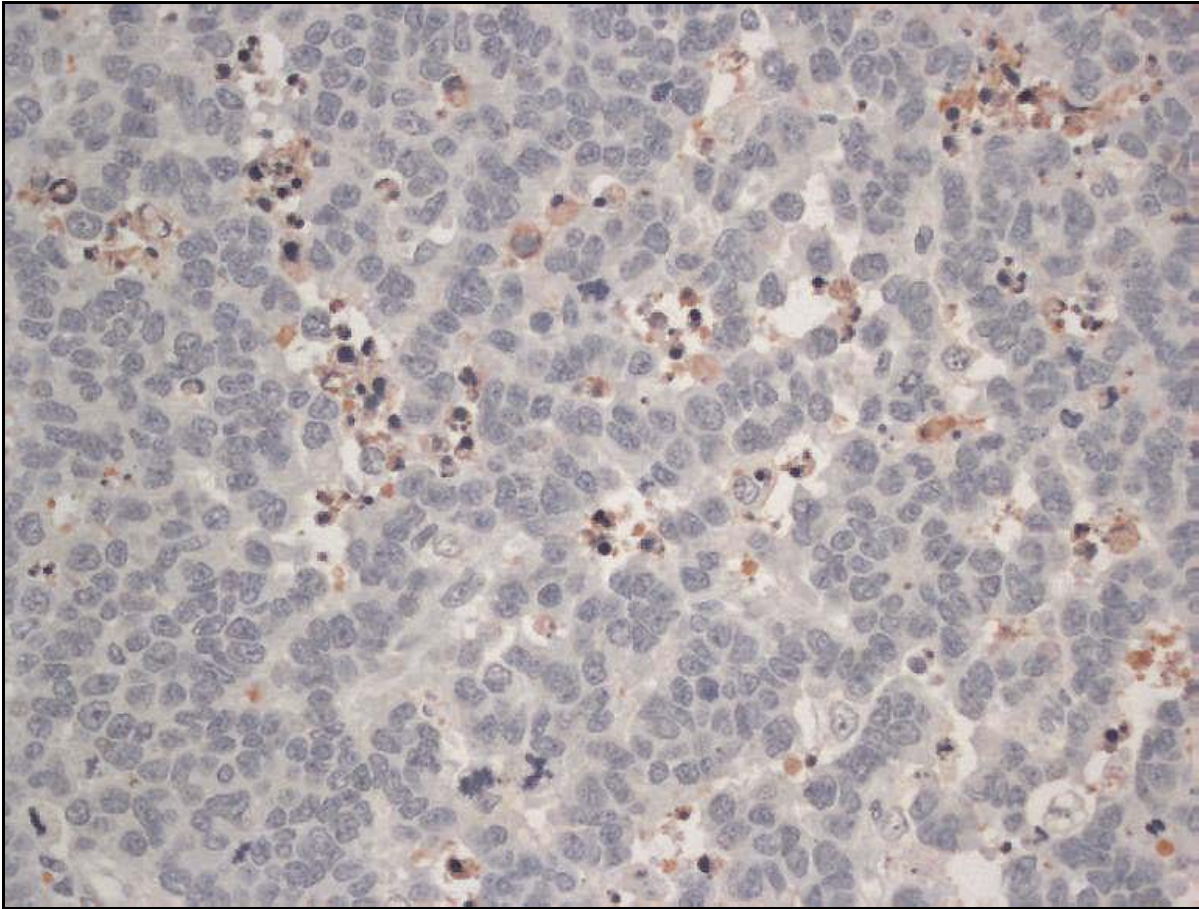


Figura 27. Expresión de caspasa-3 en el tumor primario (400x).

4.4.2. Expresión de caspasa-3 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos

El número de células inmunorreactivas para c-3 en las metástasis ganglionares oscilaba, según los casos, entre 2 y 318, la media fueron 41 células y la mediana 9. Nos parece interesante resaltar que la medida de tendencia central elegida (la mediana) resultó ser muy similar a la encontrada en los tumores primarios (9 y 10 células, respectivamente), a pesar de las variaciones en el intervalo de valores y en la media.

Como ocurría con p53, la expresión de c-3 en el primario y en las metástasis linfáticas se mantiene de un modo estadísticamente significativo ($p=0,0001$ si consideramos la expresión de c-3 como una variable cuantitativa continua y $p=0,035$ si empleamos como punto de corte la mediana, y consideramos su expresión como una variable cualitativa

dicotómica) (Tabla 17; Figura 28). Es decir, el número de células en las cuales se ha desencadenado la cascada de señalización intracelular cuyo fin es la muerte celular programada, es muy similar en el tumor primario y en sus metástasis.

Tabla 17. Grado de significación estadística (p) asignado a la correlación existente entre la expresión de los distintos marcadores moleculares en el tumor primario y en sus metástasis ganglionares.

	HIF	p53	c-3	CD34
Correlación expresión primario y MTX	0,247	0,0001	0,035	0,603

MTX: Metástasis; Se representan en color rojo los valores de $p < 0,05$.

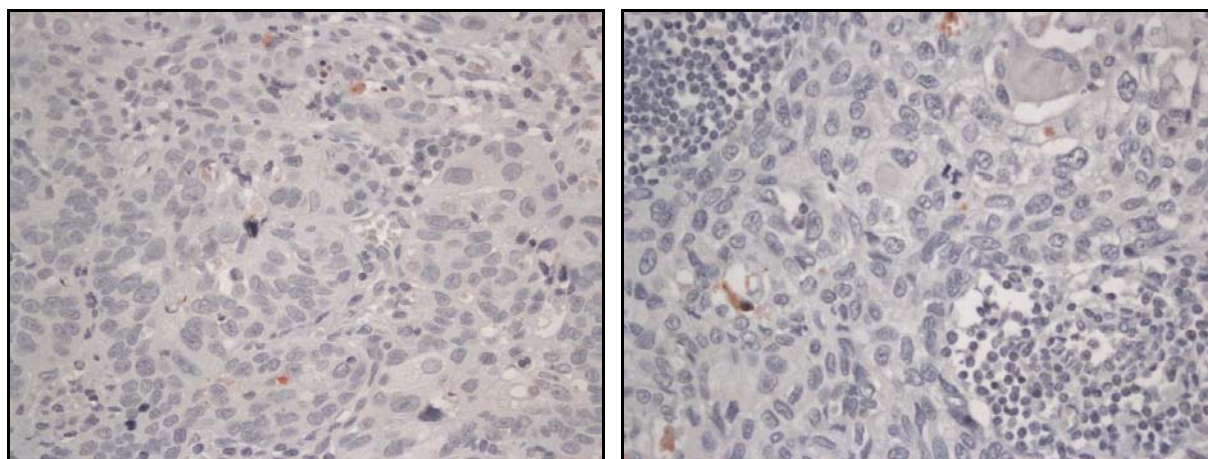


Figura 28. Expresión de caspasa-3 en el tumor primario (izquierda; x400) y en la metástasis ganglionar originada en el mismo (derecha; x400).

4.4.3. Relación entre la expresión de caspasa-3 y las distintas variables clínico-patológicas

En el estudio de las posibles correlaciones existentes entre la expresión de c-3 y las distintas variables clínico-patológicas, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la clasificación N y c-3 ($p=0,037$). Curiosamente, los tumores con índices

apoptóticos más elevados parecen desarrollar metástasis linfáticas con mayor facilidad que los carcinomas en los cuales existe un menor número de células en apoptosis.

Por el contrario, no hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de c-3 en el tumor primario y las clasificaciones T ($p=0,666$), el estadio TNM ($p=0,429$), o el grado histológico ($p=0,333$). Del mismo modo, tampoco hemos encontrado asociación entre la expresión de c-3 en las metástasis ganglionares y la clasificación N ($p=0,435$) (Tabla 18).

Tabla 18. Se representa el grado de significación estadística (p) asignado a la correlación existente entre la expresión de las 4 proteínas analizadas y los distintos parámetros clínico-patológicos, tanto en el tumor primario, como en las metástasis.

	HIF	p53	c-3	CD34
Expresión en el tumor primario				
T	0,016	0,102	0,666	0,444
N	0,507	0,129	0,037	0,133
Estadio	0,149	0,059	0,429	0,300
Grado histológico	0,094	0,149	0,333	0,462
Expresión en la MTX ganglionar				
N	0,593	0,181	0,435	0,234

MTX: Metástasis; Se representan en color rojo los valores de $p < 0,05$.

4.4.4. Relación entre la expresión de caspasa-3 y el pronóstico

La expresión de c-3 en el tumor primario no parece asociarse con una mayor incidencia de recidivas locales ($p=0,610$), regionales ($p=0,525$), o de segundos tumores primarios ($p=0,674$) (Tabla 19).

Resulta interesante destacar que, como ocurría con p53, la expresión de c-3 en las metástasis ganglionares se asocia con una mayor incidencia de recidivas regionales ($p=0,023$). Los pacientes cuyas metástasis ganglionares presentaban un mayor número de células en apoptosis tenían mayor probabilidad de desarrollar una recidiva regional que aquellos cuyas células metastásicas tenían una menor tendencia a entrar en apoptosis. Sin embargo, este

hallazgo no parece influir en la supervivencia de los pacientes, pues, ni el índice apoptótico del tumor primario (Figura 29), ni el de las metástasis ganglionares (Figura 30), parecen relacionarse con la supervivencia ($p=0,741$ y $p=0,659$ respectivamente) (Tabla 19).

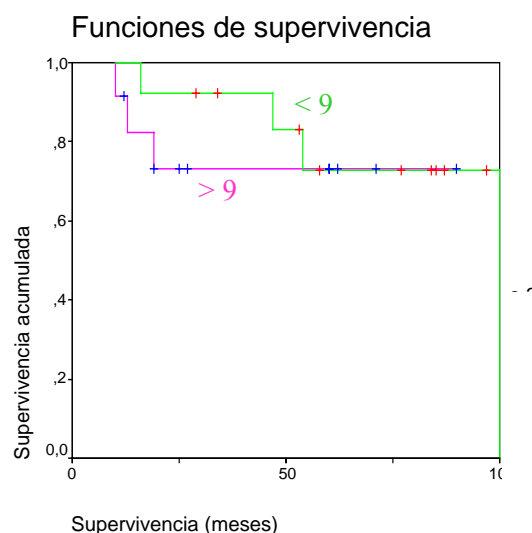
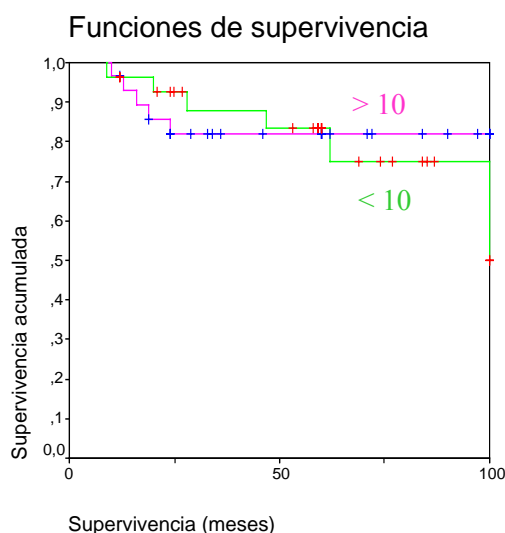


Figura 29. Curvas de supervivencia estratificadas según el número de células tumorales que expresan caspasa 3 en el tumor primario (punto de corte mediana; 10 células). (log-rank $p=0,741$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

Figura 30. Curvas de supervivencia estratificadas según el número de células tumorales que expresan caspasa 3 en las metástasis ganglionares (punto de corte mediana; 9 células). (log-rank $p=0,659$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

Tabla 19. Se representa el grado de significación estadística (p) asignado a la correlación existente entre la expresión de las 4 proteínas analizadas y varios factores pronósticos, tanto en el tumor primario, como en las metástasis.

	HIF	p53	c-3	CD34
Expresión en el tumor primario				
Recidiva local	0,756	0,227	0,610	0,074
Segundos tumores primarios	0,319	0,544	0,674	0,046
Supervivencia	0,464	0,711	0,741	0,252
Expresión en la MTX ganglionar				
Recidiva regional	0,647	0,020	0,023	0,814
Supervivencia	0,154	0,018	0,659	0,538

MTX: Metástasis; Se representan en color rojo los valores de $p < 0,05$.

4.4.5. Relación entre la expresión de caspasa-3, HIF-1 α y p53

No hemos encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 y c-3, ni en el tumor primario ($p=0,581$), ni en las metástasis ganglionares ($p=1$). Del mismo modo, no hemos hallado ninguna correlación entre la expresión de HIF-1 α y la de c-3 ($p=0,702$ en el primario; $p=0,080$ en las metástasis).

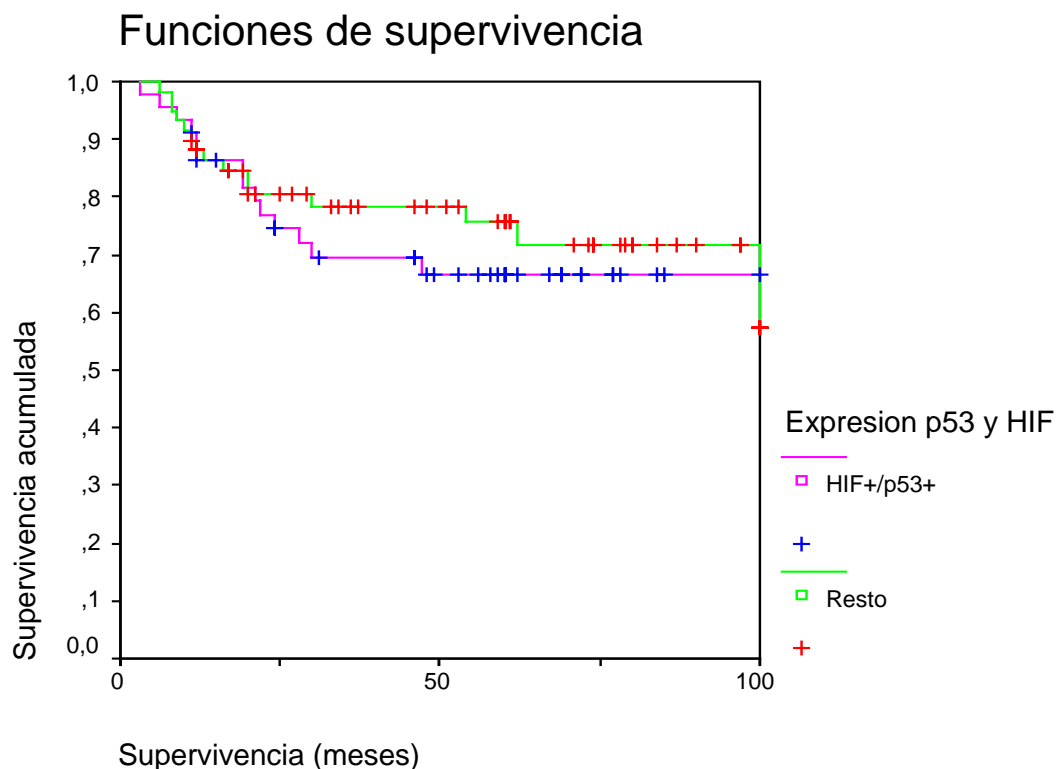


Figura 31. Curvas de supervivencia específicas para la enfermedad en las que se comparan los pacientes con sobre-expresión simultánea de HIF-1 α y p53 con el resto del grupo. (log-rank $p=0,517$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

La sobre-expresión de HIF-1 α en presencia de una proteína p53 funcional no parece asociarse con un aumento de la apoptosis pues, entre los pacientes que sobre-expresaban HIF-1 α en ausencia de inmuno-detección de p53, y el resto del grupo, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de caspasa-3 ($p=0,535$). Así

mismo, la influencia de la expresión de HIF-1 α en la supervivencia de los pacientes no se vio condicionada por la expresión de p53 ($p=0,585$). En oposición a lo publicado en trabajos previos, el subgrupo de pacientes que sobre-expresaba simultáneamente HIF-1 α y p53 no presentaba un peor pronóstico que el resto del grupo (Figura 31; $p=0,517$).

4.5. Expresión de CD34

4.5.1. Expresión de CD34 en carcinomas epidermoides supraglóticos

El número de vasos por milímetro cuadrado (mm^2), cuantificados en el área mejor vascularizada de cada tumor, oscilaba entre 18 y 206. La media fue de 73 vasos y la mediana de 68 (Figura 32). Como se puede deducir de las cifras expuestas, el grado de vascularización variaba ostensiblemente entre los distintos carcinomas estudiados (desviación estándar 34). La variabilidad no era sólo cuantitativa, sino que también tenía carácter cualitativo, dado que el patrón de vascularización difería de un tumor a otro. Mientras que unos tumores se nutrían desde la periferia, en otros, grandes ejes vasculares penetraban en su espesor, posibilitando, al menos teóricamente, un mayor flujo de oxígeno y nutrientes a las células tumorales.

4.5.2. Expresión de CD34 en las metástasis ganglionares de carcinomas epidermoides supraglóticos

El número de vasos por mm^2 en las metástasis ganglionares oscilaba entre 23 y 150. La media fue de 59 vasos y la mediana de 52. Al contrario de lo que ocurría con p53 y con c-3, no hemos hallado correlación entre la vascularización del tumor primario y la de los nidos tumorales presentes en los ganglios linfáticos (Tabla 17; Figura 33).

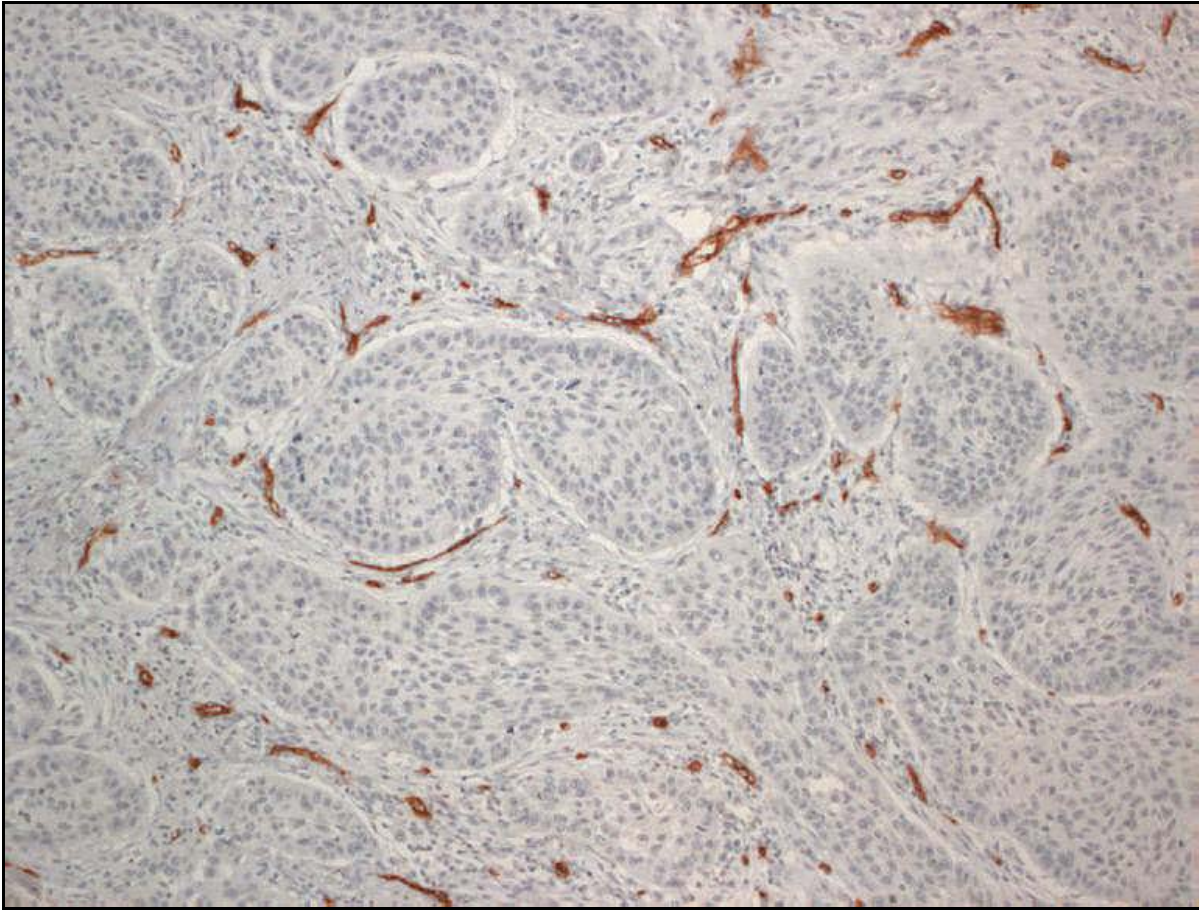


Figura 32. Expresión de CD34 en el tumor primario (200x).

El carácter independiente del grado de vascularización del tumor primario y de sus metástasis ganglionares, se demostraba tanto si se consideraba la expresión de CD34 como una variable cuantitativa continua ($p=0,273$), como si se codificaba como una variable cualitativa dicotómica, empleando como punto de corte la mediana ($p=0,603$).

4.5.3. Relación entre la expresión de CD34 y las distintas variables clínico-patológicas

La clasificación T, la N, el estadio TNM y el grado de diferenciación tumoral no se relacionaron con la densidad micro-vascular de los 116 tumores primarios estudiados ($p=0,444$, $p=0,133$, $p=0,300$ y $p=0,462$ respectivamente). Del mismo modo, no hemos hallado correlación entre el grado de vascularización de las metástasis ganglionares y la clasificación N ($p=0,234$) (Tabla 18).

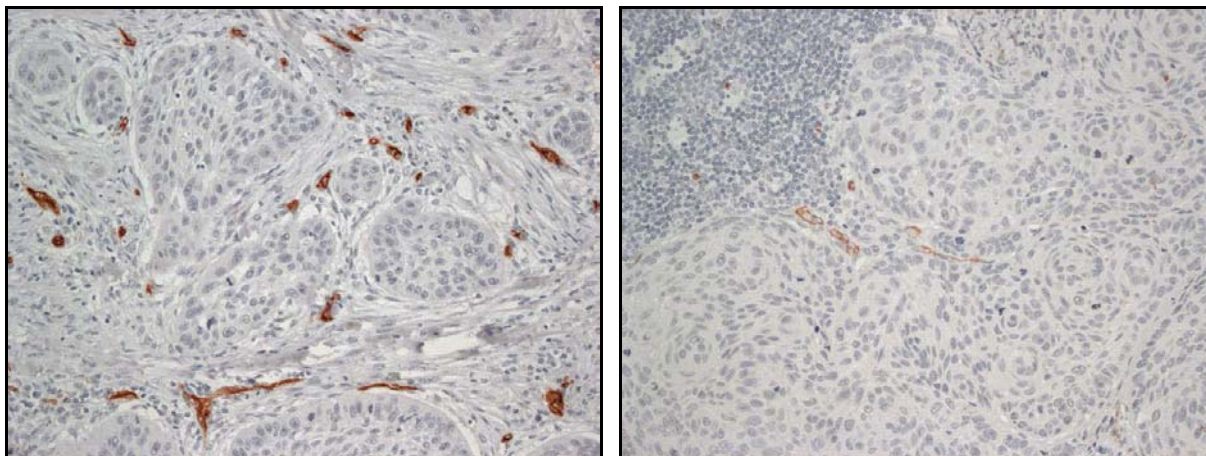


Figura 33. Expresión de CD34 en el tumor primario (izquierda; 400x) y en la metástasis ganglionar originada en el mismo (derecha; 400x). Se puede observar como mientras el tumor primario se encuentra bien vascularizado, la metástasis apenas tiene vasos sanguíneos.

4.5.4. Relación entre la expresión de CD34 y el pronóstico

Cuando se estudio la incidencia de segundos tumores primarios, se encontró que éstos eran más frecuentes en aquellos pacientes con tumores mal vascularizados. No obstante, la significación estadística de este hallazgo es escasa ($p=0,046$), y más que una asociación evidente parece indicar una tendencia. En esta línea, resulta interesante destacar que no hemos encontrado correlación entre el grado de vascularización tumoral y la incidencia de recidivas locales ($p=0,074$) aunque la tendencia mostrada sigue siendo la misma, es decir, los tumores menos vascularizados recidivan más que sus homólogos mejor perfundidos. Sin embargo, no se encontró correlación entre la vascularización del tumor primario y la incidencia de recidivas regionales ($p=1$). Tampoco se halló ninguna asociación entre la vascularización de las metástasis ganglionares y la incidencia de recidivas regionales ($p=0,814$) (Tabla 19).

En las Figuras 34 y 35 se muestran, respectivamente, las funciones de supervivencia de los pacientes según el grado de vascularización de los tumores primarios y el de sus metástasis ganglionares. En ninguno de los 2 casos, el peor pronóstico de los pacientes con tumores menos vascularizados alcanzó la significación estadística ($p=0,252$ y $p=0,538$,

respectivamente). No obstante, se mantiene la tendencia observada al estudiar la incidencia de segundos tumores primarios y de recidivas locales, es decir, los tumores con una menor densidad micro-vascular, presentan un pronóstico ligeramente peor que aquellos tumores mejor vascularizados.

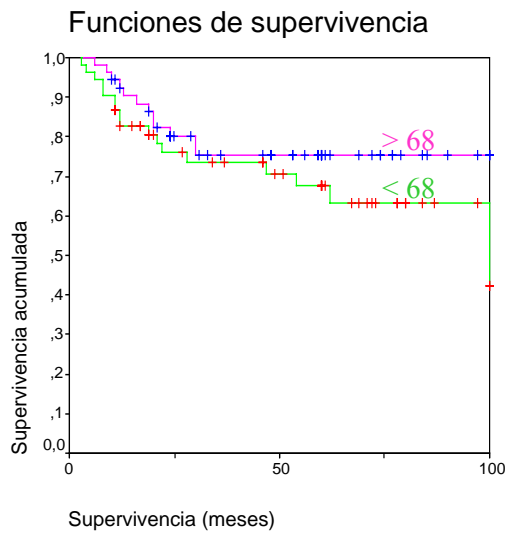


Figura 34. Curvas de supervivencia estratificadas según el número de células tumorales que expresan CD34 en el tumor primario (punto de corte mediana; 68 células). (log-rank $p=0,252$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

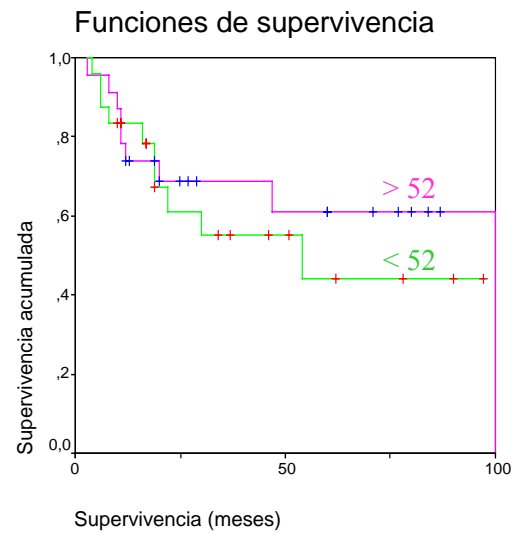


Figura 35. Curvas de supervivencia estratificadas según el número de células tumorales que expresan CD34 en las metástasis ganglionares (punto de corte mediana; 52 células). (log-rank $p=0,538$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

4.5.5. Relación entre la expresión de CD34, HIF-1 α , p53 y c-3

No hemos encontrado ninguna asociación entre el grado de vascularización tumoral y la expresión de HIF-1 α , ambas variables se comportaban de forma independiente, tanto en el tumor primario ($p=0,621$) como en las metástasis ganglionares ($p=0,545$).

Cuando se analizó la relación entre la expresión de CD34 y variables como p53 o c-3 nos encontramos con resultados similares. Es decir, la expresión de p53 no parece influir en el

grado de vascularización del tumor ($p=0,217$ en el primario y $p=0,721$ en la metástasis), ni tampoco la de c-3 ($p=0,208$ en el primario y $p=0,536$ en la metástasis).

Cuando estudiamos la supervivencia del subgrupo de pacientes con tumores pobremente vascularizados (baja expresión de CD34), que sobre-expresaban HIF-1 α y p53, al tiempo que presentaban bajos índices apoptóticos (baja expresión de caspasa-3), encontramos que su supervivencia era marcadamente inferior a la del resto de pacientes (75% vivos a los 5 años versus 47%) (Figura 36). A pesar del bajo número de individuos que constituían este subgrupo (19 pacientes), la diferencia alcanzó significación estadística ($p=0,012$).

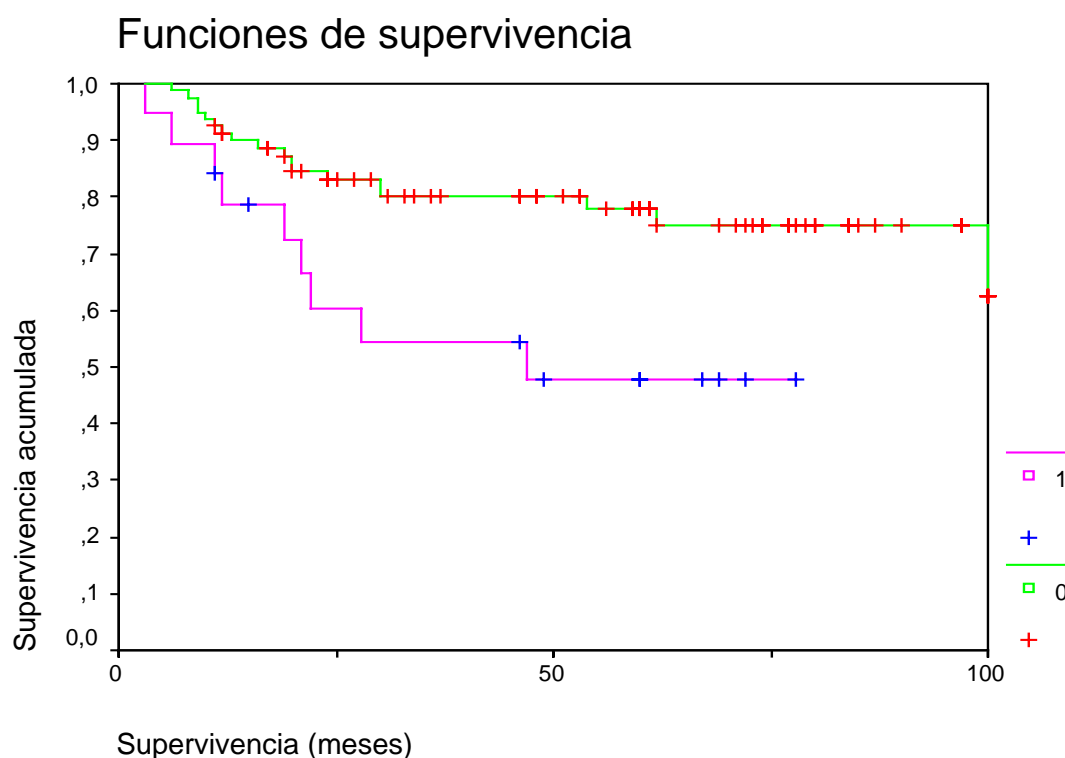


Figura 36. Curvas de supervivencia estratificadas según la expresión de CD34, HIF-1 α , p53 y caspasa-3. El grupo 1 esta constituido por los pacientes con bajos niveles de CD34 y de c-3 y elevada expresión de HIF-1 α y de p53. El grupo 0 por todos aquellos pacientes que no reúnen esta combinación de variables (log-rank $p=0,012$). Mediante cruces se representan los casos censurados en el análisis.

4.6. Modelo murino de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

Con la intención de estudiar *in vivo* el papel de HIF-1 α en la génesis y progresión de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello hemos desarrollado un modelo murino capaz de reproducir el comportamiento de estos tumores en humanos. Para ello, en una primera fase, realizamos un estudio del sistema de drenaje linfático del suelo de la boca de los ratones. Posteriormente, en una segunda fase, inoculamos la línea celular SCC38, desarrollada a partir de un carcinoma epidermoide glótico. Tras demostrar la viabilidad del modelo, y comprobar que los tumores desarrollados reproducían en múltiples aspectos el comportamiento de sus homólogos humanos, pasamos a la tercera fase del estudio. En ella, analizamos los tumores desarrollados por la línea celular SCC38, tras ser manipulada genéticamente para sobre-expresar una variante funcional de HIF-1 α , estable en normoxia. Mediante la comparación *in vivo* de las características anatomopatológicas de los tumores generados por ambas líneas celulares, hemos podido profundizar en el conocimiento del papel que HIF-1 α juega en el desarrollo y progresión de estos carcinomas.

4.6.1. Estudio piloto

La caracterización del sistema de drenaje linfático del suelo de la boca de los ratones se realizó mediante la inoculación submucosa, en esta localización, de azul de metileno en ratones inmunocompetentes. La primera estación de drenaje estaba constituida por 1 ó 2 ganglios linfáticos localizados en el espesor de las glándulas submaxilar y sublingual (glándulas que en estos animales se encuentran muy desarrolladas y en íntimo contacto entre sí), aproximadamente a la altura del tendón del músculo digástrico (Figura 37). Cuando se esperaban 20 minutos para sacrificar el animal (5 minutos más de los necesarios para ver la tinción de los primeros ganglios) se podía observar que el colorante vital migraba desde la localización descrita hasta los pequeños ganglios localizados en la cadena yugular. Así, en los

ratones atímicos tanto los ganglios submaxilares como los de la cadena yugular fueron extraídos de forma sistemática para buscar en ellos la presencia de metástasis regionales.

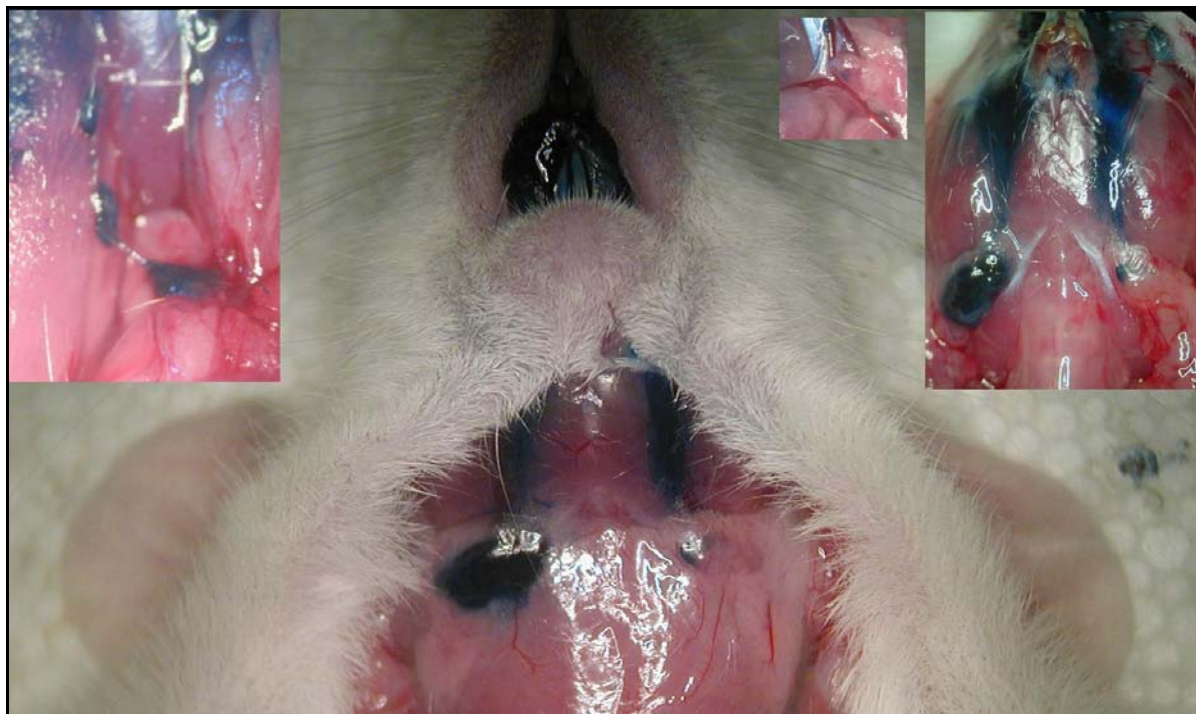


Figura 37. Distintos momentos de la disección cervical de un ratón inmunocompetente tras inyección de azul de metileno en el suelo de la boca. Se pone así de manifiesto el sistema de drenaje linfático de esta localización.

4.6.2. Inyección de SCC38

En una segunda fase de nuestro estudio, se procedió a la inoculación de la línea SCC38 y posteriormente a la necropsia de los animales, tal como se indica en la sección Material y Métodos. La capacidad carcinogénica de la línea empleada quedó puesta de manifiesto por el elevado porcentaje de tumores desarrollados en nuestro experimento. Así, el 90% (18 de 20) de los ratones inoculados con SCC38 desarrollaron tumores.

Los tumores desarrollados resultaron ser muy homogéneos. Todos ellos eran tumores bien vascularizados, sin áreas de necrosis y moderadamente diferenciados (grado II de Broders) (Figura 38). Este grado de diferenciación era el mismo que presentaba el tumor glótico a partir del cual se desarrolló la línea celular SCC38. La media de las mitosis

contabilizadas por campo de gran aumento se situó en 5. El volumen medio de los 18 tumores fue de 32 mm³ (desviación estándar 12,5). Los tumores demostraron una gran agresividad local, invadiendo sistemáticamente el tejido muscular lingual mediante pequeños cordones e hileras celulares, presentando un límite con el tejido sano adyacente mal definido.

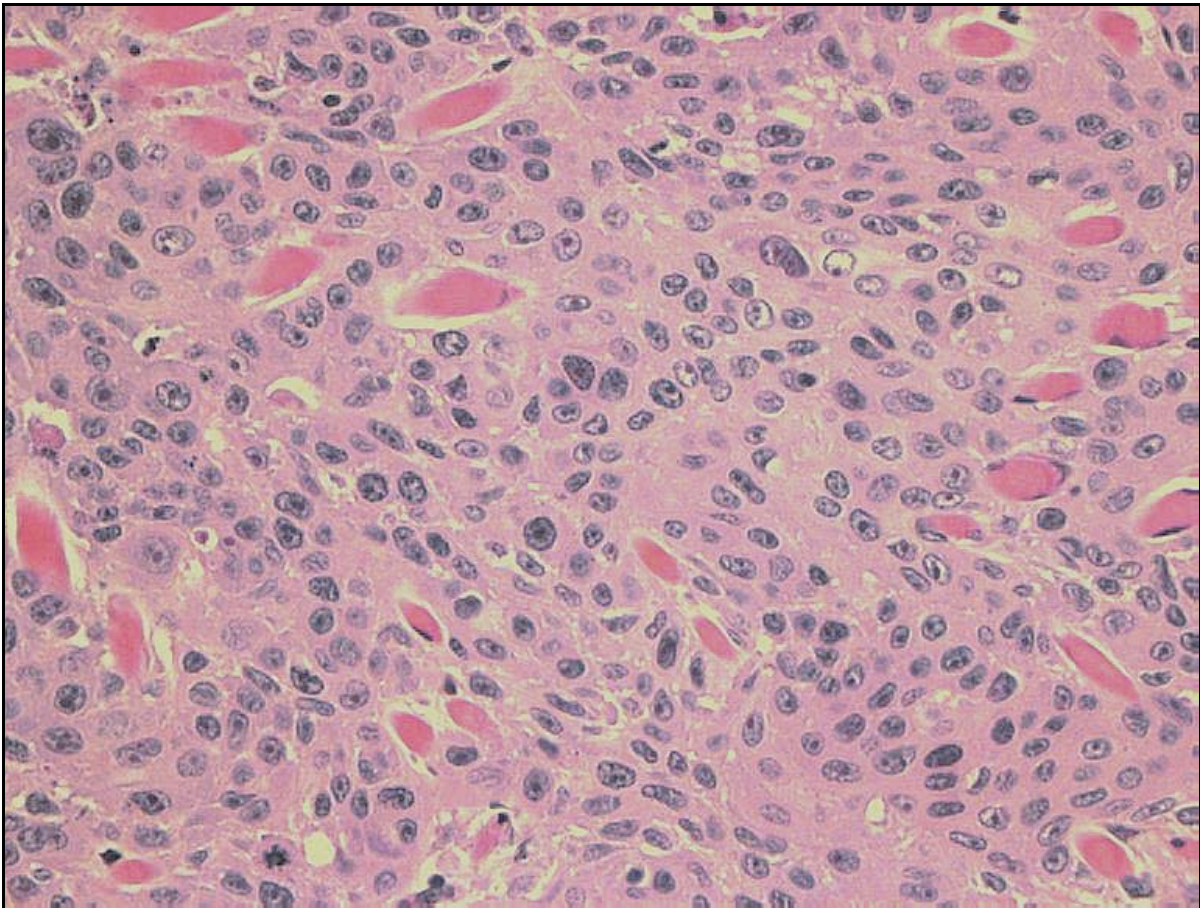


Figura 38. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Se pueden observar células musculares entre las células tumorales (400x).

Las células tumorales también demostraron una evidente capacidad de crecimiento perineural, pues invadían sistemáticamente el nervio lingual y ocasionalmente el hipogloso, e incluso en un caso, en el cual el tamaño del tumor era tal que erosionó la mandíbula y creció hasta la fosa infratemporal, encontramos afectación de la 3^a rama del nervio trigémino (Figura 39). La disposición anatómica de los tumores desarrollados hizo que la invasión ósea fuese un fenómeno poco frecuente, pues raramente el tumor crecía hasta ponerse en contacto con la mandíbula. Sin embargo, en los 4 tumores en los cuales su tamaño y localización los llevó a

contactar con el maxilar, se pudo demostrar erosión ósea, poniendo así de manifiesto la capacidad de SCC38 para invadir el hueso (Figura 39). El 72% de los ratones que desarrollaron tumores (13/18) sufrieron, en diferentes grados, afectación del epitelio de la mucosa oral, manifestándose macroscópicamente por la presencia de úlceras intraorales.

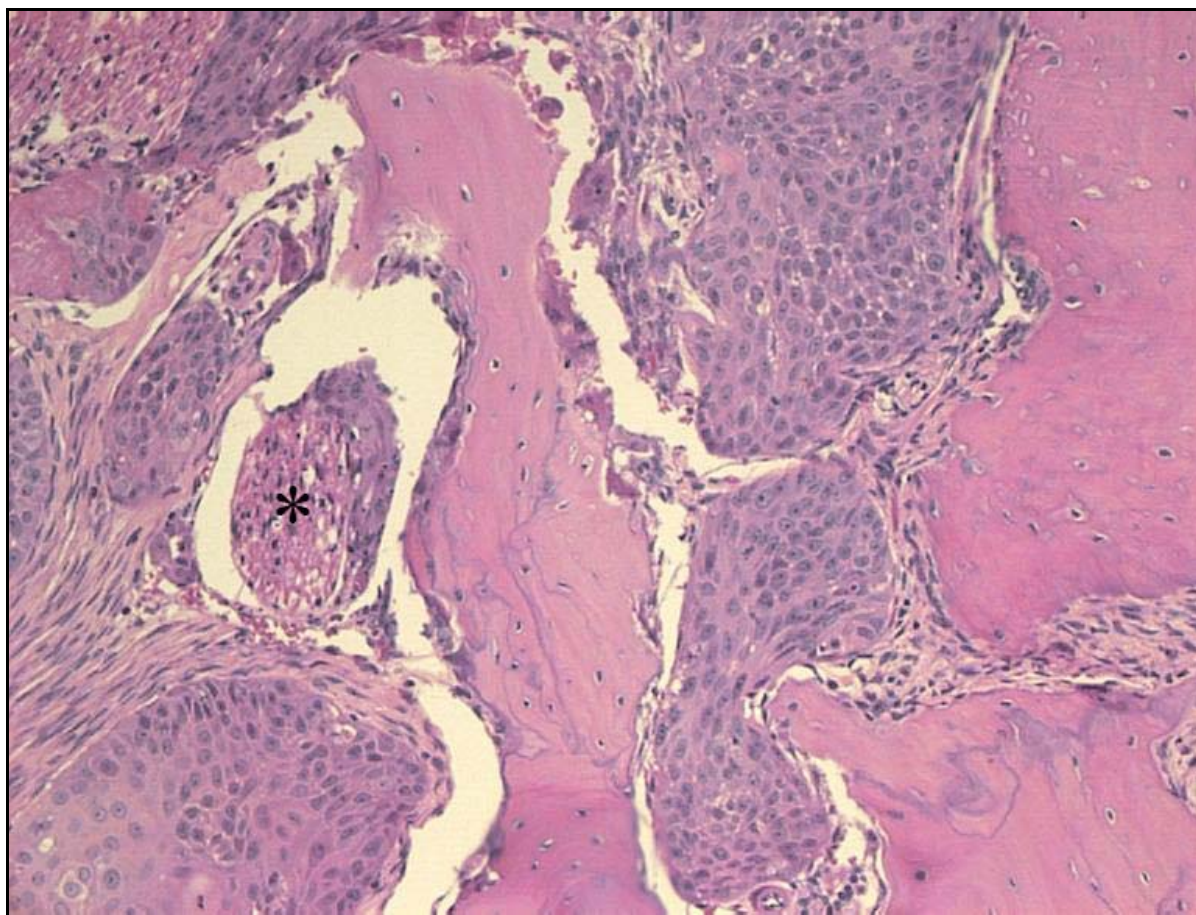


Figura 39. Carcinoma epidermoide erosionando la mandíbula. Se aprecia el nervio dentario inferior invadido por las células tumorales (asterisco) (200x).

La invasión de arterias y venas resultó ser un fenómeno poco frecuente, pues sólo en 3 de los animales se encontró embolización intraluminal y en los 3 casos se trataba de vasos intratumorales. En ninguno de los animales se observó afectación de vasos sanguíneos situados fuera de la masa tumoral. Por el contrario, en todos los casos se podía demostrar embolización del sistema linfático por parte de las células tumorales, poniendo así de manifiesto el gran tropismo por los vasos linfáticos que presentan estas células. Estos émbolos se podían seguir a lo largo de los distintos cortes histológicos, desde su origen en las

proximidades del tumor primario, hasta su llegada a los ganglios linfáticos regionales, pasando por toda la longitud del pedículo facial (Figura 40).

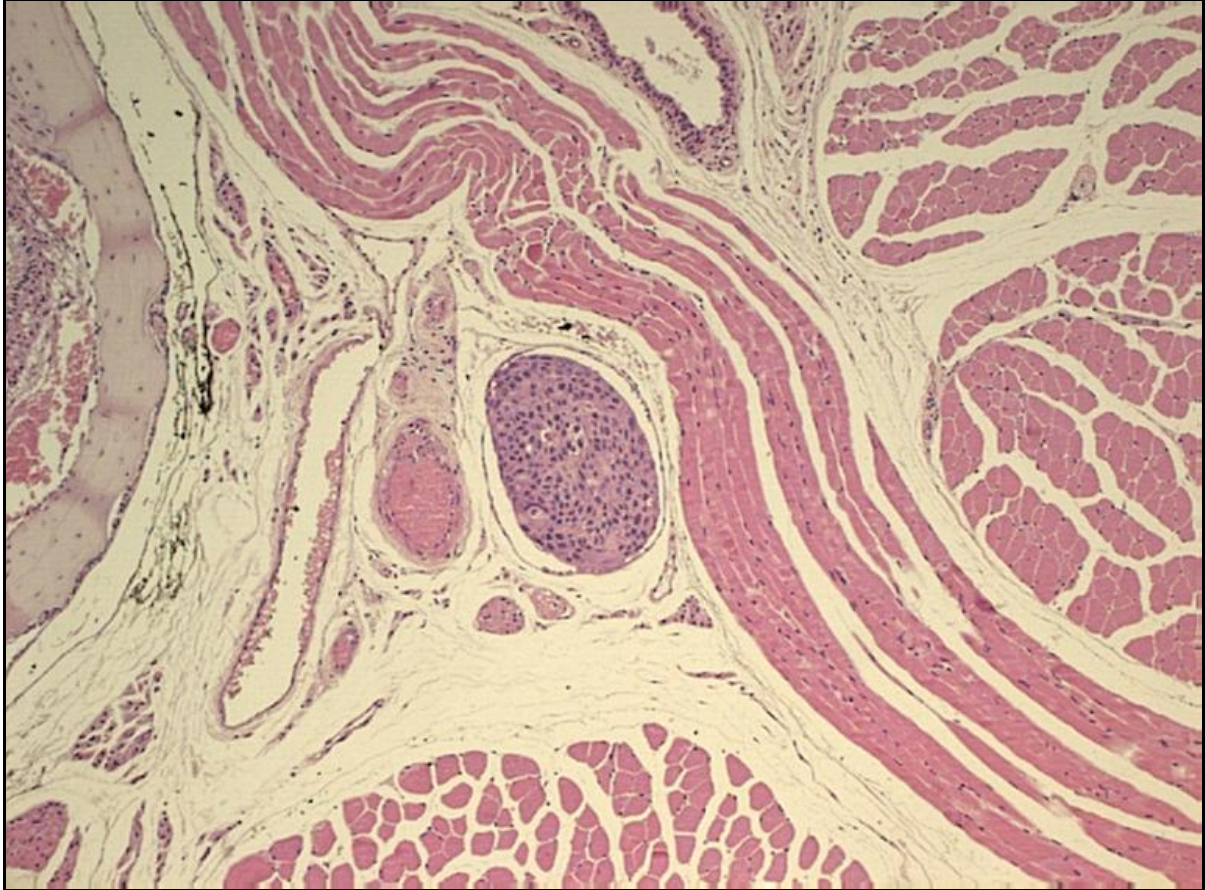


Figura 40. Embolo de células tumorales en el interior de un vaso linfático que se encuentra formando parte del pedículo facial (100x).

Todos los ratones que desarrollaron tumores (n=18), presentaron metástasis ganglionares. Estas metástasis regionales siempre afectaban al primer ganglio de drenaje, localizado a nivel submaxilar. Doce de los 18 ratones que desarrollaron tumores presentaban metástasis unilaterales (66%), mientras que en los 6 ratones restantes se encontraron metástasis bilaterales (33%). Las metástasis linfáticas eran de pequeño tamaño, oscilando entre las 50 y las 700 μm de diámetro máximo. Las células tumorales se localizaban en el ganglio invadiendo el seno marginal y la región paracortical (Figura 41).

Ninguno de los animales presentó metástasis hematógenas en los órganos evaluados (pulmón, hígado y bazo).

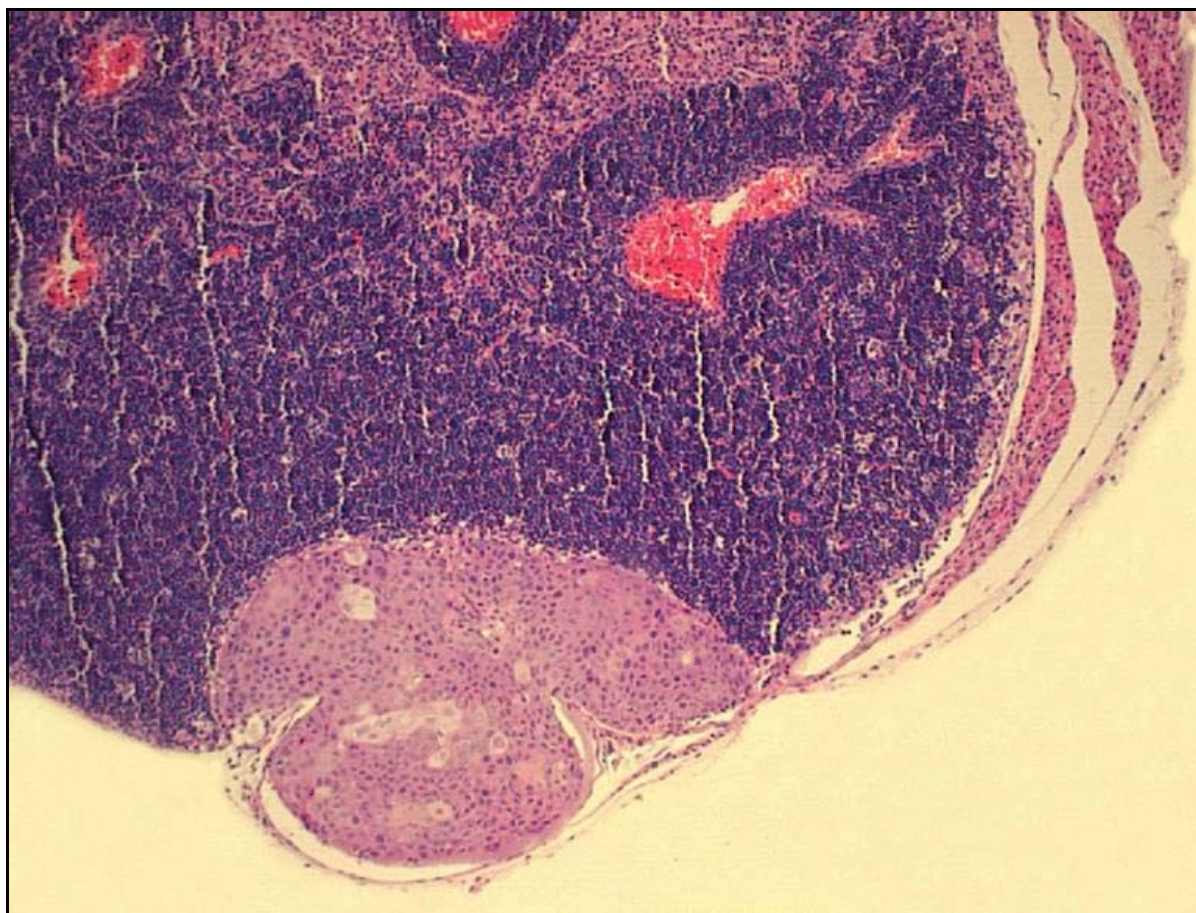


Figura 41. Metástasis linfática. Se puede observar como las células tumorales están entrando en el ganglio desde el vaso linfático (100x).

4.6.3. Expresión de HIF-1 α en SCC38 y SCC38pWZL-HIF-1 α

Mediante el análisis de los extractos proteicos obtenidos de la línea celular SCC38, y del transfectante estable desarrollado a partir de la manipulación genética de la misma (SCC38pWZL-HIF-1 α), hemos podido confirmar, tanto la eficacia de la transfección, como la ausencia de expresión de HIF-1 α en normoxia por parte de la línea nativa. Los resultados del western blot demuestran que, mientras en normoxia en la línea nativa no somos capaces de detectar expresión de HIF-1 α , en el transfectante estable, en cuyo genoma hemos insertado el gen HIF-1 α mutante, es posible detectar elevadas concentraciones de la proteína (Figura 42).

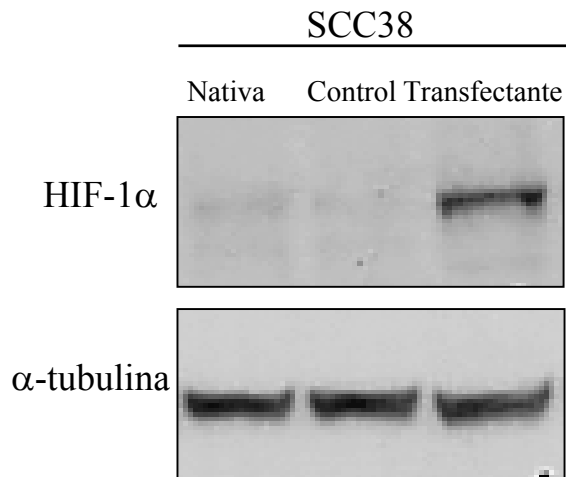


Figura 42. Western blot en el cual se pone de manifiesto la sobre-expresión en normoxia de HIF-1 α en el transfectante estable y la ausencia de expresión en la línea nativa. En las tres columnas mostradas se representan de izquierda a derecha: Línea SCC38 no manipulada genéticamente. Línea SCC38 empleada como control, transfectada con el plásmido pWZL. Línea transfectada establemente con el gen mutante HIF-1 α -P402A-P564G. La proteína α -tubulina se empleó como control de carga de los extractos proteicos.

La inmunohistoquímica practicada en los tumores inducidos en los ratones, puso de manifiesto como la expresión de HIF-1 α , demostrada *in vitro* en el transfectante estable, se mantenía *in vivo*. Por el contrario, en los tumores desarrollados por la línea nativa no era posible detectar expresión de HIF-1 α (Figura 43).

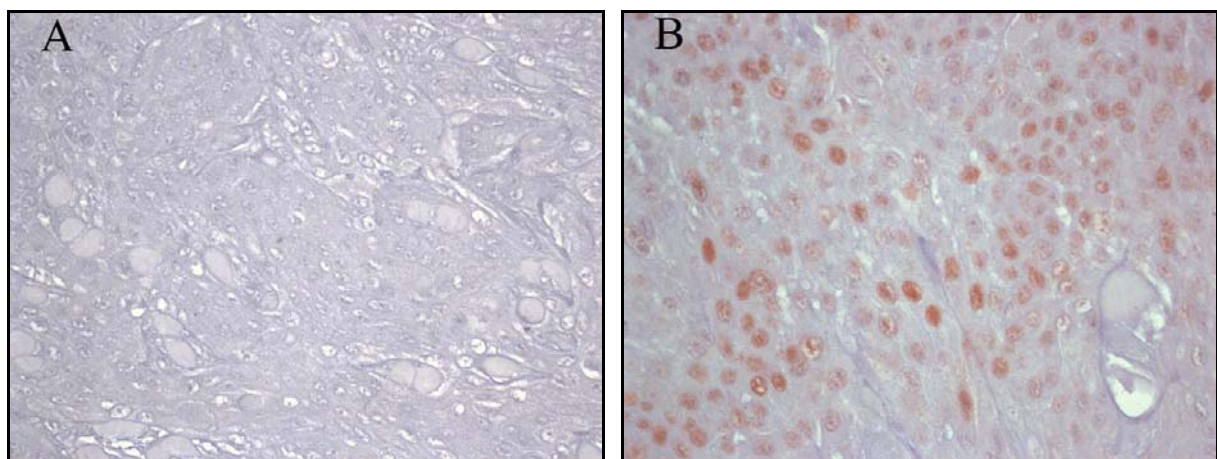


Figura 43. Inmunohistoquímica de HIF-1 α . Se muestra como los tumores desarrollados por la línea celular SCC38 nativa no expresan HIF-1 α (A), mientras que sí se detecta expresión en los tumores inducidos por el transfectante estable (B) (x400).

4.6.4. Inyección del transfectante estable

El 90% de los ratones inoculados con el transfectante estable desarrollaron tumores. Como ocurría con los tumores inducidos por la línea nativa, los carcinomas desarrollados por el transfectante resultaron ser muy homogéneos entre sí.

Las distintas variables anatomopatológicas evaluadas apenas presentaron diferencias entre los tumores desarrollados por la línea nativa y los desarrollados por el transfectante estable capaz de sobre-expresar HIF-1 α . Los tumores estaban bien vascularizados y no presentaban áreas de necrosis. Como previamente habíamos demostrado mediante inmunohistoquímica en los carcinomas epidermoides supraglóticos, la sobre-expresión de HIF-1 α no influyó en el grado de diferenciación tumoral, pues los tumores inducidos por el transfectante estable mostraron el mismo grado de diferenciación que los inducidos por la línea SCC38 previamente a su manipulación (grado II de Broders). Los tumores desarrollados por la línea mutante presentaban límites imprecisos, mostrando bordes mal definidos, constituidos por pequeños cordones celulares. La media de las mitosis contabilizadas por campo de gran aumento se situó en 5. El tamaño tumoral medio fue de 29 mm³ (desviación estándar 11,7). Las diferencias en los tamaños de los tumores desarrollados por ambas líneas no alcanzaron significación estadística ($p=0,461$). Del mismo modo, como previamente había ocurrido con los tumores derivados de SCC38, las células tumorales demostraron un gran neurotropismo, invadiendo sistemáticamente el nervio lingual. Sólo en 1 de los ratones el tamaño alcanzado por el tumor hizo que éste se pusiera en contacto con la mandíbula y, como en el caso de la línea nativa, las células tumorales invadieron el hueso. En el 66% de los animales (6/9) los tumores dieron lugar a la afectación del epitelio de la mucosa oral, manifestándose macroscópicamente por la presencia de úlceras intraorales.

En ninguno de los animales se pudo demostrar invasión arterial o venosa. La expresión de HIF-1 α por parte del transfectante estable no pareció afectar al marcado linfotropismo mostrado por SCC38, pues todos los animales que desarrollaron tumores presentaron tanto émbolos linfáticos en la proximidad del tumor, como metástasis en los ganglios de drenaje correspondientes. Como había ocurrido en el caso de SCC38, estas metástasis sistemáticamente se localizaban en la región paracortical del primer ganglio de drenaje,

localizado a la altura del tendón del músculo digástrico. Ocho de los 9 ratones que desarrollaron tumores presentaban metástasis unilaterales (89%), mientras que en el ratón restante se encontraron metástasis bilaterales (11%). Como en el caso de SCC38, las metástasis linfáticas eran de pequeño tamaño, oscilando entre las 50 y las 900 μm de diámetro máximo. La presencia de metástasis linfáticas uni o bilaterales parece condicionada por la extensión del tumor, pues aquellos tumores que sobrepasaban el rafe lingual medio desarrollaron metástasis bilaterales, mientras que los tumores que permanecían confinados en un lateral de la lengua, daban lugar a una diseminación linfática exclusivamente ipsilateral.

Como se había observado con la línea nativa, ninguno de los animales inoculados con el transfectante estable desarrolló metástasis hematógenas en los órganos evaluados (pulmón, hígado y bazo).

DISCUSIÓN

La expresión de HIF-1 α se ha estudiado mediante inmunohistoquímica en una gran variedad de tumores humanos. Estos trabajos han mostrado que mientras HIF-1 α apenas se expresa en los tejidos normales, se encuentra sobre-expresado en una gran parte de los tumores analizados^{124,125}. Aunque su sobre-expresión se ha correlacionado con un peor pronóstico en múltiples tipos de cáncer, esta asociación no se ha encontrado en todos los tumores estudiados. En el caso concreto de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, los distintos estudios publicados aportan resultados contradictorios^{131,133,135,136,151}. Dos trabajos han asociado la sobre-expresión de HIF-1 α con un peor pronóstico^{135,136}, mientras que otros dos lo han hecho con un pronóstico más favorable^{131,133}. Entre ambos se encuentran los resultados de un quinto estudio, en el cual no han encontrado correlación entre la supervivencia de los pacientes y la expresión de HIF-1 α . Así pues, el papel que HIF-1 α desempeña en este grupo de tumores es aún incierto. Si al potencial valor pronóstico de la expresión de HIF-1 α , le añadimos la posibilidad de emplear sus inhibidores en el tratamiento de esta enfermedad (algunos de los cuales se encuentran ya incluidos en ensayos clínicos –ver Introducción-), resulta obvia la necesidad de dilucidar el papel que HIF-1 α juega en el desarrollo de este tipo de carcinomas.

Guiados por esta necesidad, nos planteamos un estudio sistemático de un importante número de casos bien seleccionados. Para ello, elegimos 116 pacientes con carcinomas epidermoides de la misma localización, todo ellos supraglóticos. Este hecho resulta fundamental si tenemos en cuenta la conjunción de dos fenómenos. Por un lado, está la demostrada capacidad de HIF-1 α de comportarse, bien como un oncogén, bien como un gen supresor de tumores, en función de los cambios genéticos y epigenéticos que el tumor concreto que estamos estudiando haya adquirido. Por otro lado, hemos de tener en cuenta que los tumores de diferentes localizaciones anatómicas (faringe, laringe y cavidad oral), se asocian con factores etiológicos distintos y conllevan pronósticos diferentes. En ello influyen no sólo la distinta exposición a los factores de riesgo, la mayor o menor demora en la aparición de síntomas, o la variabilidad en la densidad del sistema de drenaje linfático de las diferentes localizaciones, sino que también presentan diferentes alteraciones moleculares^{152,153,154}. Por lo tanto, probablemente las consecuencias de la sobre-expresión de

HIF-1 α en un carcinoma epidermoide glótico, sean distintas a las consecuencias que esa misma sobre-expresión puede tener en un carcinoma epidermoide originado en la cavidad oral. Así pues, resulta evidente la necesidad de seleccionar un grupo de pacientes lo más homogéneo posible en cuanto a la localización de sus tumores.

Otro aspecto fundamental a tener en cuenta a la hora de plantear este tipo de estudios es la modalidad terapéutica elegida, pues como hemos expuesto en la introducción, HIF-1 α tiene la capacidad de modificar los efectos de la radioterapia y de la quimioterapia. Así pues, con la intención de introducir el menor número posible de sesgos, seleccionamos los pacientes de modo que en todos ellos el tratamiento de elección fuera la cirugía, a la que se le añadió radioterapia en los estadios avanzados (ver sección Material y Métodos).

Por lo tanto, la homogeneidad de la muestra en cuanto a la localización y al tratamiento de los tumores, el elevado número de pacientes, y el largo periodo de seguimiento, dotan de especial consistencia a las conclusiones que se puedan extraer de este trabajo. Junto a estas características destaca una novedad que nuestro estudio añade a los previamente publicados, el análisis simultáneo de las metástasis ganglionares. Este dato resulta de especial relevancia si tenemos en cuenta que, el factor pronóstico más importante en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, en el momento actual, sigue siendo la presencia de metástasis linfáticas, hecho que contrasta con el gran desconocimiento que aún rodea a los mecanismos implicados en su génesis.

Al estudiar la expresión de HIF-1 α en la mucosa sana adyacente a los tumores, hemos encontrado inmunorreactividad para HIF-1 α a nivel citoplasmático. Esta inmunorreactividad se encontraba restringida a las capas más superficiales del epitelio (estratos superficial e intermedio). Este patrón de expresión ya había sido descrito en la mucosa sana adyacente a carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, en la mucosa de la nasofaringe¹⁸⁷, del intestino grueso, del cérvix uterino¹⁸⁸ y en los estadios precoces del carcinoma esofágico¹⁸⁹. Esta localización citoplasmática sugiere la existencia de una forma transcripcionalmente no activa de HIF-1 α , pues se trata de un factor de transcripción y por tanto de una proteína que lleva a cabo su función en el compartimiento nuclear.

En los carcinomas epidermoides supraglóticos la expresión de HIF-1 α resultó ser un fenómeno frecuente, pues se observó en el 71% de los casos, lo que concuerda con los trabajos publicados hasta el momento sobre su expresión en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello^{131,133,135,136,151}, y en tumores de otras localizaciones. La expresión de HIF-1 α

se caracterizaba por presentar una localización nuclear, y una distribución heterogénea en el espesor de la masa tumoral, patrón de distribución que ya había sido descrito en anteriores publicaciones^{131,132,136}. Al contrario de lo que cabría esperar en virtud de las funciones fisiológicas atribuidas en la literatura a este factor de transcripción, su distribución era independiente de la proximidad de las células tumorales a los vasos sanguíneos y a las áreas de necrosis. Así, mientras que en algunos tumores HIF-1 α se expresaba en las células próximas a las áreas necróticas, en otros no lo hacía o, por el contrario, se expresaba en las células adyacentes a los vasos sanguíneos. Este mismo patrón se ha encontrado en tumores de otras localizaciones, como puede ser el caso de los carcinomas de mama o los carcinomas del cérvix uterino¹⁹⁰. Por el contrario, esta distribución contrasta con la descrita en los gliomas, pues en ellos, las células inmunorreactivas se disponen en torno a las áreas necróticas. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos implicados en su regulación, probablemente difieran según el tumor concreto que estemos analizando. En el caso de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, como ocurría con el pronóstico, los resultados publicados hasta el momento muestran datos contradictorios, pues mientras algunos autores encuentran relación entre la expresión de HIF-1 α y las áreas necróticas de los tumores^{131,133}, otros no han podido reproducir estos resultados.

En definitiva, el estudio histopatológico de la expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides supraglóticos sugiere que, los mecanismos que regulan su expresión independientemente de la concentración intracelular de oxígeno, pueden ser importantes en este tipo de tumores. Este hallazgo se ve apoyado por la ausencia de correlación entre HIF-1 α y CD34, es decir, la expresión de HIF-1 α y el grado de vascularización del tumor se comportan como variables independientes.

La sobre-expresión de HIF-1 α en áreas bien perfundidas puede ser explicada por la presencia de mutaciones en genes supresores de tumores y en proto-oncogenes, como puede ser el caso de todas aquellas mutaciones capaces de activar la ruta de PI3K/AKT⁴⁶ (mutaciones con elevada prevalencia en estos carcinomas¹⁹¹). En esta ruta confluyen una gran cantidad de estímulos, que por lo tanto podrían dar lugar a la sobre-expresión de HIF-1 α en normoxia (insulina, IGF¹⁹², IL-1, TNF- α ¹⁹³, angiotensina-II¹⁹⁴, EGF, trombina¹⁹⁵ o metabolitos de la glucólisis¹⁹⁶). Puesto que las células tienen una dependencia absoluta del oxígeno molecular para su supervivencia, a lo largo de la evolución, la regulación de HIF-1 α ha adquirido la suficiente plasticidad, como para permitir la adaptación celular a un medio

cuyas presiones parciales de oxígeno no son constantes. Así, la consecuencia ha sido el desarrollo de unos mecanismos de regulación muy complejos, y a menudo redundantes. Ante esta complejidad, no resulta sorprendente, en el contexto de una célula tumoral, en la cual una gran parte de los procesos implicados en el control de sus funciones fisiológicas se encuentran alterados, que estas alteraciones afecten a la regulación de una molécula como HIF-1 α , en cuyo control se encuentran implicadas múltiples rutas de señalización intracelular. Así, junto con las mutaciones descritas en oncogenes y genes supresores de tumores, mutaciones en las PHD's, o en otras proteínas recientemente implicadas en su regulación, como OS-9, pueden llevar a la acumulación de HIF-1 α en condiciones de normoxia. Aún más, mutaciones en enzimas implicados en el ciclo de Krebs, como la fumarato hidratasa¹⁹⁷, o la succinato deshidrogenasa¹⁹⁸, conllevan una inhibición de las PHD's. Las mutaciones de estas proteínas pueden tener como consecuencia la acumulación de fumarato y succinato, moléculas que compiten con el α -cetoglutarato por su unión a las PHD's –ver introducción 1.4.2-, con la consiguiente acumulación de HIF-1 α en normoxia.

Por el contrario, la ausencia de expresión de HIF-1 α en las inmediaciones de áreas necróticas, o en tumores mal vascularizados, sugiere la existencia de mecanismos capaces de impedir su acumulación en condiciones de hipoxia. Así, concentraciones elevadas de óxido nítrico serían capaces de inducir, en condiciones de hipoxia, la degradación de HIF-1 α por parte de las PHD's, justificando el patrón de distribución hallado en algunos de nuestros tumores. En esta línea, publicaciones recientes ponen de manifiesto cómo las células tumorales son capaces de desencadenar una respuesta adaptativa a un entorno hipóxico, independientemente de HIF-1 α . Estos datos provienen fundamentalmente de experimentos llevados a cabo en carcinomas colo-rectales. En ellos, se ha demostrado que es posible inducir la actividad de VEGF en condiciones de hipoxia, a pesar de haber eliminado la región promotora reconocida por HIF-1¹⁹⁹. También se ha demostrado que la expresión de VEGF en hipoxia, apenas varía entre dos líneas desarrolladas a partir de carcinomas de colón, una de las cuales expresaba HIF-1 α mientras que la otra no lo hacía (esta segunda se desarrolló a partir de la primera manipulándola para evitar la expresión de HIF-1 α). Del mismo modo, los tumores inducidos en ratones por ambas líneas presentaban densidades vasculares idénticas²⁰⁰. La posibilidad de desarrollar una respuesta celular a la hipoxia independientemente de HIF-1 α se vio refrendada por los recientes resultados de Helton y colaboradores, quienes demostraron que hasta 69 genes considerados clásicamente como

sustratos de HIF-1 se pueden transcribir en condiciones de hipoxia en ratones deficientes en HIF-1 α .

Como hemos comentado previamente, en los carcinomas epidermoides supraglóticos la expresión de HIF-1 α es independiente del grado de vascularización tumoral. Por el contrario, en tumores de mama, oligodendrogliomas, carcinomas endometriales, tumores estromales del tracto gastrointestinal o carcinomas colo-rectales²⁰¹, se ha podido demostrar una asociación entre la densidad vascular y la expresión de HIF-1 α , siendo esta mayor en los tumores mejor vascularizados. Sin embargo, nuestro estudio no es el primero en mostrar resultados diferentes. Yoshimura y colaboradores, en un estudio, publicado en 2004, basado en la determinación mediante inmunohistoquímica de CD34 y HIF-1 α en carcinomas colo-rectales, no fueron capaces de reproducir los resultados previamente publicados en tumores de la misma localización. En el caso de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, como ocurría con los carcinomas colo-rectales, la discrepancia es la tónica. Así, mientras algunos autores publican resultados similares a los nuestros^{131,133}, pues no fueron capaces de demostrar una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables, otros encuentran una mayor expresión de HIF-1 α en los tumores mejor vascularizados. Cuando la determinación del grado de oxigenación tisular se realiza empleando métodos de demostrada sensibilidad, los trabajos publicados apoyan nuestros hallazgos. Así, Mayer y colaboradores²⁰², en un meticuloso trabajo, no encontraron ninguna correlación entre la expresión de HIF-1 α y el grado de oxigenación de los carcinomas epidermoides del cérvix uterino. Estos autores emplearon sondas Eppendorf (electrodos polarográficos acoplados a finas agujas²⁰³), para determinar la presión parcial de oxígeno en las biopsias que posteriormente serían sometidas al análisis inmunohistoquímico. Así, era posible demostrar elevados niveles de HIF-1 α , tanto en las muestras tumorales hipóxicas, como en las mejor oxigenadas. Resulta interesante destacar que cuando estudiaron la correlación existente entre la expresión de HIF-1 α y la supervivencia, como ya había ocurrido previamente con los carcinomas epidermoides de pulmón^{132,134}, y los de cabeza y cuello^{133,135,151}, desencadenaron la polémica en cuanto a su influencia en el pronóstico de los pacientes con carcinomas epidermoides del cérvix uterino. En contraposición a lo publicado hasta entonces^{108,109}, Mayer y colaboradores no pudieron demostrar ninguna influencia de la expresión de HIF-1 α en el pronóstico de sus pacientes. En el caso concreto de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, Janssen y colaboradores tampoco encontraron asociación entre HIF-1 α y los niveles

de pimonidazol (molécula capaz de modificar su estado redox en función del grado de oxigenación tisular).

Así pues, de nuestros resultados, y del análisis detallado de la literatura más reciente, se puede concluir que en un porcentaje de carcinomas epidermoides supraglóticos, los mecanismos que regulan la expresión de HIF-1 α independientemente de la presión parcial de oxígeno podrían desempeñar un papel fundamental. Junto a estos tumores, probablemente coexistan otros en los cuales, las células mantengan la regulación de HIF-1 α a través de los mecanismos dependientes de la concentración intracelular de oxígeno. Una importante consecuencia derivada de estos hallazgos viene dada por la ya expuesta doble faceta de HIF-1 α , pues es capaz tanto de promover el crecimiento y la proliferación celular, como de inhibirlos e inducir apoptosis. Por lo tanto, teniendo en cuenta la heterogeneidad presente en nuestros tumores en lo concerniente a sus mecanismos de regulación, no resulta aventurado suponer esa misma heterogeneidad en cuanto a las consecuencias de su activación en los distintos tumores.

El análisis conjunto de tumores en los cuales HIF-1 α estuviera jugando papeles diferentes, tendría como consecuencia la publicación de resultados aparentemente contradictorios. Estos resultados dependerían de la proporción de casos incluidos en cada trabajo, en los que HIF-1 α se comporta como un gen supresor de tumores o como un oncogen. Si la serie estudiada incluyera un número suficiente de pacientes, la consecuencia sería la falta de asociación entre su expresión y el pronóstico. Como ya hemos visto, en el caso de la expresión de HIF-1 α en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, tanto la falta de correlación con el pronóstico, como la publicación de resultados contradictorios, son fenómenos frecuentes en la literatura. En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna influencia de la expresión de HIF-1 α , ni en la supervivencia de los pacientes, ni en la incidencia de recidivas, ni en la aparición de segundos tumores primarios. Estos resultados coinciden con los publicados por Kyzas y colaboradores. Estos autores analizaron la expresión de HIF-1 α y VEGF en 81 pacientes con carcinomas originados en el labio inferior, la cavidad oral y la laringe, todos ellos tratados quirúrgicamente, sin encontrar correlación entre la expresión de HIF-1 α y el pronóstico de sus pacientes. Con relación a la modalidad terapéutica empleada, resulta importante destacar que los 5 trabajos previamente publicados, en los cuales se analizaba el valor pronóstico de la expresión de HIF-1 α en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, incluían pacientes que habían sido sometidos a tratamientos

diferentes. Dada la capacidad de HIF-1 α de modificar los efectos de la quimioterapia y de la radioterapia, el hecho de que los distintos trabajos empleen aproximaciones terapéuticas diferentes, dificulta la obtención de conclusiones sobre su papel en estos tumores. En el estudio de Koukourakis los pacientes se trataron mediante quimioterapia y radioterapia, y en el de Aebersold el tratamiento elegido fue la radioterapia. En ambos, la sobre-expresión de HIF-1 α se asoció con un peor pronóstico. En los trabajos de Beasley y Fillies la cirugía fue el tratamiento de elección, presentando una mayor supervivencia los pacientes cuyos tumores sobre-expresaban HIF-1 α . Merece la pena destacar que el trabajo de Fillies era el único, hasta la fecha, que analizaba conjuntamente carcinomas epidermoides de cabeza y cuello originados en una misma localización anatómica (el suelo de la boca). Sin embargo, el análisis de las muestras se realizó mediante bio-chips, empleando para su confección pequeñas biopsias de 0,6 mm de diámetro. Esta técnica no parece la más adecuada para el estudio de una molécula como HIF-1 α pues, tanto nuestros resultados, como los publicados previamente, muestran una distribución de HIF-1 α , en el espesor de la masa tumoral, claramente heterogénea²⁰⁴. Por lo tanto, el empleo de biopsias de pequeño tamaño puede generar interpretaciones erróneas de los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica.

En nuestro estudio, la expresión de HIF-1 α sólo se correlacionaba de un modo estadísticamente significativo con la clasificación T (hallazgo descrito previamente) y no con el estadio, ni con la clasificación N (variables con clara influencia en el pronóstico de nuestros pacientes), ni con el grado de diferenciación. Esta ausencia de correlación con variables con evidente repercusión en la historia natural de estos tumores es un hallazgo frecuente^{132,135,136,151}, y no apoya su participación en la progresión de los mismos, aunque bien es cierto que tampoco necesariamente la excluye. Los niveles de expresión de HIF-1 α eran más elevados en pacientes con tumores localmente más avanzados, que en aquellos con tumores de menor tamaño. Esta asociación puede ser explicada simplemente como consecuencia de un fenómeno probabilístico, pues cuanto mayor sea el número de células, mayor es la probabilidad de que aparezca un clon mutante capaz de expresar HIF-1 α independientemente de la hipoxia tisular. Esta hipótesis se ve apoyada por el aparente origen clonal de las células capaces de sobre-expresar HIF-1 α pues, dentro de un mismo tumor, áreas anatomopatológicamente distintas presentan comportamientos diferentes con respecto a HIF-1 α , independientemente del grado de diferenciación y de la proximidad a vasos sanguíneos y a áreas de necrosis.

Como novedad, nuestro trabajo añade al estudio del tumor primario el de las metástasis ganglionares. La ausencia de correlación entre la expresión de HIF-1 α en el tumor primario y en las metástasis ganglionares originadas a partir del mismo, pone en duda, una vez más, la participación de HIF-1 α en la progresión de los carcinomas epidermoides supraglóticos. Por el contrario, tanto en el caso de p53, como en el de caspasa 3 (variables que en nuestro estudio no han demostrado ninguna asociación entre sí), su expresión en el primario y en las metástasis linfáticas se mantiene de un modo estadísticamente significativo, existiendo una correlación casi perfecta entre sus niveles en ambas localizaciones. Estos resultados están de acuerdo con observaciones recientes que indican que el patrón de expresión génica presente en las metástasis de un tumor resulta ser muy similar al patrón presente en el tumor primario del cual derivan. Por lo tanto, la población celular presente en el tumor primario sería fenotípica, y posiblemente también genotípicamente, “casi” idéntica a la población presente en las metástasis^{106,205}. Estas observaciones también sugieren que la tendencia a la diseminación, linfática y hematogena del tumor, estaría determinada por mutaciones adquiridas en las fases iniciales de la carcinogénesis, estando éstas presentes en la población celular dominante en el tumor primario. Así, estas células estarían de algún modo, predispuestas desde las primeras fases de la oncogénesis, al posterior desarrollo de metástasis, cuando hubieran adquirido un número suficiente de mutaciones favorecedoras del crecimiento y de la supervivencia tumoral. Esta hipótesis ha podido ser contrastada recientemente en el caso concreto de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello²⁰⁶, mediante el empleo de bio-chips. Así, en carcinomas primarios de la cavidad oral y orofaringe, una combinación de 102 genes parece ser capaz de predecir con una sensibilidad del 100%, y una especificidad de al menos el 86%, la probabilidad de desarrollar metástasis linfáticas. Es decir, los tumores parecen presentar las alteraciones necesarias para crecer, invadir y metastatizar desde sus estadios más iniciales. Estas alteraciones afectan a la mayoría de las células que conforman el tumor, y se mantienen a través de las distintas fases de la progresión tumoral. Por lo tanto, parece lógico pensar que aquellas proteínas cuya expresión juegue un papel destacado en el desarrollo y progresión tumoral deberían mantener en las metástasis ganglionares el patrón de expresión hallado en el tumor primario. El hecho de que esto no ocurra con HIF-1 α , y sí con p53 y con caspasa-3 (fiel indicador del índice apoptótico de un determinado tejido), va en contra de la implicación de HIF-1 α en la progresión de estos tumores, al tiempo que apoya un potencial papel de p53 en la misma. Empleando el mismo esquema argumental, la tendencia a

entrar en apoptosis de la población dominante en el tumor, debería de algún modo influir en el desarrollo de los carcinomas epidermoides supraglóticos.

Entre las alteraciones en genes supresores de tumores, una de las más frecuentes es la inactivación de p53. El factor de transcripción p53 se constituye por la unión de 4 subunidades idénticas, estabilizándose como consecuencia de la acción de numerosos estímulos, como la detección de daños en el ADN, alteraciones en la osmolaridad, o incluso como consecuencia de la propia hipoxia. Su activación va a conllevar la transcripción de genes implicados en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, y la inducción de la muerte celular programada²⁰⁷. La detección mediante inmunohistoquímica de una sobre-expresión de p53, con frecuencia, aunque no siempre, se asocia con la acumulación de una proteína mutante funcionalmente inactiva²⁰⁸. p53 se encuentra sobre-expresada entre el 23% y el 70% de todos los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, y con frecuencia se puede demostrar su acumulación en lesiones premalignas, sugiriendo que su mutación es un evento precoz en el proceso de la carcinogénesis^{113,178,209,210}. Estos resultados están de acuerdo con nuestros hallazgos, pues hemos podido demostrar un aumento de su expresión en el 58% de los tumores primarios, y en el 46% de las metástasis ganglionares. Por otro lado, en la mayoría de los tumores que sobre-expresaban p53, más del 50% de las células tumorales eran inmunorreactivas, y se distribuían de forma homogénea en el espesor de la masa tumoral (por el contrario, HIF-1 α se disponía de forma heterogénea). Este patrón de expresión de p53 está de acuerdo con las descripciones previamente publicadas sobre la distribución de las células inmunorreactivas en carcinomas²¹¹, y sustenta la hipótesis que sugiere que su mutación es un evento precoz. Junto a estos resultados, la existencia de una correlación casi perfecta entre su expresión en el tumor primario, y su expresión en las metástasis ganglionares originadas en el mismo, sostiene que su mutación es un fenómeno temprano durante el proceso de la carcinogénesis, y apoya su influencia en la progresión de los carcinomas epidermoides supraglóticos. En nuestra serie, cuando un tumor no expresaba p53, sus metástasis nunca lo hacían.

En cuanto a la influencia de la expresión de p53 en la supervivencia de los pacientes, los resultados son controvertidos, pues mientras unos trabajos asocian su expresión con un peor pronóstico²¹², otros no encuentran relación con la supervivencia^{155,208}. En este aspecto, nuestros resultados presentan un carácter novedoso, pues si bien no hemos encontrado relación entre la expresión de p53 en el tumor primario y la supervivencia de los pacientes, su

expresión en las metástasis ganglionares se correlacionaba de una manera estadísticamente significativa con el pronóstico. Así, su sobre-expresión en las metástasis linfáticas se correlacionaba con una mayor incidencia de recidivas regionales ($p=0,020$), y con una menor supervivencia, independientemente de la clasificación N (70% vivos a los 5 años en el grupo cuyas células metastásicas no sobre-expresaban p53, versus 30% en el grupo con sobre-expresión, $p=0,018$). Por el contrario, como ya había ocurrido con su expresión en el tumor primario, la expresión de HIF-1 α en las metástasis ganglionares no se correlacionó ni con la supervivencia de los pacientes ($p=0,159$), ni con la incidencia de recidivas regionales ($p=0,647$). En la misma línea se encuentran nuestros resultados en relación con caspasa-3. Los tumores con índices apoptóticos más elevados, parecen desarrollar metástasis linfáticas con mayor facilidad que los carcinomas en los cuales existe un menor número de células en apoptosis ($p=0,037$). Del mismo modo, la expresión de c-3 en las metástasis ganglionares se asoció con una mayor incidencia de recidivas regionales ($p=0,023$). Los pacientes con una mayor expresión de caspasa-3 en sus metástasis linfáticas tenían mayor probabilidad de desarrollar una recidiva regional, independientemente del estatus ganglionar, que aquellos cuyas células metastásicas presentaban una menor tendencia a entrar en apoptosis.

La dificultad para hallar una correlación consistente entre la expresión de HIF-1 α y la supervivencia de los pacientes, asociada a la ya expuesta capacidad de HIF-1 α de transcribir un grupo de genes distinto según el conjunto de cambios genéticos y epigenéticos que el tumor concreto que estamos estudiando haya adquirido, llevó a algunos autores a estudiar la influencia de la expresión de HIF-1 α en la supervivencia de los pacientes en función de otros parámetros, en concreto en función de p53. El primer trabajo publicado en esta línea se realizó en pacientes afectados por cáncer de ovario. En él, Birner y colaboradores no pudieron encontrar correlación entre la supervivencia de sus pacientes y la expresión, de forma aislada, de HIF-1 α , o de p53. Sin embargo, cuando estudiaron ambas variables de forma conjunta, el subgrupo de pacientes que simultáneamente sobre-expresaba HIF-1 α y p53 (11 casos), presentaba un pronóstico peor que el resto del grupo. En nuestro estudio no hemos podido reproducir estos resultados, pues los 45 pacientes en los cuales HIF-1 α y p53 estaban sobre-expresados, no presentaron una supervivencia significativamente menor que el resto ($p=0,517$). Birner y colaboradores explicaron sus resultados, como una consecuencia de la tendencia que tendrían las células con sobre-expresión de HIF-1 α , a entrar en apoptosis. Ante una mutación de p53, HIF-1 α en lugar de inducir apoptosis, favorecería la progresión

tumoral. Sin embargo, nuestros resultados no han podido confirmar este extremo, pues no hemos podido correlacionar la expresión de caspasa-3, ni con la expresión de HIF-1 α , ni con la de p53. En la misma línea, el subgrupo de pacientes que sobre-expresaba HIF-1 α , pero no p53, que según esta teoría debería tener un índice apoptótico más elevado que el resto, no presentaba una mayor expresión de caspasa-3 ($p=0,538$). Por lo tanto, nuestros resultados ponen en duda que la hipótesis de Birner y colaboradores sea aplicable en el caso de los carcinomas epidermoides supraglóticos. La variabilidad en los efectos e interacciones establecidas por HIF-1 α , en función del tumor que estudiemos, se pone de manifiesto en 4 trabajos recientes, que diseñaron un estudio similar al publicado por Birner y colaboradores. Tanto Sohda y colaboradores como Kimura y colaboradores, en carcinomas epidermoides de esófago, aportan resultados similares a los nuestros. Estos autores tampoco fueron capaces de encontrar ninguna correlación entre p53, HIF-1 α y el índice apoptótico de sus tumores. Por el contrario, Teodoropoulus y colaboradores en carcinomas uroteliales de vejiga encuentran resultados similares a los presentados en el caso del cáncer de ovario, es decir, la expresión de HIF-1 α se correlaciona con una mayor apoptosis, y los tumores que simultáneamente sobre-expresan HIF-1 α y p53 tienen un peor pronóstico que los que no lo hacen. Resulta muy interesante destacar que, este mismo grupo de trabajo, no pudo reproducir estos resultados en el caso del cáncer rectal, donde HIF-1 α se comportaba como un factor pronóstico desfavorable, independientemente de p53 y del índice apoptótico.

La acumulación intracelular de p53 en condiciones de hipoxia es un hecho conocido. Sin embargo, existen dudas razonables sobre si este aumento de proteína conlleva un incremento de su actividad transcripcional, planteando si su acumulación en hipoxia tendría las mismas consecuencias que su activación debido a otros estímulos, como el daño en el ADN²¹³. Publicaciones recientes parecen demostrar que, en condiciones de hipoxia, HIF-1 α es capaz de inducir la acumulación de p53 a través de 2 mecanismos distintos. Por un lado, la expresión de HIF-1 α puede aumentar la concentración intracelular de nucleofosmina. Esta proteína se ha encontrado sobre-expresada en diversos tumores humanos (carcinomas de colon, ovario, próstata y estómago), y su promotor incluye una secuencia HRE. La nucleofosmina puede unirse a p53, impidiendo su actividad transcripcional, inhibiendo por lo tanto la apoptosis dependiente de p53 en condiciones de hipoxia^{214,215}. El otro mecanismo que permite justificar la acumulación de p53 en hipoxia, se basa en la capacidad de p53 de unirse, a través de su región encargada de interaccionar con el ADN, al dominio de HIF-1 α

denominado ODD (dominio donde se localizan los aminoácidos esenciales para su regulación dependiente de oxígeno). Mediante esta interacción, quedaría abolida la capacidad de p53 de unirse al ADN, y por lo tanto, sería incapaz de llevar a cabo su actividad transcripcional. Así, en condiciones de hipoxia, la sobre-expresión de HIF-1 α podría conllevar, en determinados grupos celulares, una disminución de la apoptosis dependiente de p53. Esta disminución de la actividad transcripcional de p53 se podría producir, bien como consecuencia de su interacción directa con HIF-1 α , o bien debido a su unión a nucleofosmina (proteína inducida por HIF-1 α). Ambas hipótesis se ven refrendadas por recientes estudios basados en el análisis proteómico de líneas celulares Fadu, derivadas de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello²¹⁶. En estas líneas, la expresión de HIF-1 α esta regulada por mecanismos dependientes de la concentración intracelular de oxígeno. En este trabajo, Chen y colaboradores demuestran que en hipoxia, el aumento de la expresión de HIF-1 α , se acompaña de una acumulación de p53, no dependiente de mecanismos transcripcionales.

Si estos planteamientos se pudieran aplicar *in vivo* al caso concreto de los carcinomas epidermoides supraglóticos, el subgrupo de tumores que, en condiciones de hipoxia, expresara HIF-1 α , y bien como consecuencia de esta sobre-expresión, o bien por coexistir mutaciones inactivantes en el gen TP53, acumularan una proteína p53 transcripcionalmente inactiva, debería tener un peor pronóstico que el resto del grupo. En estas condiciones, HIF-1 α podría favorecer el crecimiento y la progresión tumoral. Estos resultados están en la línea de los expuestos en el cáncer de ovario, y en el carcinoma urotelial, por los grupos de Birner y Theodoropoulos, respectivamente. Sin embargo, la asociación demostrada por estos autores, entre la expresión simultánea de HIF-1 α y p53, y el pronóstico de sus pacientes, no había podido ser reproducida en trabajos posteriores^{113,118}, ni tampoco en nuestro estudio. Esta variabilidad en los resultados se puede justificar por no haber tenido en cuenta en estos trabajos, la participación de variables como el grado de vascularización del tumor y su índice apoptótico. Puesto que HIF-1 α es capaz de inducir apoptosis, tanto dependiente, como independientemente de p53^{146,147}, para que los pacientes con sobre-expresión de HIF-1 α y de p53, tuvieran un peor pronóstico, su capacidad apoptótica debería estar disminuida. Sino fuera así, HIF-1 α podría frenar la progresión tumoral, promoviendo la apoptosis a través de mecanismos alternativos a p53, como por ejemplo mediante la transcripción de BNIP3. En nuestros pacientes, el subgrupo de tumores pobremente vascularizados, en los que la expresión de HIF-1 α se asocia a una acumulación de p53 y a un índice apoptótico bajo,

presenta una supervivencia marcadamente inferior al resto (75% vs 47%; $p=0,012$; Figura 44). Los resultados contradictorios de los trabajos que han analizado el valor pronóstico de la expresión de HIF-1 α y p53, se pueden justificar por haber incluido distintos porcentajes de pacientes con carcinomas bien vascularizados o con elevados índices apoptóticos, dentro del grupo de tumores que expresaba simultáneamente HIF-1 α y p53. Este detalle posee importancia capital cuando pretendemos evaluar el papel de una proteína como HIF-1 α , cuyos efectos sobre el desarrollo tumoral pueden tener consecuencias radicalmente opuestas, dependiendo de su interacción con el resto de factores de transcripción, presentes en una célula concreta, en un momento dado. Estos efectos, no sólo pueden ser diferentes según el tipo de tumor que estemos estudiando, sino que pueden variar entre líneas celulares distintas, derivadas de una misma estirpe tumoral (incluido en el caso de las líneas derivadas de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello). Así, el subgrupo de pacientes en los que la regulación de HIF-1 α no está mediada por la presión parcial de oxígeno, los efectos de su activación pueden ser distintos a los observados en los pacientes en los que sí lo esté.

Por lo tanto, sobre la base de los resultados obtenidos, podemos especular que, sólo un pequeño grupo de pacientes (en nuestra serie no más del 16%), podría ser candidato a beneficiarse del uso de inhibidores de HIF-1 α . En el resto, e incluso en algún tumor incluido en este subgrupo en el cual la asociación de marcadores pueda ser casual, el empleo de inhibidores puede no ser eficaz, o incluso resultar potencialmente peligroso, pues podría conllevar un mayor desarrollo tumoral. Así, la selección de los pacientes candidatos al empleo de inhibidores de HIF-1 α probablemente requiera una aproximación más global a la biología tumoral. La aplicación a los campos de la genómica, epigenómica, y proteómica, de las últimas tecnologías de biología molecular, automatizadas y adaptadas a formatos de alto rendimiento, permitirá definir con mucha mayor precisión el subgrupo de pacientes en los cuales HIF-1 α esta favoreciendo la progresión tumoral. Hasta entonces, su versatilidad le hace ser un candidato peligroso para su inhibición indiscriminada.

Llegados a este punto de la discusión, merece la pena destacar las ventajas que el análisis de las muestras tumorales mediante inmunohistoquímica ofrece, con respecto a otros métodos de biología molecular empleados habitualmente en el estudio de los tumores humanos.

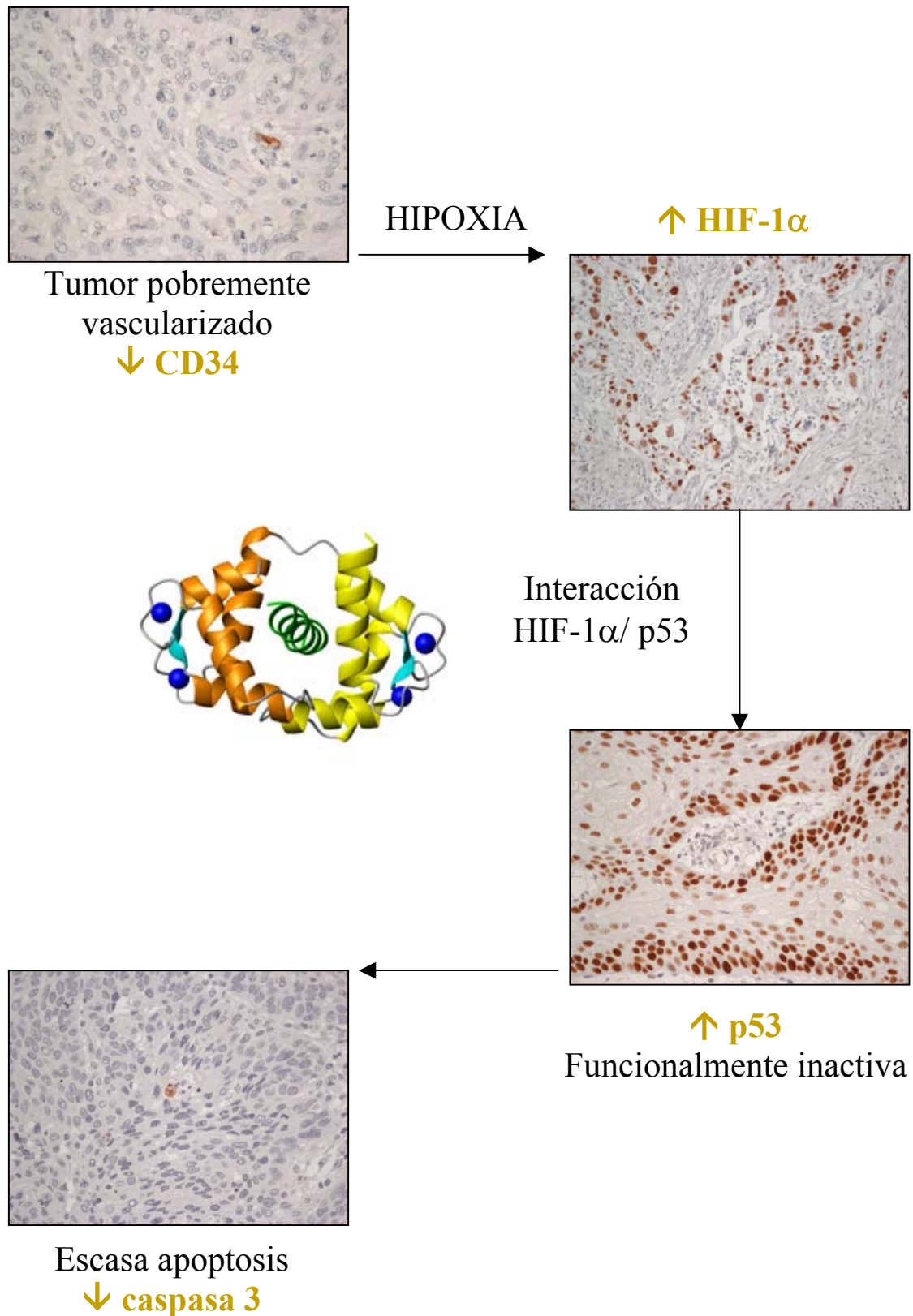


Figura 44. Esquema en el cual se representa el subgrupo de tumores con mal pronóstico descrito en el texto. Estos tumores estarían mal vascularizados, y en ellos, los mecanismos de regulación de HIF-1 α dependientes de oxígeno se mantendrían intactos. Al tiempo, como consecuencia de la interacción HIF-1 α /p53 la capacidad apoptótica se encontraría disminuida.

La inmunohistoquímica es un método técnicamente fácil de llevar a cabo, y relativamente sencillo de evaluar. Al mismo tiempo, es barato, rápido, y se puede realizar en las biopsias tomadas con fines diagnósticos. Otra gran ventaja reside en la posibilidad de ver si las alteraciones objeto de estudio tienen lugar en las células tumorales, o por el contrario ocurren en las células estromales, o en los tejidos sanos adyacentes al tumor. En conjunto, estas ventajas son las responsables del interés que esta técnica ha despertado como instrumento para intentar evaluar el papel de distintas proteínas en la progresión de los diferentes tumores humanos, y sus potenciales implicaciones pronósticas. HIF-1 α no ha escapado a esta tendencia, y han sido múltiples los trabajos que en distintos tumores, han intentado dilucidar mediante inmunohistoquímica, las consecuencias que su expresión tiene sobre el comportamiento de los mismos. Sin embargo, de nuestros resultados parece deducirse que esta aproximación no es adecuada para el estudio de HIF-1 α . Afirmación que estaría de acuerdo con el continuo flujo de publicaciones mostrando resultados contradictorios, sobre el papel de HIF-1 α en el pronóstico de pacientes afectados por carcinomas de diversas localizaciones (pulmón^{132,133}, esófago^{113,217}, ovario^{137,218}, cérvix uterino^{108,219}, y por supuesto cabeza y cuello^{133,135}). Contradicciones justificables en parte por la ya expuesta complejidad que caracteriza a los mecanismos implicados en su regulación (proto-oncogenes, genes supresores de tumores, PHD's, OS-9, óxido nítrico, radicales libres, etc).

Un hecho fundamental a tener en cuenta cuando se analiza mediante inmunohistoquímica la expresión de HIF-1 α , es la existencia de diversos polimorfismos de la proteína, la mayoría de los cuales afectan solamente a un aminoácido, modificación que fácilmente podría no ser detectada mediante el empleo de esta técnica. Las diferentes variantes de HIF-1 α han demostrado poseer diferentes actividades transcripcionales en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, y asociarse con distintas densidades microvasculares²²⁰. Estos polimorfismos afectan al exón 12, el cual codifica el dominio ODD, cuya alteración podría tener influencia no sólo en los mecanismos de regulación post-transcripcional, sino también en las interacciones de HIF-1 α con otras proteínas como p53. Recientemente se ha podido demostrar una diferente prevalencia de estos polimorfismos entre poblaciones de pacientes con carcinomas renales²²¹ y carcinomas de próstata²²², cuando se comparan con una población control de sujetos sanos.

En la misma línea, es importante destacar que, como consecuencia de una maduración diferencial del ARN mensajero, existen variantes tanto de HIF-1 α ²²³, como de HIF- β ²²⁴. Las

6 isoformas de HIF-1 α conocidas hasta el momento, presentan diferentes niveles de expresión en las distintas estirpes tumorales, actividades transcripcionales específicas para cada una, y diferentes mecanismos de regulación²²⁵. Tres de estas isoformas carecen de actividad transcripcional, y por lo tanto se comportarían como inhibidores de HIF-1, pues competirían con HIF-1 α por su unión a HIF- β . Las 3 isoformas restantes son capaces de transcribir en normoxia genes clásicamente considerados sustrato de HIF-1. Mediante el empleo de xenoinjertos murinos, se ha podido demostrar que una de estas isoformas posee mayor capacidad para favorecer la progresión tumoral que HIF-1 α . El anticuerpo empleado en el presente trabajo reconoce las variantes transcripcionalmente activas, pero no las inhibidoras.

De los argumentos previamente expuestos, parece deducirse que la detección mediante inmunohistoquímica de HIF-1 α es una aproximación insuficiente para el estudio de esta proteína. Esto no es menos cierto cuando hablamos de otras proteínas, como es el caso de p53, cuya evaluación simultánea parece fundamental si queremos conocer las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α . En la mayoría de los casos en los que se detecta sobre-expresión de p53 mediante inmunohistoquímica, estamos detectando una proteína mutante no funcional. Sin embargo, también podemos estar detectando una proteína normal e incapaz de llevar a cabo su actividad transcripcional, que se acumularía como consecuencia de su interacción con otras proteínas, como HIF-1 α o nucleofosmina. Lo que es más importante, y nos puede hacer incurrir en errores, es que también podemos estar detectando una proteína funcional, cuya expresión está aumentada, y que por lo tanto sería capaz de detener el ciclo celular o incluso de inducir la muerte celular programada. Esta situación podría darse en el caso de estar alterado su inhibidor mdm2²²⁶. Por el contrario, la imposibilidad para detectar mediante inmunohistoquímica la presencia de p53, no necesariamente indica que las células negativas posean formas funcionales de la proteína. Esta situación es debida a que, en un bajo porcentaje de casos, existen mutaciones que dan lugar a formas no funcionales de la proteína, pero sin embargo, no conllevan su acumulación en los tejidos (ej. delecciones). La ausencia de correlación encontrada en el presente trabajo entre la expresión de p53 y caspasa-3, pone de manifiesto que en los carcinomas epidermoides supraglóticos coexisten las 4 situaciones expuestas. Este resultado está en la línea de trabajos publicados recientemente, en los cuales tampoco encontraron correlación entre el índice apoptótico y la expresión de p53, en carcinomas epidermoides laríngeos²²⁷.

Para estudiar *in vivo* las consecuencias de la sobre-expresión de HIF-1 α , decidimos desarrollar un modelo animal capaz de reproducir de un modo fidedigno el comportamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Posteriormente, empleamos este modelo para analizar la capacidad carcinogénica, y las características de los tumores desarrollados por una línea celular incapaz de expresar constitutivamente HIF-1 α . A continuación, comparamos las características de estos tumores con las de los tumores inducidos por un transfectante estable de la misma línea, manipulado genéticamente para sobre-expresar una proteína HIF-1 α mutante, activa y estable en normoxia.

La inoculación subcutánea de células tumorales en ratones se ha empleado para estudiar el comportamiento *in vivo* de numerosos tumores. Sin embargo, estos modelos heterotópicos no han sido capaces de reproducir el comportamiento de estos tumores en humanos, siendo esto especialmente evidente en el caso de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello^{228,229,230,231}. Por el contrario, cuando se trata de reproducir la historia natural de estos carcinomas, los modelos ortotópicos presentan múltiples ventajas con respecto a los heterotópicos. Así, la inoculación subcutánea no reproduce el micro-ambiente en el cual se desarrollan estos tumores, subestimando de este modo el papel que en la progresión tumoral juega la interacción entre las células del tumor y las del estroma circundante. Esta interacción resulta esencial para los fenómenos de angiogénesis, invasión local y para la formación de metástasis. Así, los ratones en los cuales los tumores se inyectan en el tejido subcutáneo desarrollan carcinomas encapsulados. Esta cápsula tiende a limitar la diseminación local del tumor, y dificulta el desarrollo de metástasis, pues éstas raramente ocurren en los tumores inoculados heterotópicamente. Por otro lado, las características anatómicas del lugar en el cual se desarrolla el tumor, van a condicionar la evolución del mismo en virtud del grado de vascularización del tejido, del drenaje linfático, de la presencia de hueso, de las consecuencias que el crecimiento local tenga para la supervivencia del animal, etc. Así pues, en este estudio hemos pretendido poner en práctica un modelo murino, capaz de reproducir lo más fielmente posible la evolución de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

En la primera fase del estudio comprobamos, mediante la inoculación de azul de metileno, la viabilidad de la inyección submucosa a nivel del suelo de la boca, en ratones inmunocompetentes. Así mismo, esta inyección la utilizamos para caracterizar las vías de drenaje linfático de esta localización anatómica. Con esta información procedimos a la

segunda fase del estudio, en la cual inoculamos la línea celular SCC38, a nivel submucoso, en el suelo de la boca de 20 ratones atímicos.

Nuestros resultados demuestran que esta línea presenta una importante capacidad carcinogénica, ya que se desarrollaron tumores en el 90% de los ratones inoculados. Los tumores obtenidos presentaron un comportamiento muy homogéneo entre sí, y lo que es más importante, reprodujeron con bastante fidelidad las características de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello humanos. Los carcinomas desarrollados mostraron el mismo grado de diferenciación que el tumor original (grado II de Broders). Ninguno de los tumores estaba encapsulado, por el contrario, todos ellos tenían un amplio frente de invasión. En todos los casos se pudo observar invasión del tejido conjuntivo y muscular, crecimiento perineural, y embolización del sistema de drenaje linfático. Fenómenos también presentes, pero menos frecuentes, resultaron ser la invasión venosa y la erosión ósea. Todos los tumores desarrollaron metástasis linfáticas, y ninguno hematógenas. En definitiva, las características de los tumores desarrollados, resultaron ser muy similares a las presentes en los tumores humanos.

La primera descripción del desarrollo de un tumor humano de forma ortotópica, en la cavidad oral de ratones atímicos, fue publicada por Fitch y colaboradores²³² en 1988. Para ello, emplearon células aspiradas a partir de tumores humanos, que estaban creciendo subcutáneamente en ratones inmunodeficientes. Sus resultados no mostraron diferencias entre el crecimiento intraoral y el observado en el tejido subcutáneo, probablemente como consecuencia de la selección de células que crecían mejor a nivel subcutáneo. En 1990 Dinesman y colaboradores²³³ publicaron un modelo, en el cual inoculaban las células tumorales a través de la piel del animal, en profundidad con respecto al músculo milohioideo. Sólo un 5% de los tumores inyectados desarrollaron metástasis ganglionares, mientras que un 40% de ellos presentaron metástasis pulmonares. El elevado porcentaje de metástasis hematógenas, y por contraposición, la baja frecuencia de metástasis linfáticas, probablemente sea una consecuencia del desarrollo tumoral en un microambiente diferente al encontrado por estos tumores en el tejido submucoso. Así, este comportamiento contradice los mecanismos habituales de progresión de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, haciendo de este modelo una aproximación poco útil para estudiar la evolución de estos tumores. Otro de los inconvenientes de la ruta transdérmica, es la elevada mortalidad inmediata de los ratones inoculados (12%-40%), la cual obliga a ajustar el volumen de inyección para evitar la muerte

del animal por un mecanismo similar al de la angina de Ludwig. No obstante, a pesar de que la inyección transdérmica en la musculatura profunda del cuello difiere de la inoculación submucosa, esta aproximación experimental ha sido utilizada en publicaciones recientes. Probablemente se siga empleando, a pesar de sus inconvenientes, por ser fácil de llevar a cabo técnicamente, y porque los tumores desarrollados conservan la capacidad de invadir el tejido muscular y óseo adyacentes²³⁴.

El primer modelo murino cuyas características reproducían de una forma fiel el comportamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello fue publicado en 2002 por Myers y colaboradores. En él, mediante la inoculación submucosa en la lengua de los animales, consiguieron desarrollar tumores en el 100% de los casos; sin embargo, sólo un 4% de ellos desarrollaron metástasis linfáticas y ninguno hematógenas. Las diferencias en el porcentaje de metástasis linfáticas entre su estudio (4%) y el nuestro (100%) pueden justificarse, además de por el diferente tropismo linfático de las líneas empleadas, por los métodos utilizados para la detección de las metástasis ganglionares. Así, el método habitualmente empleado para la localización de las metástasis en otros trabajos^{230,235}, consiste en emplear líneas celulares transfectadas establemente con una proteína capaz de emitir fluorescencia, la “Green Fluorescent Protein” (GFP). Posteriormente, el cuello del animal se disecciona bajo un microscopio de fluorescencia, localizando las metástasis como áreas de tejido fluorescente. Este método presenta el inconveniente de que pequeños grupos de células metastásicas, pueden no ser detectadas en el espesor del tejido cervical durante la disección. Por el contrario, nuestro protocolo, consistente en la resección de todo el tejido ganglionar cervical, y su posterior estudio microscópico mediante cortes seriados, permite la detección de pequeñas metástasis, que de otro modo podrían pasar desapercibidas.

Finalmente, la inclusión en la misma pieza quirúrgica del suelo de la boca y de la mandíbula, y su posterior decalcificación, supone una ventaja de este modelo, con respecto a aquellos en los que exclusivamente se extrae la lengua del animal. Este método permite, no sólo definir de forma precisa los límites del tumor, y así poder medirlo y establecer sus relaciones, sino que hace posible observar de una forma global el fenómeno de la progresión tumoral. Así, se puede ver cómo las células tumorales abandonan el tumor primario para invadir los vasos linfáticos adyacentes. Del mismo modo, es posible observar cómo vasos linfáticos alejados del tumor primario se encuentran embolizados por células tumorales en su camino hacia los ganglios regionales, actuando como una posible fuente de recidivas.

Así, podemos afirmar que este modelo se consolida como una fiel reproducción *in vivo* del comportamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, constituyendo una herramienta de inestimable valor para la comprensión a nivel tisular, celular, y molecular, de la biología del tumor primario y de sus metástasis ganglionares.

Hasta el momento, en todos los experimentos llevados a cabo con xeno-injertos murinos, las manipulaciones genéticas que aumentaban o disminuían la actividad de HIF-1 α conllevaban, respectivamente, un aumento o una disminución del crecimiento tumoral y de la angiogénesis^{62,138,139,140,141,142,143,144}. Sin embargo, estos datos contrastan, tanto con los últimos resultados publicados de experimentos *in vitro*^{147,150}, como con nuestros hallazgos *ex vivo* en los carcinomas supraglóticos. Puesto que ninguno de estos xeno-injertos se realizó de forma ortotópica, decidimos estudiar la influencia que la expresión de HIF-1 α tenía en las características de los tumores inducidos por la línea celular SCC38 en nuestro modelo murino. Para ello, hemos comparado los tumores inducidos por SCC38, en los cuales no era posible detectar expresión de HIF-1 α , con los desarrollados por las células SCC38 transfectadas establemente con HIF-1 α -P402A-P564G. Puesto que, tanto las características de los animales, como la manipulación quirúrgica a la que se ven sometidos, son las mismas, el único parámetro que varía entre ambos experimentos es la expresión por parte del transfectante de una proteína HIF-1 α mutante, estable en normoxia. Esta proteína ha demostrado, de forma reiterada en publicaciones previas, tener un perfil de actividad similar al de la proteína nativa^{59,185,186}.

Ambas líneas celulares mostraron una capacidad carcinogénica similar, induciendo tumores en el 90% de los animales inoculados. Los tumores desarrollados resultaron ser muy homogéneos entre sí, facilitando este hecho la comparación de variables entre ambos experimentos. Como previamente habíamos demostrado mediante inmunohistoquímica en nuestra serie de carcinomas epidermoides supraglóticos, la sobre-expresión de HIF-1 α no parece tener consecuencias sobre el grado de diferenciación tumoral, pues los tumores inducidos por el transfectante estable mostraron el mismo grado de diferenciación que los inducidos por la línea SCC38 nativa (grado II de Broders).

La expresión de HIF-1 α no influyó en parámetros con reconocida importancia pronóstica en los carcinomas laríngeos. Así, cuando comparamos los tumores desarrollados por ambas líneas celulares, no hemos encontrado diferencias en el índice mitótico (media de 5 mitosis por campo de gran aumento en ambos casos), el tamaño tumoral ($p=0,461$) o la

invasividad local (en ambos experimentos los tumores presentaban límites mal definidos, con grupos celulares invadiendo el tejido muscular adyacente). Ambas líneas mantienen un marcado neuro y linfotropismo, características propias de tumores agresivos y de mal pronóstico. La presencia de metástasis ganglionares, considerada como el factor pronóstico más importante en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, tampoco se vio influida por la expresión de HIF-1 α . Tanto en el caso de la línea nativa, como en el de la línea mutante, todos los tumores desarrollados presentaron metástasis linfáticas. Del mismo modo, la capacidad para invadir los vasos sanguíneos y generar metástasis hematógenas tampoco se vio afectada, pues raramente se pudo comprobar la presencia de embolización arterial o venosa, y en ningún caso se detectaron metástasis hematógenas en los órganos evaluados (pulmón, hígado y bazo). Así pues, en la línea celular SCC38, la expresión de HIF-1 α no influye en las características anatomopatológicas de los tumores desarrollados, y por lo tanto, no parece modificar el comportamiento de los mismos.

En resumen, en base a los resultados expuestos, podemos concluir que, en los carcinomas epidermoides supraglóticos, la sobre-expresión de HIF-1 α es un fenómeno frecuente. Los tumores en estadios localmente más avanzados sobre-expresan HIF-1 α con mayor frecuencia que los tumores en estadios iniciales. Sin embargo, no existe correlación entre su expresión y otras variables clínico-patológicas, como la clasificación N, el grado de diferenciación tumoral, las recidivas loco-regionales, o la incidencia de segundos tumores primarios. Del mismo modo, tampoco se encontró asociación entre la expresión aislada de HIF-1 α y la supervivencia de los pacientes. En los carcinomas epidermoides supraglóticos, la expresión de HIF-1 α parece estar regulada, tanto por mecanismos dependientes de la concentración intracelular de oxígeno, como por mecanismos independientes, y no guarda correlación con el grado de vascularización tumoral. Los carcinomas pobremente vascularizados presentaron una mayor incidencia de recidivas locales y de segundos tumores primarios, y su supervivencia era discretamente inferior a la de los pacientes con tumores mejor perfundidos. Sin embargo, estas asociaciones en ningún caso alcanzaron la significación estadística. Por el contrario, la sobre-expresión de p53 en las metástasis ganglionares se asoció, de una manera estadísticamente significativa, con una mayor incidencia de recidivas regionales, y con una menor supervivencia de los pacientes. A pesar de la ausencia de correlación entre la expresión de p53 y de caspasa 3, la incidencia de metástasis ganglionares fue más alta en los carcinomas con mayor número de células en

apoptosis. En la misma línea, las recidivas regionales fueron más frecuentes en los pacientes cuyas metástasis ganglionares presentaban elevados índices apoptóticos. Cuando las 4 variables se analizaron de forma conjunta, se encontró que los pacientes afectados por carcinomas pobremente vascularizados, con sobre-expresión de HIF-1 α y de p53 y bajos índices apoptóticos, presentaban un pronóstico significativamente peor que el resto.

Por otro lado, nuestros hallazgos *ex vivo* se ven apoyados por los resultados de nuestros experimento *in vivo*. El modelo murino de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello desarrollado en el presente trabajo, parece reproducir de un modo fidedigno el comportamiento de estos tumores en humanos. En él, hemos podido comprobar como, en contraposición a lo publicado previamente en modelos heterotópicos con otras líneas celulares, la sobre-expresión de HIF-1 α en la línea celular SCC38 no influyó en las características anatomopatológicas de los tumores desarrollados.

Hasta el momento, los pacientes candidatos a beneficiarse del uso de inhibidores de HIF-1 α , se han seleccionado basándose en experimentos llevados a cabo *ex vivo* mediante inmunohistoquímica, e *in vivo* en modelos murinos heterotópicos. De nuestros resultados, y del análisis detallado de la literatura más reciente, parece deducirse que HIF-1 α no es una proteína apropiada para su inhibición indiscriminada, al menos, no en los carcinomas epidermoides supraglóticos. La aplicación a los campos de la genómica, epigenómica, y proteómica, de las últimas tecnologías de biología molecular, automatizadas y adaptadas a formatos de alto rendimiento, permitirá definir con mayor precisión el subgrupo de tumores susceptibles de beneficiarse del empleo de inhibidores de HIF-1 α .

CONCLUSIONES

1. En los carcinomas epidermoides supraglóticos, HIF-1 α se encuentra frecuentemente sobre-expresado, siendo su expresión independiente del grado de vascularización tumoral.
2. La determinación, de forma aislada, de la expresión de HIF-1 α mediante inmunohistoquímica, no se correlaciona con el pronóstico de los carcinomas epidermoides supraglóticos, tratados quirúrgicamente.
3. La sobre-expresión de p53 en las metástasis ganglionares se asocia, de forma estadísticamente significativa, con una mayor incidencia de recidivas regionales, y con una menor supervivencia.
4. La incidencia de metástasis ganglionares es más alta en los carcinomas con mayor número de células en apoptosis.
5. Las recidivas regionales son más frecuentes en los pacientes cuyas metástasis ganglionares presentan índices apoptóticos elevados.
6. Los carcinomas epidermoides supraglóticos pobremente vascularizados, con sobre-expresión de HIF-1 α y de p53 y bajos índices apoptóticos, presentan un pronóstico significativamente peor que el resto.
7. En el momento actual, el uso indiscriminado de inhibidores de HIF-1 α en el tratamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello no está justificado.
8. El modelo murino de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello presentado en este trabajo reproduce en múltiples aspectos el comportamiento de estos tumores en humanos, siendo útil tanto para estudiar aspectos básicos de la biología molecular, como para ensayos terapéuticos.

ACRÓNIMOS

ADM: Adrenomedulina.

AhR: Receptor de dioxina/Receptor de aril hidrocarbon (Dioxin receptor/aryl hydrocarbon receptor).

ALDA: Aldolasa A.

ALDC: Aldolasa C.

AMF: Factor de motilidad autocrino (autocrine motility factor).

AMP: Adenosina monofosfato (adenosine monophosphate).

ARD1: Activador del deterioro del ARN (activator of RNA decay).

ARNT: Proteína para la translocación nuclear de AhR (AhR nuclear translocator).

ATP: Adenosina trifosfato (adenosine triphosphate).

BCL2: Linfoma de células B 2 (B-cell CLL/lymphoma 2).

BCR-ABL: Región de ruptura en la leucemia de Abelson (breakpoint cluster region Abelson leukaemia).

BNIP3: Proteína de interacción proteica BCL2/adenovirus E1B 19-KD 3 (BCL2/adenovirus E1B 19-KD protein-interacting protein 3).

bHLH-PAS: Dominio básico helice-lazo-helice tipo PAS (basic helix-loop-helix PAS domain).

BRCA1: Gen del cáncer de mama 1 (breast cancer 1 gen).

CATHD: Catepsina D.

CBP: Proteína de unión a CREB (CREB binding protein).

COX2: Cicloxigenasa 2.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (cyclic AMP-response-element-binding protein).

CUL2: Culina 2.

CXCR4: Receptor 4 para la proteína con dominio CXC (chemokine CXC motif receptor 4).

dNTP: Desoxi-nucleótidos trifosfato.

eIF-4E: Factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E).

eIF-4EBP: Proteína de unión a eIF-4E (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein).

EG-VEGF: VEGF derivado de glándulas endocrinas (endocrine gland derived VEGF).

ELB: Elongina B.

ELC: Elongina C.
ENG: Endoglina.
ENO-1: Enolasa 1
EGF: Factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor).
EGFR: Receptor del EGF (EGF receptor).
EGR1: Factor de transcripción de respuesta temprana al crecimiento 1 (transcription factor early growth response 1).
ENO1: Enolasa 1.
ET1: Endotelina-1.
EPAS1: Proteína endotelial con dominio PAS 1 (endothelial PAS domain protein 1).
EPO: Eritropoyetina.
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular-signal-regulated-kinase).
FIH1: Factor inhibidor de HIF-1 (factor inhibiting HIF-1).
FN1: Fibronectina 1.
GAPDH: Gliceraldeído-3-P-deshidrogenasa.
GLUT1: Transportador de glucosa 1 (glucose transporter 1).
GLUT3: Transportador de glucosa 3 (glucose transporter 3).
HLF: Factor de la leucemia hepática (hepatic leukemia factor).
HREs: Elementos de respuesta a hipoxia (hypoxia-responsive elements).
HRF: Factor liberador de histamina (histamine releasing factor).
HIF: Factor de transcripción inducible por hipoxia (hypoxia-inducible transcription factor).
HK1: Hexoquinasa 1.
HK2: Hexoquinasa 2.
HSP90: Proteína de choque térmico 90 (heat shock protein 90).
HPH: Prolil hidroxilasa de HIF-1 (HIF-1 prolyl hydroxylase).
hTERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa (telomerase reverse transcriptase).
IL-1: Interleucina-1.
IGF: Factor de crecimiento tipo insulina (insulin-like growth factor).
IGFR: Receptor de IGF (IGF receptor).
IGF-BP: Proteína de unión a IGF (IGF-factor-binding-protein).
ITF: Factor intestinal tipo trebol (intestinal trefoil factor).
KRT: Queratina (Keratin).

LDHA: Lactato deshidrogenasa A.

LDL: Lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein).

LEP: Leptina.

LRP1: Proteína relacionada con el receptor de LDL (LDL-receptor-related protein).

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (mitogen activated protein kinase).

MDM2: Homólogo del doble momento murino 2 (mouse double minute 2 homolog).

MDR1: Resistencia a múltiples drogas 1 (multidrug resistance 1).

MEK: Quinasa MAP/ERK (MAP/ERK kinase).

MMP2: Metaloproteínasa de matriz 2 (matrix metalloproteinase 2).

MTF1: Factor de transcripción metálico 1 (metal transcription factor 1).

mTOR: Diana en mamíferos de rapamicina (mammalian target of rapamycin).

Myc: Oncogen homólogo al virus de la mielocitomatosis aviar.

NF- κ B: Factor nuclear κ B (nuclear factor κ B).

NOS2: Sintetasa de óxido nítrico 2 (nitric oxide synthase 2).

PAI1: Inhibidor 1 del activador del plasminógeno (plasminogen-activator inhibitor 1).

PAS: PER-ARNT-SIM.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase chain reaction).

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real time - polimerase chain reaction).

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor).

PDGFR: Receptor del PDGF (Platelet derived growth factor receptor).

PER: Proteínas periódicas de *Drosophila* (*Drosophila* proteins period).

PFKFB3: 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase-3).

PFKL: Fosfofructoquinasa L (phosphofructokinase L).

PGE2: Prostaglandina E2.

PGK1: Fosfoglicerato quinasa 1 (phosphoglycerate kinase 1).

PHD: Proteína con dominio prolil hidroxilasa (prolyl hydroxylase-domain protein).

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa (phosphatidylinositol 3 kinase).

PKM: Piruvato quinasa M (pyruvate kinase M).

PIGF: Factor de crecimiento placentario (placental growth factor).

RBX1: Anillo-caja 1 (Ring-Box 1).

S6K: p70 S6 quinasa (p70 S6 kinase).

SDF-1 α : Factor 1 derivado de células estromales (stromal cell-derived factor-1).

SIM: Proteína firme (Single-minded protein).

Siah2: Homólogo del gen de drosophila “siete en ausencia” (Seven in absentia, drosophila, homolog of).

TAD-C: Dominio de transactivación carboxilo terminal (carboxy-terminal transactivation domain).

TAD-N: Dominio de transactivación amino terminal (amino-terminal transactivation domain).

TF: Proteína tisular de superficie celular (cell surface protein tissue factor).

TNF- α : Factor- α de necrosis tumoral (tumor necrosis factor- α).

TGF- α : Factor de crecimiento transformante- α (transforming growth factor- α).

TGF- β 3: Factor de crecimiento transformante- β 3 (transforming growth factor- β 3).

TNM: Tumor, ganglio, metástasis (tumour, node, metastasis).

TPI: Isomerasa de triosafosfato (triosephosphate isomerase).

UICC: Unión internacional contra el cáncer.

UPAR: Receptor del activador uroquinasa del plasminógeno (urokinase plasminogen activator receptor).

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor).

VEGFR2: Receptor de VEGF 2.

VIM: Vimentina.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Harris AL. Hypoxia -- a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
- ² Vaupel P, Mayer A, Briest S, Hockel M. Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. *Cancer Res* 2003;63:7634-7.
- ³ Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, Begg AC. Hypoxia in head and neck cancer: How much, how important?. *Head Neck* 2005;27:622-38.
- ⁴ Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?. *Oncologist* 2004;9:31-40.
- ⁵ Bhattacharya A, Toth K, Mazurchuk R, Sperryak JA, Slocum HK, Pendyala L, et al. Lack of microvessels in well-differentiated regions of human head and neck squamous cell carcinoma A253 associated with functional magnetic resonance imaging detectable hypoxia, limited drug delivery, and resistance to irinotecan therapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8005-17.
- ⁶ Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:437-47.
- ⁷ Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* 2004;1:27-42.
- ⁸ Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:680-687.
- ⁹ Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999;59:4525-8.
- ¹⁰ Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996;56:941-3.
- ¹¹ Jogi A, Vallon-Christersson J, Holmquist L, Axelson H, Borg A, Pahlman S. Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cell Res* 2004;295:469-87.
- ¹² Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-76.

- ¹³ Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G, et al. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003;63:1441-4.
- ¹⁴ Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996;41:31-9.
- ¹⁵ Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dwhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:285-9.
- ¹⁶ Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhisrt MW. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999;53:113-7.
- ¹⁷ Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Hansgen G, Dunst J, Wurschmidt F, et al. Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:749-754.
- ¹⁸ Rudat V, Vanselow B, Wollensack P, Bettscheider C, Osman-Ahmet S, Eble MJ, et al. Repeatability and prognostic impact of the pretreatment pO(2) histography in patients with advanced head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2000;57:31-7.
- ¹⁹ Dunst J, Stadler P, Becker A, Lautenschlager C, Pelz T, Hansgen G, et al. Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. *Strahlenther Onkol* 2003;179:521-6.
- ²⁰ Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005;77:18-24.
- ²¹ Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
- ²² Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-4.

- ²³ Vengellur A, Woods BG, Ryan HE, Johnson RS, LaPress JJ. Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts. *Gene Expr* 2003;11:181-197.
- ²⁴ Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt K, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12091-6.
- ²⁵ Laderoute KR. The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:502-13.
- ²⁶ Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:601-8.
- ²⁷ Murphy BJ, Andrews GK, Bittel D, Discher DJ, McCue J, Green CJ, et al. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Res* 1999;59:1315-22.
- ²⁸ Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83.
- ²⁹ Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, et al. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:15030-40.
- ³⁰ Yan SF, Pinsky DJ, Stern DM. A pathway leading to hypoxia-induced vascular fibrin deposition. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:479-83.
- ³¹ Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
- ³² Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2004;64:55-63.
- ³³ McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 2005;280:6561-9.
- ³⁴ Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23:359-69.

- ³⁵ Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, et al. HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. *Mol Cell* 2005;17:793-803.
- ³⁶ Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755:107-20.
- ³⁷ Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4273-8.
- ³⁸ Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997;63:51-60.
- ³⁹ Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 1997;272:8581-93.
- ⁴⁰ Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;11:72-82.
- ⁴¹ Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem* 2002;277:32405-8.
- ⁴² Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in HEK293T cells. *Cancer Res* 2005;65:3299-306.
- ⁴³ Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:9361-74.
- ⁴⁴ Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 α versus Hif-2 α in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res* 2003;63:6130-4.

- ⁴⁵ Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005;25:5675-86.
- ⁴⁶ Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N, Hung MC. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res* 2005;65:3257-63.
- ⁴⁷ Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3 α 4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J* 2005;19:1396-1406.
- ⁴⁸ Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550-4.
- ⁴⁹ Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 2001;276:2292-8.
- ⁵⁰ Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17:3005-15.
- ⁵¹ Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 1999;209:254-67.
- ⁵² Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;386:403-7.
- ⁵³ Helton R, Cui J, Scheel JR, Ellison JA, Ames C, Gibson C, et al. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci* 2005;25:4099-107.
- ⁵⁴ Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding KM, Garcia JA, et al. Functions of the Per/ARNT/Sim (PAS) domains of the hypoxia inducible factor (HIF). *J Biol Chem* 2005;280:36047-54.
- ⁵⁵ Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:307-40.

- ⁵⁶ Kay SA, Millar AJ. New models in vogue for circadian clocks. *Cell* 1995;83:361-4.
- ⁵⁷ Isaac DD, Andrew DJ. Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the tracheless gene product. *Genes Dev* 1996;10:103-17.
- ⁵⁸ Bruick RK, McKnight SL. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. *Science* 2002;295:807-8.
- ⁵⁹ Chan DA, Sutphin PD, Yen SE, Giaccia AJ. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1(alpha). *Mol Cell Biol* 2005;25:6415-26.
- ⁶⁰ Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 1997;11:388-95.
- ⁶¹ Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:3436-44.
- ⁶² Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997;57:5328-35.
- ⁶³ Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:38205-11.
- ⁶⁴ Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E₂ is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:2330-4.
- ⁶⁵ Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001;21:3995-4004.
- ⁶⁶ Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutic. *Cancer Res* 2000;60:1541-5.

- ⁶⁷ Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000;14:391-6.
- ⁶⁸ Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7004-14.
- ⁶⁹ Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
- ⁷⁰ Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Dosoretz A, Holland JF, Levine AC. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2002;277:50081-6.
- ⁷¹ Fatyol K, Szalay AA. The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem* 2001;276:28421-9.
- ⁷² Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G, et al. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J* 2002;16:1453-5.
- ⁷³ Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:1138-43.
- ⁷⁴ Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 2005;46:31-6.
- ⁷⁵ Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2005;96:394-402.
- ⁷⁶ Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004;279:38458-65.
- ⁷⁷ Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 2003;17:2614-23.

- ⁷⁸ Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294:1337-40.
- ⁷⁹ Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
- ⁸⁰ Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
- ⁸¹ Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001;20:5197-206.
- ⁸² Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9630-5.
- ⁸³ Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275:25733-41.
- ⁸⁴ Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423-7.
- ⁸⁵ Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans EGL-9* and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43-54.
- ⁸⁶ Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:1172-80.
- ⁸⁷ Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, control HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004:941-952.
- ⁸⁸ Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2003;278:30772-80.

- ⁸⁹ Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111:709-20.
- ⁹⁰ Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, et al. Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem* 2005;280:31132-40.
- ⁹¹ Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001;15:2675-86.
- ⁹² Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16:1466-71.
- ⁹³ Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:343-54.
- ⁹⁴ Linke S, Stojkoski C, Kewley RJ, Booker GW, Whitelaw ML, Peet DJ. Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004;279:14391-7.
- ⁹⁵ Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, et al. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol Cell* 2005;17:503-12.
- ⁹⁶ Su YA, Hutter CM, Trent JM, Meltzer PS. Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol Carcinog* 1996;15:270-5.
- ⁹⁷ Litovchick L, Friedmann E, Shaltiel S. A selective interaction between OS-9 and the carboxyl-terminal tail of meprin beta. *J Biol Chem* 2002;277:34413-23.
- ⁹⁸ Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000;275:25130-8.
- ⁹⁹ Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A, Caro J. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* 2001;276:21995-8.

- ¹⁰⁰ Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 2001;98:296-302.
- ¹⁰¹ Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 2005;1:401-8.
- ¹⁰² Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2005;1:409-14.
- ¹⁰³ Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab* 2005;1:393-9.
- ¹⁰⁴ Quintero M, Brennan PA, Thomas GJ, Moncada S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res.* 2006;66:770-4.
- ¹⁰⁵ Callapina M, Zhou J, Schnitzer S, Metzen E, Lohr C, Deitmer JW, et al. Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1 α accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res* 2005;306:274-84.
- ¹⁰⁶ Bernards R, Weinberg RA. Metastasis genes: a progression puzzle. *Nature* 2002;418:823.
- ¹⁰⁷ Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6.
- ¹⁰⁸ Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:513-21.
- ¹⁰⁹ Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor 1 α with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56:494-501.

- ¹¹⁰ Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1831-7.
- ¹¹¹ Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003;97:1573-81.
- ¹¹² Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rossler K, Prodingner A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 2001;92:165-71.
- ¹¹³ Kimura S, Kitadai Y, Kuwai T, Tanaka S, Hihara J, Yoshida K, et al. Expression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma: relation to hypoxia-inducible factor-1alpha, angiogenesis and apoptosis. *Pathobiology* 2005;72:179-85.
- ¹¹⁴ Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002;95:1055-63.
- ¹¹⁵ Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I, Spiliadi C, Theodoropoulos GE, Tsoukala V, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU Int* 2005;95:425-31.
- ¹¹⁶ Palit V, Phillips RM, Puri R, Shah T, Bibby MC. Expression of HIF-1alpha and Glut-1 in human bladder cancer. *Oncol Rep* 2005;14:909-13.
- ¹¹⁷ Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:8554-60.
- ¹¹⁸ Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J, et al. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* [serial online] 2005 Jul [citado 29 Julio 2005];1. Disponible en: URL: <http://www.springerlink.com>.
- ¹¹⁹ Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003;10:797-802.

- ¹²⁰ Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:207-13.
- ¹²¹ Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003;22:3213-20.
- ¹²² Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY, et al. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 2005;8:99-110.
- ¹²³ Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 2004;23:1949-56.
- ¹²⁴ Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5.
- ¹²⁵ Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-21.
- ¹²⁶ Okada K, Osaki M, Araki K, Ishiguro K, Ito H, Ohgi S. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas. *Anticancer Res* 2005;25:3003-9.
- ¹²⁷ Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor 1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:309-14.
- ¹²⁸ Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer* 2005;116:734-9.
- ¹²⁹ Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, et al. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002;1:459-68.
- ¹³⁰ Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1129-35.

- ¹³¹ Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002;62:2493-7.
- ¹³² Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1527-33.
- ¹³³ Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005;5:84
- ¹³⁴ Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 2001;85:881-90.
- ¹³⁵ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:1192-202.
- ¹³⁶ Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-6.
- ¹³⁷ Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenacker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1661-8.
- ¹³⁸ Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8104-9.
- ¹³⁹ Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 2000;14:34-44.
- ¹⁴⁰ Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 2000;6:1335-40.

- ¹⁴¹ Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor 1 α renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-54.
- ¹⁴² Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor 1 α reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol* 2003;162:1283-91.
- ¹⁴³ Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002;1:237-46.
- ¹⁴⁴ Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD. The contribution of VHL substrate binding and HIF-1 α to the phenotype of *VHL* loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002;1:247-55.
- ¹⁴⁵ An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 1998;392:405-8.
- ¹⁴⁶ Fels DR, Koumenis C. HIF-1 α and p53: the ODD couple?. *Trends Biochem Sci* 2005;30:426-9.
- ¹⁴⁷ Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, et al. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003;22:4734-44.
- ¹⁴⁸ Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91.
- ¹⁴⁹ Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004;57:1009-14.
- ¹⁵⁰ Gross J, Fuchs J, Machulik A, Jahnke V, Kietzmann T, Bockmuhl U. Apoptosis, necrosis and hypoxia inducible factor-1 in human head and neck squamous cell carcinoma cultures. *Int J Oncol* 2005;27:807-14.
- ¹⁵¹ Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. *Cancer Lett* 2005;225:297-304.

- ¹⁵² Rodrigo JP, Suarez C, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, et al. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001;111:1297-301.
- ¹⁵³ Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, et al. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:710-7.
- ¹⁵⁴ Sticht C, Hofele C, Flechtenmacher C, Bosch FX, Freier K, Lichter P, et al. Amplification of Cyclin L1 is associated with lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* 2005;92:770-4.
- ¹⁵⁵ Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilias G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [serial online] 2005 Mar [citado 1 Marzo 2005];1. Disponible en: URL: <http://www.springerlink.com>.
- ¹⁵⁶ Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:710-7.
- ¹⁵⁷ Marx J. Cancer. Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. *Science* 2005;308:1248-9.
- ¹⁵⁸ Rhee J, Hoff PM. Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:1701-11.
- ¹⁵⁹ Belozero V, Van Meir EG. Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005;16:901-9.
- ¹⁶⁰ Olenyuk BZ, Zhang GJ, Klco JM, Nickols NG, Kaelin WG Jr, Dervan PB. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16768-73.
- ¹⁶¹ Hossain CF, Kim YP, Baerson SR, Zhang L, Bruick RK, Mohammed KA, et al. Saururus cernuus lignans-potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:1026-33.
- ¹⁶² Chau NM, Rogers P, Aherne W, Carroll V, Collins I, McDonald E, et al. Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1 α induction in response to hypoxic stress and growth factors. *Cancer Res* 2005;65:4918-28.

- ¹⁶³ Han JY, Oh SH, Morgillo F, Myers JN, Kim E, Hong WK, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha and antiangiogenic activity of farnesyltransferase inhibitor SCH66336 in human aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1272-86.
- ¹⁶⁴ Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, et al. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res* 2005;65:605-12.
- ¹⁶⁵ Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005;65:9047-55.
- ¹⁶⁶ Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002;2:657-72.
- ¹⁶⁷ Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, et al. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell* 2005;8:131-41.
- ¹⁶⁸ Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncol* 2005;7:134-53.
- ¹⁶⁹ Sun X, Liu M, Wei Y, Liu F, Zhi X, Xu R, et al. Overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense HIF-1alpha eradicates gliomas. *Cancer Gene Ther* [serial online] 2005 Oct [citado 7 Octubre 2005];1. Disponible en: URL: <http://www.nature.com/cgt>.
- ¹⁷⁰ Shibata T, Akiyama N, Noda M, Sasai K, Hiraoka M. Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:913-6.
- ¹⁷¹ Cho WK, Seong YR, Lee YH, Kim MJ, Hwang KS, Yoo J, et al. Oncolytic effects of adenovirus mutant capable of replicating in hypoxic and normoxic regions of solid tumor. *Mol Ther* 2004;10:938-49.
- ¹⁷² Ogura M, Shibata T, Yi J, Liu J, Qu R, Harada H, et al. A tumor-specific gene therapy strategy targeting dysregulation of the VHL/HIF pathway in renal cell carcinomas. *Cancer Sci* 2005;96:288-94.
- ¹⁷³ Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiol* 2001;187:22-36.

- ¹⁷⁴ Binley K, Askham Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, et al. Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther* 2003;10:540-9.
- ¹⁷⁵ Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *Immunol Methods* 1992;151:237-44.
- ¹⁷⁶ Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, Kathuria S, Walter SA, Reddy SP. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma?. *Cancer* 1998;82:286-91.
- ¹⁷⁷ Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, et al. p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:603-9.
- ¹⁷⁸ Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 2002;94:713-22.
- ¹⁷⁹ Hadjiloucas I, Gilmore AP, Bundred NJ, Streuli CH. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. *Br J Cancer* 2001;85:1522-6.
- ¹⁸⁰ Oudejans JJ, Harijadi A, Cillessen SA, Busson P, Tan IB, Dukers DF, et al. Absence of caspase 3 activation in neoplastic cells of nasopharyngeal carcinoma biopsies predicts rapid fatal outcome. *Mod Pathol* 2005;18:877-85.
- ¹⁸¹ Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
- ¹⁸² van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, Berns E, van der Burg ME, Green J, et al. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1997;50:801-4.
- ¹⁸³ Watanabe T, Oda Y, Tamiya S, Masuda K, Tsuneyoshi M. Malignant peripheral nerve sheath tumour arising within neurofibroma. An immunohistochemical analysis in the comparison between benign and malignant components. *J Clin Pathol* 2001;54:631-6.
- ¹⁸⁴ Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-87

- ¹⁸⁵ Papandreou I, Krishna C, Kaper F, Cai D, Giaccia AJ, Denko NC. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Res* 2005;65:3171-8.
- ¹⁸⁶ Smith K, Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, Mekhail K, Lee S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL^{-/-} renal cancer. *Cancer Res* 2005;65:5221-30.
- ¹⁸⁷ Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H, To KF, Poon TC, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:2595-604.
- ¹⁸⁸ Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003;162:1789-806.
- ¹⁸⁹ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61:1830-2.
- ¹⁹⁰ Sobhanifar S, Aquino-Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res* 2005;65:7259-66.
- ¹⁹¹ Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Van Spaendonk RM, Concus A, Carey TE, et al. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:702-8.
- ¹⁹² Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998;17:5085-94.
- ¹⁹³ Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999;94:1561-7.
- ¹⁹⁴ Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000;275:26765-71.

- ¹⁹⁵ Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001;89:47-54.
- ¹⁹⁶ Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:23111-5.
- ¹⁹⁷ Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 2005;8:143-53.
- ¹⁹⁸ Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7:77-85.
- ¹⁹⁹ Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004;64:1765-72.
- ²⁰⁰ Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med* 2005;11:992-7.
- ²⁰¹ Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Hiyama T, Tanimoto K, Chayama K. Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Cancer Sci* 2004;95:149-53.
- ²⁰² Mayer A, Wree A, Hockel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1alpha protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res* 2004;64:5876-81.
- ²⁰³ Menon C, Fraker DL. Tumor oxygenation status as a prognostic marker. *Cancer Lett* 2005;221:225-35.
- ²⁰⁴ van Diest PJ, Vleugel MM, van der Wall E. Expression of HIF-1alpha in human tumours. *Clin Pathol* 2005;58:335-6.
- ²⁰⁵ Dai H, van't Veer L, Lamb J, He YD, Mao M, Fine BM, et al. A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:4059-66.

- ²⁰⁶ Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2005;37:182-6.
- ²⁰⁷ Sanchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR. Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53. *Mol Cell* 2005;17:11-21.
- ²⁰⁸ Bosch FX, Ritter D, Enders C, Flechtenmacher C, Abel U, Dietz A, et al. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer* 2004;111:530-8.
- ²⁰⁹ Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:502-8.
- ²¹⁰ Hussein MR. Alterations of p53 and Bcl-2 protein expression in the laryngeal intraepithelial neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2005;4:213-7.
- ²¹¹ Sohda M, Ishikawa H, Masuda N, Kato H, Miyazaki T, Nakajima M, et al. Pretreatment evaluation of combined HIF-1alpha, p53 and p21 expression is a useful and sensitive indicator of response to radiation and chemotherapy in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2004;110:838-44.
- ²¹² Waitzberg AF, Nonogaki S, Nishimoto IN, Kowalski LP, Miguel RE, Brentani RR, et al. Clinical significance of c-myc and p53 expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Detect Prev* 2004;28:178-86.
- ²¹³ Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, et al. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 2001;21:1297-310.
- ²¹⁴ Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* 2004;279:41275-9.
- ²¹⁵ Li J, Zhang X, Sejas DP, Pang Q. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res [serial online]* 2005 Jun [citado 16 Junio 2005];1. Disponible en: URL: <http://www.sciencedirect.com>.
- ²¹⁶ Chen Y, Shi G, Xia W, Kong C, Zhao S, Gaw AF, et al. Identification of hypoxia-regulated proteins in head and neck cancer by proteomic and tissue array profiling. *Cancer Res* 2004;64:7302-10.

- ²¹⁷ Matsuyama T, Nakanishi K, Hayashi T, Yoshizumi Y, Aiko S, Sugiura Y, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2005;96:176-82.
- ²¹⁸ Nakayama K, Kanzaki A, Hata K, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) gene expression in human ovarian carcinoma. *Cancer Lett* 2002;176:215-23.
- ²¹⁹ Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2004;10:8405-12.
- ²²⁰ Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003;24:1779-83.
- ²²¹ Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1alpha gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:122-6.
- ²²² Chau CH, Permenter MG, Steinberg SM, Retter AS, Dahut WL, Price DK, et al. Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1alpha gene may confer susceptibility to androgen-independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther [serial online]* 2005 Nov [citado 11 Marzo 2005];4. Disponible en: URL: <http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/>.
- ²²³ Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, Pouyssegur J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2000;275:6922-7.
- ²²⁴ Kewley RJ, Whitelaw ML. Phosphorylation inhibits DNA-binding of alternatively spliced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun [serial online]* 2005 Aug [citado 26 Agosto 2005];1. Disponible en: URL: <http://www.sciencedirect.com>.
- ²²⁵ Chun YS, Lee KH, Choi E, Bae SY, Yeo EJ, Huang LE, et al. Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1alpha isoform: implications for tumor promotion. *Cancer Res* 2003;63:8700-7.
- ²²⁶ Schmid T, Zhou J, Brune B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 2004;8:423-31.

- ²²⁷ Cor A, Pizem J, Gale N. Immunohistochemical analysis of pro- and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2004;444:439-46.
- ²²⁸ Braakhuis BJM, Sneeuwloper G, Snow GB. The potential of the nude mouse xenograft model for the study of head and neck cancer. *Arch Otorhinolaryngol* 1984;239:69-79.
- ²²⁹ Sharkey FE, Fogh J. Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int J Cancer* 1979;24:733-8.
- ²³⁰ Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:293-8.
- ²³¹ Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E. Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31:216-21.
- ²³² Fitch KA, Somers KD, Schechter GL. The development of a head and neck tumor model in the nude mouse. En: Wolf GT, Carey TE, editores. *Head and Neck Oncology Research*. Amsterdam: Kugler publications;1988. p. 187-190.
- ²³³ Dinesman A, Haughey B, Gates GA, Aufdemorte T, Von Hoff DD. Development of a new in vivo model for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;103:766-74.
- ²³⁴ Simon C, Nemechek AJ, Boyd D, O'Malley BW Jr, Goepfert H, Flaitz CM, et al. An orthotopic floor-of-mouth cancer model allows quantification of tumor invasion. *Laryngoscope* 1998;108:1686-91.
- ²³⁵ Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 1999;17:343-59.